

**BAZI SİNYAL BİLEŞİKLERİ İLE ULTRAVİYOLE
IŞIGININ FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİSİNİN
SOĞUK TOLERANSI ÜZERİNE FİZYOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL ETKİLERİ**

Bagher SHEIKHI DIDANI

**Doktora Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Prof. Dr. Rahmi Dumlupınar
2022
(Her hakkı saklıdır.)**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

BAZI SİNYAL BİLEŞİKLERİ İLE ULTRAVİYOLE IŞIGININ FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİSİNİN SOĞUK TOLERANSI ÜZERİNE FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİ

(Physiological and Biochemical Effects of Some Signal Compounds and Ultraviolet Light on Cold Tolerance of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.))

DOKTORA TEZİ

Bagher SHEIKHI DIDANI

Danışman: Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

Erzurum
Haziran 2022

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Bagher SHEIKHI DIDANI tarafından hazırlanan “Bazı Sinyal Bileşikleri ile Ultraviyole Işığının Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkisinin Soğuk Toleransı Üzerine Fizyolojik ve Biokimyasal Etkileri” başlıklı çalışması 15/06/2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Biyoloji Ana Bilim Dalı, Botanik Bilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Ökkeş ATICI <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Rahmi DÜMLUPINAR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. M. Sinan TAŞPINAR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. MUCİP GENİŞEL <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Furkan ORHAN <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim
Kurulunun .../.../.... tarih
ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk BUĞRAHAN CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak sunduğum “Bazı Sinyal Bileşikleri ile Ultraviyole Işığının Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkisinin Soğuk Toleransı Üzerine Fizyolojik ve Biokimyasal Etkileri” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	28	30
Kuramsal Temeller	21	30
Materyal ve Yöntem	31	35
Bulgular	8	20
Tartışma	8	20
Tezin Geneli	23	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Bagher Sheikhi DİDANİ	Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR
15.6.2022	15.6.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmam esnasında her türlü desteği sağlayan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Rahmi DÜMLÜPINAR'a içten şükranlarımı sunarım. Çalışmalarım bana yol gösteren kıymetli hocam Sayın Prof. Ökkeş ATICI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında ilgi ve yardım gördüğüm değerli hocam ve bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a ve tez izleme komitesi üyelerinden Sayın Prof. Dr.M. Sinan TAŞPINAR'a ve Sayın Doç. Dr. Mucip GENİŞEL'e şükranlarımı sunarım.

Elektroforez işlemlerinde büyük yardımlarını gördüğüm Sayın Doç. Dr. Hülya TÜRK'e ve deneylerimde yardımlarını esirgenmeyen laboratuvar arkadaşlarım Ümran KARAYEL ve istatistik analizlerin yapımında yardımcı olan Arş. Gör. Özlem GÜLMEZ'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında beni destekleyen aileme, eşim ve çocuklarım Darya, Mona ve Mohammad Ebrahime şükranlarımı sunarım.

Bagher SHEIKHI DIDANI

ÖZET

DOKTORA TEZİ

BAZI SİNYAL BİLEŞİKLERİ İLE ULTRAVİYOLE IŞIGININ FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİSİNİN SOĞUK TOLERANSI ÜZERİNE FİZYOLOJİK ve BİYOKİMYASAL ETKİLERİ

Bagher SHEIKHI DIDANI

Amaç: Bu çalışmada bazı bitki hormonları (salisilik asit ve absisik asit) ve memeli cinsiyet hormonlarının (östrojen ve progesterone) fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisinde, UV-B ve soğuk stresine karşı iyileştirici etkileri araştırılmıştır.

Yöntem: Çimlendirilmiş fasulye tohumları kum içeren saksılara eşit olacak şekilde ekilmiştir. Bitkiler 17 günlük olduğunda, 1 dk aralıklarla 3 kez 10 sn UV-B ışığına maruz bırakılmıştır. Daha sonra bitki hormonları olarak 10^{-4} M salisilik asit (SA) ve 10^{-4} M absisik asit (ABA), memeli cinsiyet hormonları olarak 10^{-6} M östrojen (ÖS) ve 10^{-9} M progesteron (PRO) ayrı ayrı veya kombinasyonlar halinde fide yapraklarına uygulanmıştır. Normal koşullarda (24/20 °C, gündüz/gece) büyüyen bitkiler, ilave 3 gün için sıcaklığı 9/5 °C olan bir iklim dolabına aktarılmıştır. Uygulama yapılmış ve yapılmamış bitkilerde büyüme parametreleri (kök ve gövde uzunluğu) ve kuru madde miktarı, hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriği, lipid peroksidasyon (MDA olarak) seviyesi, toplam çözünebilir protein, klorofil, karbohidrat ve fenolik madde miktarları belirlenmiştir. Aynı bitkilerde, antioksidan enzimleri (süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz) ile bitki azot metabolizması enzimlerinin (nitrat redüktaz, NR; nitrit redüktaz, NiR; ve glutamin sentaz, GS) aktiviteleri ve çözünebilir proteinlerin SDS-PAGE'deki değişimleri de değerlendirilmiştir.

Bulgular: Tek başına soğuk ve UV uygulaması fasulye bitkisinin kök-gövde uzunluğu ve kuru madde miktarını kontrole göre azaltmıştır. Çalışılan bitki ve memeli cinsiyet hormonlarının ayrı veya kombinasyonları genelde aynı parametreleri artırmıştır. Tek başına soğuk, protein miktarını artırırken, Soğuk+UV uygulaması ise düşürmüştür. Bitki ve memeli cinsiyet hormonları protein içeriğini soğuk uygulamasına göre azaltırken, Soğuk+UV'ye göre artırmıştır. Çoklu hormon uygulamalarında ise genel olarak artış belirlenmiştir. Çözünebilir şeker miktarı, soğuk uygulanan bitkilerde artarken, Soğuk+UV uygulanmış bitkilerde düşmüştür. Bitki ve memeli cinsiyet hormonları şeker miktarını tek başına soğuğa göre azaltırken, çoklu hormon uygulamaları genelde artırmıştır. Tek başına soğuk, toplam klorofil miktarını düşürürken, UV uygulaması soğuğa göre artırmıştır. Bitki ve memeli cinsiyet hormon uygulamaları klorofil miktarını düşürmüş, ancak çoklu hormon uygulamaları artırmıştır. Soğuk ve Soğuk+UV uygulamaları H_2O_2 içeriğini kontrole göre artırırken, bitki ve memeli cinsiyet hormonları soğuk ve Soğuk+UV uygulamasına göre düşürmüştür. Lipid peroksidasyonu (LPO) seviyesi (MDA olarak), soğuk ve Soğuk+UV ile artmıştır. Ancak LPO her iki grup hormon uygulamalarında, tek başına soğuğa göre düşmüştür. Soğuk ve Soğuk+UV uygulamaları SOD, CAT, APX, POD ve GR aktivitelerini artırmıştır. Bitki ve memeli cinsiyet hormonlarının hem ayrı hem de kombinasyonları aynı enzimlerin aktivitelerini genelde düşürmüştür. Soğuk ve Soğuk+UV uygulamaları NR, NiR ve GS aktivitelerini azaltmıştır. Uygulanan hormonlar UV ve soğukun aynı enzimler üzerindeki etkisini belirgin şekilde hafifletmiştir. SDS-PAGE bulgularına göre, soğuk uygulamasıyla, bazı polipeptidlerin bant şiddeti artarken, bitki ve memeli cinsiyet hormonları, birçok polipeptidin bant şiddetini artırmanın yanında, yeni polipeptid bantlarının sentezine neden olmuştur.

Sonuç: Çalışma sonucunda her iki stres (soğuk ve UV-B) etkisine maruz kalan fasulye bitkisinde fizyolojik ve biokimyasal olarak olumsuzluklar olduğu tespit edilmiş, ancak bu olumsuzlukların bitki ve memeli cinsiyet hormonlarıyla belirgin şekilde hafifletildiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan enzim, *Phaseolus vulgaris*, protein, peaktif oksijen, MDA, klorofil, fenolik madde, karbohidrat, azot metabolizması, soğuk stresi, UV stresi

Haziran 2022, 105 sayfa

ABSTRACT

DOCTORATE THESIS

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS OF SOME SIGNAL COMPOUNDS AND ULTRAVIOLET LIGHT ON COLD TOLERANCE OF BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)

Bagher SHEIKHI DIDANI

Purpose: In this study, the improvement effects of plant hormones (salicylic acid and abscisic acid) and mammalian sex hormones (estrogen and progesterone) against UV-B and cold stress in bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.) were investigated.

Method: The bean seeds were planted equally in pots filled with sand. After 17 days from the germination, the developing seedlings were exposed to UV-B irradiation 3 times for 10 seconds at 1-minute intervals. Then, the plant hormones, salicylic acid (SA) 10^{-4} M, abscisic acid (ABA) 10^{-4} M, and mammalian sex hormones estrogen (ES) 10^{-6} M, progesterone (PRO) 10^{-9} M were applied on seedling leaves. The plants under normal conditions (24/20 °C, day/night) were transferred to a climate cabinet with a temperature of 9/5 °C for 3 days. In treated and untreated seedlings growth parameters (root and stem length), dry matter amount, and hydrogen peroxide (H_2O_2) and lipid peroxidation (LPO) level (as MDA), and total soluble protein, chlorophyll, carbohydrate, and phenolic substance contents, and antioxidant enzyme (superoxide dismutase, catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase) activities were determined. In addition, the changes in nitrogen assimilation by measuring the activity of nitrogen metabolism enzymes, and the protein patterns after SDS-PAGE analysis were evaluated in the same seedlings.

Findings: The cold alone and the UV treatment decreased the root -stem length and dry matter amount of the bean plant compared to control. Separate or combinations of the studied plant and mammalian sex hormones generally increased the same parameters. Cold alone increased soluble protein content while Cold+UV decreased it. Plant and mammalian sex hormones decreased protein content compared to cold alone while increasing it compared to Cold+UV. In the multi-hormone applications, an increase was determined in general. Soluble sugar content increased with the cold application while decreasing with Cold+UV. Plant and mammalian sex hormones decreased sugar content compared to cold alone, yet it was generally increased by the multi-hormone applications. While cold alone decreased the total chlorophyll content, UV application increased it compared to cold. Plant and mammalian sex hormones decreased the chlorophyll content, yet multiple hormone applications increased it. Cold and Cold+UV increased H_2O_2 content compared to control while plant and mammalian sex hormones decreased it compared to cold and Cold+UV. LPO increased to with cold and Cold+UV applications. However, LPO decreased in both groups of hormones compared to cold alone. Cold and Cold+UV increased SOD, CAT, APX, POD, and GR activities. Plant and mammalian sex hormones, both separately and in combination, generally reduced the activities of the same enzymes compared to cold and Cold+UV. Cold and Cold+UV applications decreased NR, NiR and GS activities. The hormones studied significantly attenuated the effect of UV and cold on the same enzymes. According to the SDS-PAGE findings, while the band intensity of several polypeptides increased by cold application, plant and mammalian sex hormones increased the intensity of many polypeptide bands as well as caused the synthesis of new polypeptide bands.

Results: Both stresses (cold and UV-B) caused physiological and biochemical disorders in the bean plants, but it was determined that these negative effects were significantly mitigated by the studied plant and animal sex hormones.

Keywords: Antioxidant enzymes, *Phaseolus vulgaris*, protein, reactive oxygen, MDA, chlorophyll, phenolic substance, carbohydrate, nitrogen metabolism, cold stress, UV stress.

June 2022, 105 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
GİRİŞ.....	1
Bitki Hormonları	7
Salisilik Asit (SA)	7
Absisik Asit (ABA).....	8
Memeli Cinsiyet Hormonları	9
Progesteron.....	9
Östrojen.....	10
KURAMSAL TEMELLER.....	14
Reaktif Oksijen Türleri	14
Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$).....	14
Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$).....	15
Hidrojen peroksit (H_2O_2).....	16
Hidroksil radikali ($^{\bullet}\text{OH}$).....	16
Lipid Peroksidasyonu.....	16
Antioksidan Enzimler.....	17
Süperoksit dismutaz (SOD)	17
Guaiacol Peroksidaz (POD)	17
Katalaz (CAT).....	18
Askorbat peroksidaz (APX)	19
Glutasyon (GSH)	19
Askorbat (L-Askorbik Asit, C Vitamini)	20
MATERYAL ve YÖNTEMLER	22
Kullanılan Kimyasallar ve Aletler	22
Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanma Koşulları.....	22

Yöntemler.....	25
Bitkilerin yetiştirilmesi	25
Kök ve gövde uzunluğu belirlenmesi.....	27
Protein tayini	27
Total klorofil içeriği	28
Lipid peroksidasyon (LPO) seviyesi.....	28
Hidrojen peroksitin (H ₂ O ₂) içeriği	29
Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi	29
Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi	32
Azot Metabolizması Enzimlerinin Aktiviteleri.....	33
Nitrat redüktaz (NR) aktivitesinin tayini.....	33
Nitrit redüktaz (NiR) aktivitesi	34
Glutamin sentaz (GS) aktivitesi tayini	34
Toplam çözünebilir karbohidrat tayini.....	35
SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS PAGE)	35
İstatistik Analizler	36
ARAŞTIRMA BULGULARI	37
Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Kök Gövde Uzunlukları Üzerine Etkisi.....	37
Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Yaş ve Kuru Ağırlık Üzerine Etkisi.....	38
Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Çözünebilir Protein İçeriği Üzerine Etkisi....	40
Soğuk, UV ve hormon Uygulamalarının Klorofil ve Karotenoid İçeriği Üzerine Etkisi	43
Soğuk, UV ve hormon Uygulamalarının H ₂ O ₂ içeriği üzerine etkisi	46
Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının MDA İçeriği Üzerine Etkisi.....	48
Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Toplam Fenolik Madde İçeriği Üzerine Etkisi	50
Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Toplam Karbohidrat İçeriği Üzerine Etkisi ..	52
Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının SOD Enzim İçeriği Üzerine Etkisi.....	54
Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının CAT Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	56
Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının POD Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	58
Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının APX Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	60
Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının GR Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	63
Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Nitrat Redüktaz (NR) Aktivitesi Üzerine Etkisi	64

Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Nitrit Redüktaz (NiR) Aktivitesi Üzerine Etkisi	66
Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Glutamin Sentaz Aktivitesi Üzerine Etkisi...	68
SDS-PAGE Elektroforezinden Elde Edilen Bulgular	71
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	76
Tartışma.....	76
Sonuç ve Öneriler.....	81
KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	91



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Soğuk + UV stresine karşı uygulanan bitki ve memeli cinsiyet hormonlarının kök gövde uzunluğuna (cm/fide) etkisi.....	37
Tablo 2. Soğuk stresine karşı uygulanan bitki ve hayvan cinsiyet hormonlarının yaş ve kuru ağırlığa etkisi.....	39
Tablo 3. Soğuk ve UV stresine maruz kalan fasulye bitkisinde protein içeriği.....	41
Tablo 4. Soğuk ve UV'ye maruz kalan fasulye bitkisinde klorofil içerikleri (mg/gr doku)....	43
Tablo 5. Soğuk ve UV'ye maruz kalan fasulye bitkisinde karotenoid içerikleri (mg/gr doku)	45
Tablo 6. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen H ₂ O ₂ içerikleri	47
Tablo 7. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen MDA içerikleri	49
Tablo 8. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen fenolik madde içerikleri.....	51
Tablo 9. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen toplam karbohidrat içerikleri	53
Tablo 10. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen SOD aktivitesi.....	55
Tablo 11. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen CAT aktivitesi.....	57
Tablo 12. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen POD aktivitesi.....	59
Tablo 13. APX aktivitesi	61
Tablo 14. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen GR aktivitesi	63
Tablo 15. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen NR aktivitesi.....	65
Tablo 16. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen NiR aktivitesi.....	67
Tablo 17. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen GS aktivitesi.....	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Soğuğa hassas bitkilerin üşüme sıcaklıklarına verdiği fizyolojik ve biyokimyasal cevaplar	3
Şekil 2. Işık dalga boyları.....	4
Şekil 3. Bitkilerde stres oluşturan faktörler.....	5
Şekil 4. Atmosferik oksijenden reaktif oksijen türlerinin oluşumu.	6
Şekil 5. Salisilik asidin kimyasal yapısı	8
Şekil 6. Absisik asidin açık kimyasal yapısı	9
Şekil 7. Progesteronun genel yapısı	10
Şekil 8. Östrojenin genel yapısı.....	10
Şekil 10. Soğuk, UV ve hormon uygulanan fasulye bitkileri.....	26
Şekil 11. Protein tayini için kullanılan standart grafik.....	27
Şekil 12. H ₂ O ₂ miktarını belirlemede kullanılan standart grafik	29
Şekil 13. CAT aktivitesini ölçmek için kullanılan standart grafik	31
Şekil 14. Toplam fenolik madde miktarını belirlemek için kullanılan grafik.....	32
Şekil 15. NR ve NiR enzim aktivitesi tayininde kullanılan standart grafik	34
Şekil 16. Tekli hormon uygulamalarının kök gövde uzunluğuna etkisi.....	38
Şekil 17. Çoklu hormon uygulamalarının kök ve gövde uzunluğuna etkisi	38
Şekil 18. Tekli hormon uygulamalarının yaş ve kuru ağırlık üzerine etkileri.....	40
Şekil 19. Çoklu hormon uygulamalarının yaş ve kuru ağırlık üzerine etkileri	40
Şekil 20. Tekli ve ikili uygulamalardaki protein miktarı	42
Şekil 21. Çoklu hormon uygulamasındaki protein içeriği.....	42
Şekil 22. Klorofil a (Kla), Klorofil b (Klb) ve Toplam klorofil (TKLO) içeriği	44
Şekil 23. Çoklu hormon uygulamalarında Klorofil a (Kla), Klorofil b (Klb) ve Toplam klorofil (TKLO) içeriği.....	44
Şekil 24. Tekli hormon uygulamalarında Karotenoid içeriği.....	46
Şekil 25. Çoklu hormon uygulamalarında Karotenoid içeriği	46
Şekil 26. Tekli hormon uygulamalarında H ₂ O ₂ miktarı	48
Şekil 27. Çoklu hormon uygulamalarında H ₂ O ₂ miktarı.....	48
Şekil 28. Tekli hormon uygulamalarında MDA miktarı içeriğine etkisi	50
Şekil 29. Çoklu hormon uygulamalarında MDA içeriği değişimi	50
Şekil 30. Tekli hormon uygulamalarında fenolik madde içerikleri.....	52
Şekil 31. Çoklu hormon uygulamalarında fenolik madde içerikleri	52
Şekil 32. Tekli hormon uygulamalarında şeker içerikleri	54

Şekil 33. Çoklu hormon uygulamalarında şeker içerikleri.....	54
Şekil 34. Tekli hormon uygulamalarında SOD aktivitesi	56
Şekil 35. Çoklu hormon uygulamalarında SOD aktivitesi.....	56
Şekil 36. Tekli hormon uygulamalarında CAT aktivitesi	58
Şekil 37. Çoklu hormon uygulamalarında CAT aktivitesi.....	58
Şekil 38. Tekli hormon uygulamalarında POD aktivitesi	60
Şekil 39. Çoklu hormon uygulamalarında POD aktivitesi	60
Şekil 40. Tekli hormon uygulamalarında APX aktivitesi	62
Şekil 41. Çoklu hormon uygulamalarında APX aktivitesi.....	62
Şekil 42. Tekli hormon uygulamalarında GR aktivitesi.....	64
Şekil 43. Çoklu hormon uygulamalarında GR aktivitesi	64
Şekil 44. Tekli hormon uygulamalarında NR aktivitesi.....	66
Şekil 45. Çoklu hormon uygulamalarında NR aktivitesi	66
Şekil 46. Tekli hormon uygulamalarında NiR aktivitesi.....	68
Şekil 47. Çoklu hormon uygulamalarında NiR aktivitesi	68
Şekil 48. Tekli hormon uygulamalarında GS aktivitesi	70
Şekil 49. Çoklu hormon uygulamalarında GS aktivitesi.....	71
Şekil 50. Fasulye bitkisinin protein jel görüntüsü.....	72
Şekil 51. Fasulye bitkisinin protein jel görüntüsü.....	73
Şekil 52. Fasulye bitkisinin protein jel görüntüsü.....	74
Şekil 53. Fasulye bitkisinin protein jel görüntüsü.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	: Absisik asit
APX	: Askorbat peroksidaz
AsA	: Askorbik asit
CAT	: Katalaz
DHA	: Dihidroaskorbik asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
gr	: Gram
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
KD	: Kilo Dalton
Mm	: Milimolar
MDA	: Malondialdehid
NBT	: Nitroblue tetrazolium klörür
NR	: Nitrat Redüktaz
NİR	: Nitrit Redüktaz
ÖS	: Österjen
POD	: Peroksidaz
PRO	: Progesteron
POD	: Peroksidaz
PVP	: Polivinilpirolidon
ROT	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Devir/ dakika
SA	: Salisilik asit
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiobarbiütrik asit
TCA	: Trikloro asetik asit
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
xg	: Yerçekimi ivmesinin katı

GİRİŞ

Atmosferik karbonu kullanıp kendi besinini yapan ve O₂ oluşturan (fotosentez) bitkiler hayatımızın vazgeçilmez unsurudurlar (Bray *et al.* 2000). Bunun yanı sıra diğer canlılar için besin, barınak olmakta ve çeşitli doğal afetlerden (sel, erozyon) korumaya yardımcı olmaktadır. Yine bilindiği üzere, bitkilerin ürettikleri sekonder metabolitlerden kimya, tıp, eczacılık ve kozmetikte yararlanılmaktadır (Magodoff and Weil 2004; Yağmur 2008; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011).

Yaşamın devamlılığı için büyük öneme sahip bu canlıların büyümesi ve gelişmesi de oldukça önem taşımaktadır. Bitkinin büyüme ve gelişmesi kendi içyapısı (genetik yapı, hormonlar vb.) ve çevresel faktörlere (ışık, su, sıcaklık, toprağın yapısı, UV) bağlıdır. Çevresel faktörler, bitkinin büyüme ve gelişmesini ve ürün verimliliğini etkilemektedir. Abiyotik ve biyotik olarak sınıflandırılan faktörler strese neden olup bitkinin büyümesini engellenmesine ve hatta ölümüne yol açabilirler (Kocaçalışkan 2008).

Bitkilerin normal büyüme ve gelişmelerini sağladıkları optimum koşullar olan değerlerin altı veya üstü biyotik ve abiyotik koşulların bitkilerde oluşturduğu değişim durumları stres olarak tanımlanmaktadır. Başka bir ifadeyle stres; önemli fizyolojik, metabolik değişimlere yol açan, bitki büyüme ve gelişimini olumsuz şekilde etkileyen, ürün verimini azaltan, bitki organ kaybına hatta ölümüne sebep olan değişimlerdir (Taiz and Zieger 2008).

Stresin sıfır stresten, şiddetli strese kadar çok farklı dereceleri vardır. Stresin derecesi bitki türünden türüne değişiklik göstermektedir. Bir bitki türünde strese yol açan bir faktör, diğer bitki türünde strese sebep olmayabilir. Yine strese dayanıklılık, bitkinin büyüme ve gelişme dönemine göre de değişebilmektedir. Bazı durumlarda bir bitkinin bütünü veya bir kısmı strese karşı dirençli olabilirken, diğer bazı kısımları ise strese daha az dayanıklı olabilmektedir (Hale and Orcutt 1987; Salisbury and Ross 1992; Taiz and Zeiger 2008).

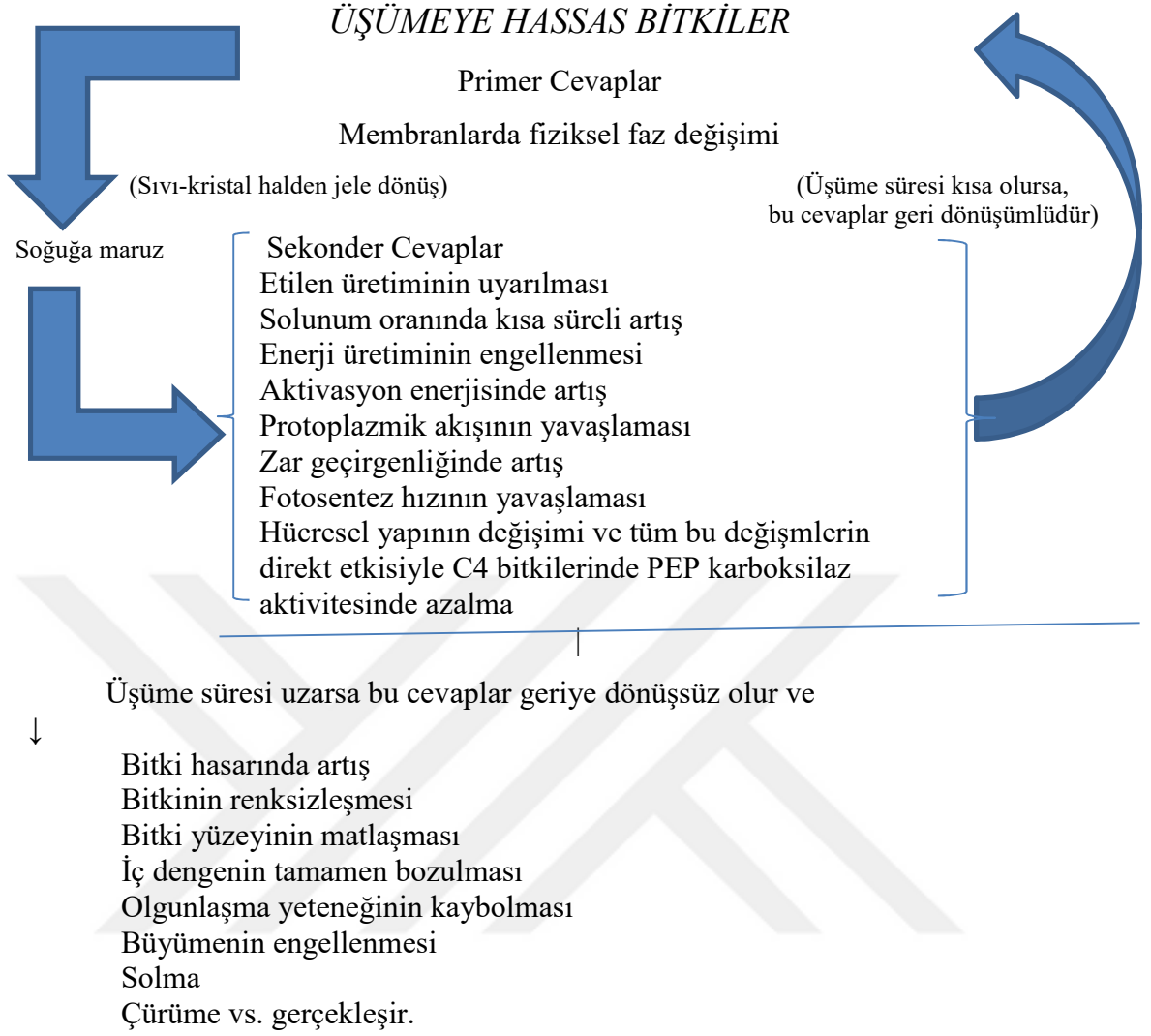
Dünya üzerindeki kullanılabilir tarım alanlarında oluşan stres faktörlerinin görülme sıklığına göre sıralandığında, kuraklık stresinin %26, mineral stresi %20 ve soğuk ve don stresinin ise %15 'lik bir alanda görüldüğü belirlenmiştir. Bunların dışında kalan diğer tüm stresler %29'luk bir alanda söz konusu iken, yalnızca %10'luk bir alanda herhangi bir çevresel stres görülmemektedir (Güler 2008).

Bitki gelişimini etkileyen en önemli abiyotik stres faktörlerinden biri de soğuk stresidir (Maestri *et al.* 2009). Ortam sıcaklığının suyun donma noktası olan sıfır dereceye indiği

durumlarda pekçok bitkide üşüme-donma hasarları ortaya çıkmaktadır. Bu hasarların ortaya çıkış derecesi soğğun şiddetine bağı olarak değıştiğı gibi,, bitkinin soğğa maruz kalma süresine, soğğa maruz kaldığı olgunluk safhasına, bitki yapısında bulunan çözülebilir şeker ile prolin içeriğine, bitki bünyesindeki büyümeyi düzenleyicilerin dengesine (Wang 1990) göre de değışebilmekte olup her bitkinin soğğa karşı direnç derecesi genetiğine bağı olarak farklılık göstermektedir (Hale and Orcutt 1987; Urrutia *et al.* 1992; Griffith *et al.* 1992; Hon *et al.* 1995; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşğın 2004)

Dünyanın tüm bölgelerinde bulunan bitkilerin, gelişim ve büyüme göstermeleri için ortam sıcaklığının optimum şartlarda olması gerekmektedir. Optimum sıcaklık değıerinin 1-2 derece altında olması bile bitkiyi üşüme stresine sokabilmektedir (Mahajan and Tuteja, 2005). Soğuk stresine maruz kalan bitkide zar yapısında anormallikler görölmekte, gelişimini tam olarak tamamlayamamakta, fotosentez oranı düşmekte ve hatta hasat sonrası depolama süresi azalma göstermektedir (Morsy *et al.* 2007; Bertamini *et al.* 2007).

Bitkiler, ani sıcaklık değışimleri (don olayı) olmadığı sürece soğuk şoklarına maruz kalmazlar. Doğada sıcaklık ekseriyetle kademli olarak azalır ki bu tedrici azalış bitkilerde soğuk aklimasyonu denilen “soğğa alışma, uyum sağlama” süreçlerinin gerçekleşmesine imkân tanır. Bu süreç içerisinde bitki azalan sıcaklığı hissederek sahip olduğu genetik özellikleri kullanarak sıcaklık azalmasına tepki oluşturmaya çalışır. Bu tepkiye soğuk aklimasyonu adı verilir. Dirençli bitkiler için pek önemli olmadığı halde, bu aklimasyon sürecine özellikle soğğa hassas olan bitkiler ihtiyaç duyar. Hassas bitkiler için aklimasyonun süresi bile çok önemlidir. Bu süre yeterli olmazsa, soğğa direnç için gerekli metabolik faaliyetlerin tamamlanması mümkün olmadığından, bitkide aşağıdaki şekilde (Şekil 1) belirtilen semptomların ortaya çıkması kaçınılmaz olur (Dumlupınar, 2000).

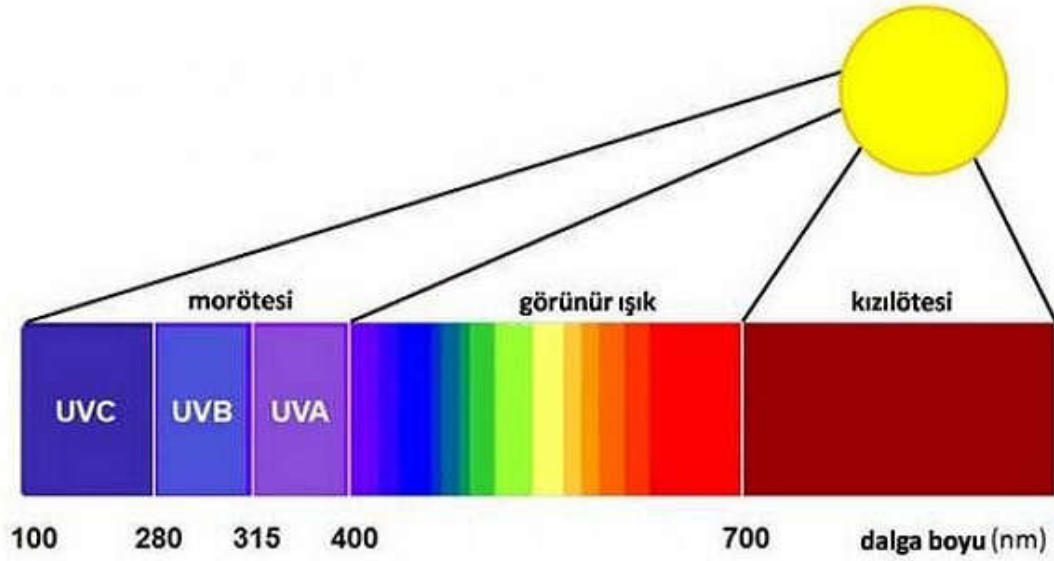


Şekil 1. Soğuğa hassas bitkilerin üşüme sıcaklıklarına verdiği fizyolojik ve biyokimyasal cevaplar (Wang 1982).

Dünyayı çevreleyerek canlıların yaşamlarını devam ettirmesini sağlayan atmosferin, insan aktivitesiyle oluşan çeşitli kimyasallar sebebiyle doğal yapısında bozulmalar ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucu atmosferdeki ozon tabakası her on yılda %3 oranında incelmektedir. Ozon tabakasının incilmesiyle güneşten yayılan ultraviyole ışınlarının yeryüzüne ulaşma oranı artmaktadır. Ozon tabakasındaki bu olumsuz değişimi, doğal dengeyi, ekosistemleri ve neticede insanı da etkilemektedir (Blaustein 2001; Kenar ve Ketenoğlu 2009).

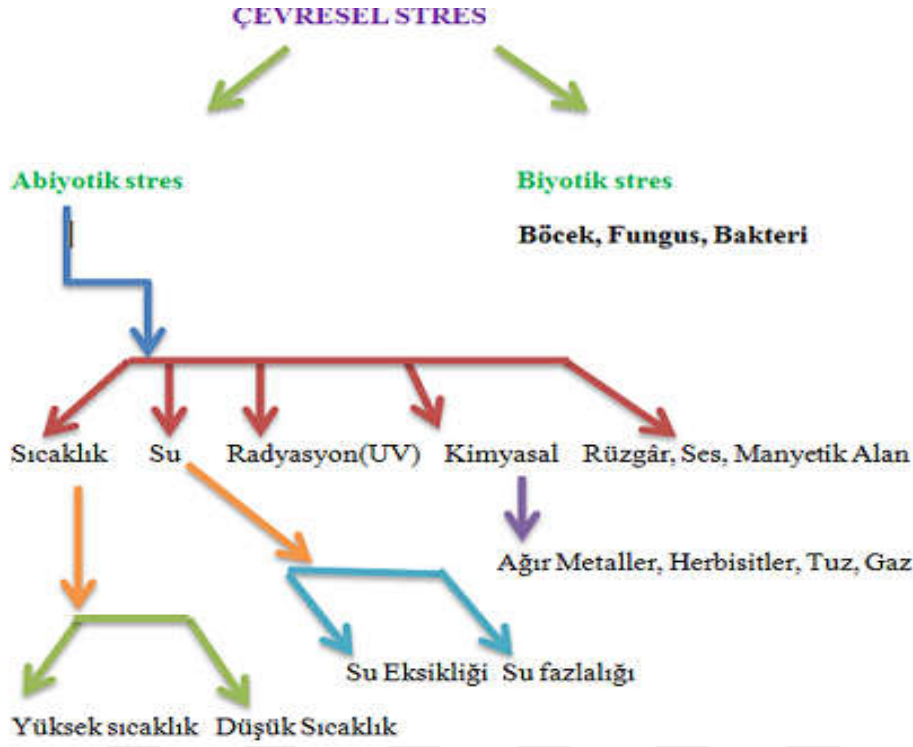
Ozon tabakasının incilmesiyle birlikte bitkiler için zararlı olan UV-B (280 – 320 nm) ışınları yeryüzüne daha fazla gelmektedir. UV-B, bitkilerde büyüme, gelişme ve fotosentezde anormalliklere, DNA, protein ve zarlar üzerinde ise hasarlara yol açmaktadır (Correia *et al.* 1999; Laposi *et al.* 2009).

UV-B radyasyonu duyarlılığı ya da direnci, bitki türleri arasında farklılık göstermekte, hatta aynı türler arasında bile oldukça farklı olduğu bildirilmektedir. UV-B radyasyonu bitkilerin morfolojisini ve anatomisini etkilemektedir (Yao and Liu 2007).



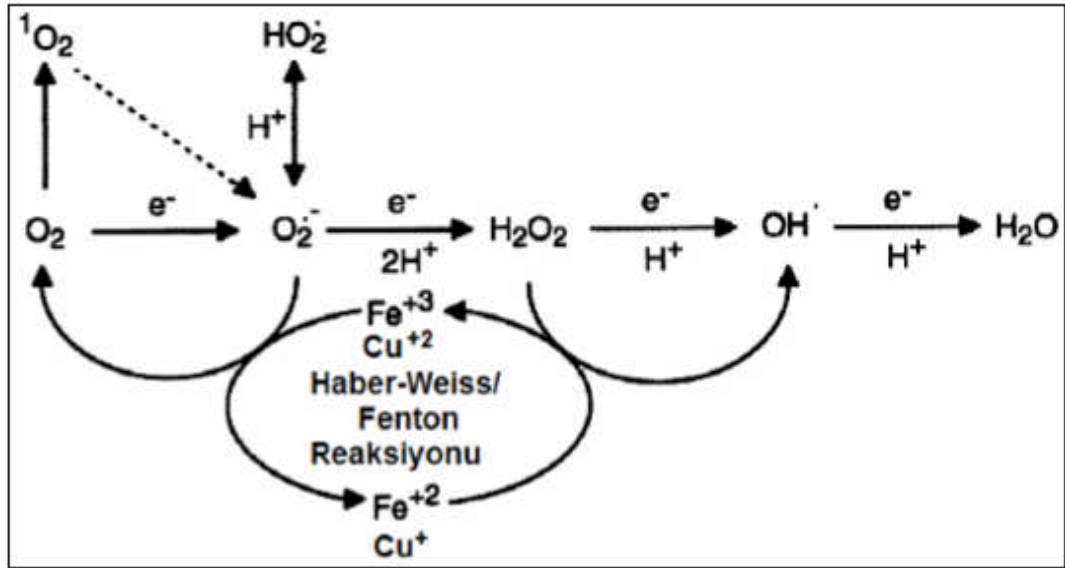
Şekil 2. Işık dalga boyları

Stres faktörleri, çeşitli zararlar meydana getirmek suretiyle bitki yapısında gerçekleşmekte olan biyolojik fonksiyonlarının bozulmasına ya da aksamasına sebep olarak, onların büyüme, gelişme yönünden genetik potansiyellerine ulaşmalarını engellerler. Biyotik (otobur aktiviteler, rekabet, patojenler vb.) ve abiyotik (düşük ve yüksek sıcaklık, tuzluluk, kuraklık vb.) faktörler olmak üzere iki gruba ayrılan stres faktörleri, büyüme ve gelişmenin yanı sıra ürün verimliliği oranlarında da önemli düşüşlere neden olurlar (Gorovitz and Czosnek 2007). Bu sorunun çözümüne yönelik olarak, bitki verimini azaltan abiyotik faktörleri konu alan çalışmaların sayısı her geçen gün artmakta olup bitkilerde strese sebep olan biyotik ve abiyotik faktörler Şekil 3’de özetlenmiştir:



Şekil 3. Bitkilerde stres oluşturan faktörler.

Strese maruz kalan tüm bitkilerde hücrel redoks dengesi bozularak oksidatif hasara ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) fazla miktarda üretilmesine neden olurlar (Bolwell *et al.* 2002; Mittler *et al.* 2002; Asada 2006). ROT molekülleri yüksek enerjili, çok kararsız ve toksik maddelerdir. Oksidatif strese maruz kalan bitkilerde, ROT'lar bitki hücresinin kloroplast, mitokondri ve sitoplazma gibi farklı kısımlarında meydana gelerek hücrede özellikle zar lipid ve proteinler, klorofil ve DNA gibi önemli hücre bileşenlerinin yapılarının bozulmasına sebep olurlar. Bitkiler bu maddelerin zararlarından korunmak için antioksidan savunma mekanizmasını harekete geçirirler (Asada 2006; Siddiqui *et al.* 2010). Bu oksidantlar arasında en önemlilerinden biri atmosferik oksijen (O_2)'den oluşan kararsız ve toksik olan radikallerdir: süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) ve singlet oksijen (1O_2)'dir (Alscher *et al.* 1997). Şekil 4'de bu radikallerin oluşumu şematize edilmiştir.



Şekil 4. Atmosferik oksijenden reaktif oksijen türlerinin oluşumu (Alscher *et al.* 1997).

Hücrelerde vuku bulan fizyolojik olayların süreklilik veya dengesini bozan ve biyosentez reaksiyonlarının aksamasına sebebiyet veren düşük sıcaklıklar, bitkilerde hücre seviyesinde geri dönüşümlü (primer etkiler) ve geri dönüşümsüz hasarların (sekonder etkiler) ortaya çıkmasına yol açarlar (Turan ve Ekmekçi 2008). Primer değişimler, sıcaklığın normal şartlara yükselmesi sonucunda geri dönüşümlüdür ve oluşan hasarlar bertaraf edilebilir. Sekonder etkiler ise, birincil hasarlar oluşuktan sonra stresin devamı halinde ortaya çıkan ve genel olarak geriye dönüşü olmayan değişimlerdir (Wang 1982; Turan ve Ekmekçi 2008). Düşük sıcaklığın hücresel seviyede ilk olumsuz primer etkisi, zarların sıvı-jel durumundan katı-jel durumuna geçişi ve bunun sonucu olarak da zarlarda kırılma-yarılmaların ortaya çıkışı şeklinde olur (Lyons and Raison 1970). Zarlarda meydana gelen bu hasarlar, dehidrasyon başta olmak üzere, tüm zar fonksiyonlarının bozulmasına neden olur. Düşük sıcaklıklar, membran bileşenlerinden özellikle lipidler üzerine etki gösterirler. Bu değişiklik, öncelikli olarak hücre ve organel membranlarında bulunan fosfolipidlerin oranındaki artış ile karakterize edilir. Sonrasında ise soğuk toleransının maksimum olduğu noktada, hücre zarında bulunan serebrosidlerin oranında azalma ile kendini gösterir (Uemura *et al.* 1995). Soğuk kaynaklı bu değişimler, hücre membranlarının bütünlüğünde bozulma, esnekliğinde ve akıcılığında azalma, geçirgenliğinde artma ve membrana bağlı enzimlerin aktivitelerinde azalmalar şeklindeki etkilerle kendini gösterir.

Soğuk hasarının neden olduğu fonksiyon kayıplarından biri de kökten su alımı ve transpirasyon arasındaki kurulmuş olan dengenin bozulması nedeniyle ortaya çıkan gövde dehidrasyonudur (Vernieri *et al.* 2001; Türk *et al.* 2014). Düşük sıcaklıklar, başta kloroplast ve

mitokondriler olmak üzere çeşitli hücresel organellerdeki metabolik faaliyetlerin de sekteye uğramasına neden olurlar.

BM Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'ne (2016) göre hızla artmakta olan dünya nüfusunun 2050 yılına kadar 9,7 milyar olması beklenmektedir. Yine artmakta olan nüfusun baskıları, iklim değişikliğinin olumsuz yansımaları gibi nedenlerden dolayı son 20 yılda tarıma elverişli arazilerin ciddi tehlike altında olduğu uyarısında bulunulmuştur (FAO 2018). Artan insan nüfusuna karşın, orman, bitkisel ve hayvansal üretim yapılan alanların yerleşime açılmasından dolayı giderek azalmakta olması, yine küresel ısınmadan kaynaklı dengesiz iklimsel olayların sıkça ortaya çıkışı, ozon tabakasındaki hasarın artışı, çevre kirliliği gibi etkenlerden dolayı mevcut tarım alanlarındaki verimin de tehdit altında bulunması nedeniyle, insanlığın yakın bir gelecekte besin kıtlığıyla karşı karşıya kalabileceğini öngörmek mümkündür. Yaklaşan bu kıtlık tehlikesi nedeniyle, bilim dünyasının konuyla ilgili branşlarında, tarım alanlarında bitkilerin yetiştirilmesi sırasında ortaya çıkabilecek ani iklimsel değişikliklere karşı dışarıdan müdahalelerle bitkileri koruyabilmek veya çevresel faktörlerin değişimlerine daha dirençli bitki varyetelerinin klasik seleksiyon, ıslah ve yine biyoteknolojik yöntemlerle elde edilmesi, birim alandan maksimum verim alabilmek için hibrit varyetelerin oluşturulması, sulama ve gübreleme tekniklerinin ve tarımda mekanizasyonun geliştirilmesi gibi alanlarda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Tüm bu bilimsel çevrelerin temel gayesi, olması kuvvetle muhtemel besin kıtlığına karşı insanlığın geleceğini koruma altına almaya çalışmaktır.

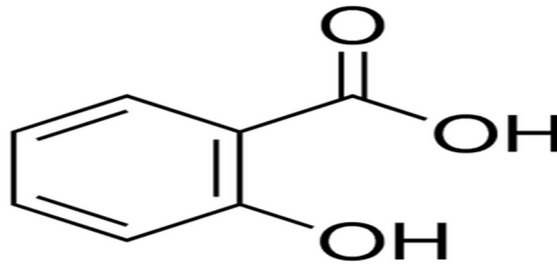
İşte biz de bu çalışmada, fasulye bitkisine üşümeye karşı direnç kazandırabilmek amacıyla, bazı sinyal bileşikler olarak Salisilik asit (SA), Absisik asit (ABA), Progesteron (PRO), Östrojen (ÖS) ve bitkiye hafif ön stres oluşturabilecek düzeyi belirlenmiş olan Ultraviyole B (UV-B) ışığını tek tek ve kombinasyonlarıyla birlikte fasulye bitkisine uyguladıktan sonra, bitkileri kontrollü üşüme sıcaklıklarına maruz bırakıp, sonrasında strese dirençle ilişkili fizyolojik ve biyokimyasal parametrelere analiz ederek, fasulye bitkisinin yapılan bu uygulamalarla üşümeye karşı direncinde artış olup olmadığını test etmeye çalıştık.

Bitki Hormonları

Salisilik Asit (SA)

Yüzyıllardır yaprak ve kabuklarının ağrı ve ateşe iyi geldiği bilinmekte olan söğüt (*Salix*) ağacından adını alan ve bitki fenolik bileşiklerinden olan bir maddedir. 1828 yılında Almanya'da Johann Buchner isimli araştırmacı söğüt ağacı kabuklarından salisin izole etmiş, salisilik asit adı ilk olarak 1838 yılında Raffaele Piria adlı araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Salisilik asidin ticari olarak üretimi 'Aspirin' ismiyle Almanya'da gerçekleşmiştir. Son yıllarda

salisilik asidin bitkiler üzerindeki etkisine yönelik yapılan çalışmalarda, bitki büyümesinin düzenlenmesinde ve gelişiminde oldukça etkili olduğu ortaya konmuştur. Salisilik asit bitkinin tüm organlarında bulunmaktadır ve dışarıdan uygulandığı yerden floem yoluyla farklı organlara taşınmaktadır (Raskin 1992a,b; Kocaçalışkan 2004; Mutlu 2005). Kimyasal formülü $C_7H_6O_3$, erime noktası $159\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'dir. Suda az çözünür ve pH'sı 2,4'tür. Şekil 5'te salisilik asidin kimyasal yapısı gösterilmektedir.



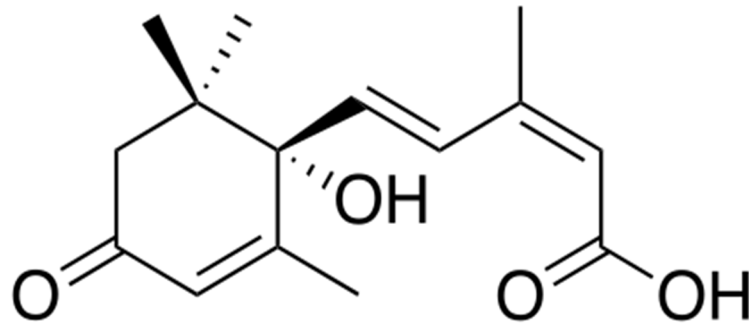
Şekil 5. Salisilik asidin kimyasal yapısı

SA'nın ultraviyole ışığı, kuraklık, soğuk ve tuz stresi gibi birçok abiyotik strese ve patojen gibi biyotik strese karşı bitkiyi koruduğu bulunmuştur (Taşğın *et al.* 2003; Ananieva *et al.* 2004; Sakhabutdinova *et al.* 2004; Mutlu *et al.* 2009). SA'nın elmalarda etilen sentezini durdurduğu, fasulyede dane verimini ve köklenmeyi arttırdığı, fotosentezi hızlandırdığı bilinmektedir (Ramanujam *et al.* 1998; Romani *et al.* 1989; Hayat vd. 2007) SA soğuk şartlar altındaki bitkilere dışarıdan uygulamasıyla, direk veya dolaylı olarak antioksidan enzim aktivitelerini değiştirebilmektedir (Taşğın *et al.* 2006; Baktır 2010; Algül vd. 2016). SA'nın antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi, H_2O_2 metabolizmasını düzenlediğini öne sürülmüştür (Janda *et al.* 2003). SA, zayıf bir deterjan özelliği gösterdiği ve hücre yüzeyinin elektrik yükünü değiştirdiğinden, hücre içerisindeki bazı antioksidan enzimlerin hücre dışına salgılanmasında rol oynadığı yönünde görüşler de bulunmaktadır (Minibaeva and Gordon 2003). Ancak, SA'nın yukarıda belirtilen pek çok fizyolojik ve biyokimyasal etkilerine rağmen, içsel SA'nın bu mekanizmadaki düzenleyici rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Taşğın *et al.* 2006).

Absisik Asit (ABA)

1950 ve 1960'lı yıllarda absisyon ve dormansi çalışmaları hormonal bir bitki büyüme engelleyicisinin varlığını ortaya koymuştur. 1963 yılında kimyasal yapısı pamuk meyve ve yapraklarında Addicott ve arkadaşları tarafından incelenmiş ve aynı yıl *Acer pseudoplatanus*'un (yalancı çınar yapraklı akçaağaç) ağacının tomurcuklarından Vareing tarafından izole edilip, kimyasal yapısı belirlenmiş ve sesquiterpen yapısındaki bu maddeye absisik asit (ABA) adı verilmiştir (Çetin 2002).

Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi düzenleyen hormonlardan biri olan absisik asit (ABA) büyüme teşvik eden giberellin ve oksinin aksine büyüme engeller (Morsünbül vd, 2010). Bitkilerin her organında bulunan ABA en çok yaşlı yaprakların mezofil dokusunda üretilir, köklerde ABA bulunmaz (Baktır 2010). Tomurcuk ve tohumlarda bulunarak dormansi halinin sürmesine yardımcı olmaktadır (Kumalay ve Eryiğit 2011). ABA konsantrasyonu çevre koşullarına ve strese bağlı olarak miktarı artarak, hemen yaprak sapı ve gövdeye taşınır (Algül vd. 2016). Böylece bitki kendini stres koşullarından korur. Şekil 6'da absisik asidin açık kimyasal formülü verilmiştir.



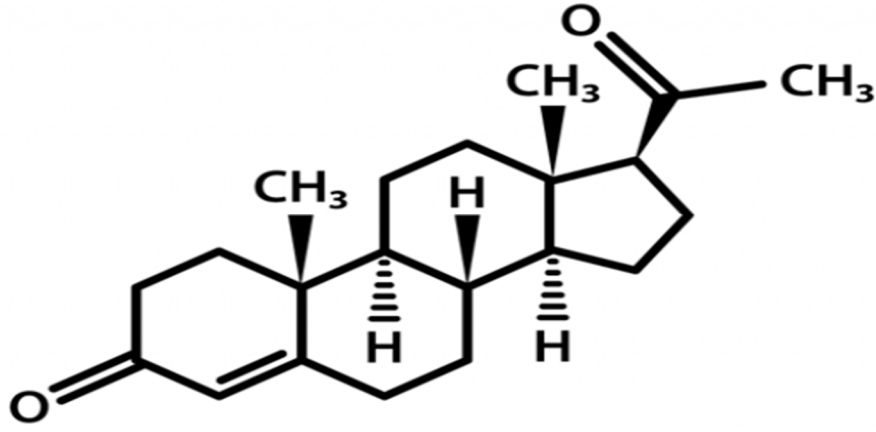
Şekil 6. Absisik asidin açık kimyasal yapısı

Memeli Cinsiyet Hormonları

Memeli cinsiyet hormonlarının bitkilerde var olduğu özellikle bitki generatif organlarında bulunduğu 1926 yılında tespit edilmiş olmasına rağmen henüz metabolizmaları ve etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır (Novak *et al.* 2008; Simerski *et al.* 2009). Bunun yanı sıra dışarıdan bitkilere verilen cinsiyet hormonları (östrojen, progesteron, androjen vb.) bitki kök gövde, kuru ağırlık, protein miktarlarında artış sağladığı belirlenmiştir (Erdal 2010; Janeczko *et al.* 2005). Bu çalışmada kullanılan cinsiyet hormonları progesteron ve östrojen steroid hormonlardandır.

Progesteron

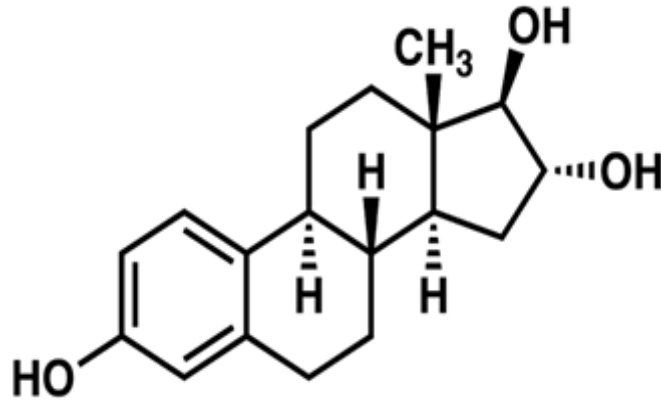
Progesteron, memeli cinsiyet hormonlarının (MCH) bir üyesidir. 21 karbon içeren steroid yapıda bir hormondur. $C_{21}H_{30}O_2$ kapalı formülüne sahip progesteron kolesterolden sentezlenir. Şekil 7'de genel yapısı gösterilmiştir. Bitkilerde doğal olarak bulunur ve bitki dokularındaki progesteron oldukça düşük düzeydedir. Bu nedenle, progesteronun bitkilerde hormonal bir yapıya sahip olduğu ve bitki hormonu adayı olduğu söylenebilir (Janeczko 2012) Progesteron içeren MCH'lerin çimlenmeden, bitkilerin çiçeklenmelerine kadar çeşitli yaşam evrelerinde uyarıcı etkileri ortaya konulmuştur (Martinez-Honduvilla *et al.* 1976; Dogra and Thukral 1991).



Şekil 7. Progesteronun genel yapısı

Östrojen

Kadınların adet döngüsünde ve diğer memeli hayvanların dişilerinde östrus döngüsünde önemli rol oynayan 18 karbonlu steroid hormonlardır. Östrojenler büyüme, farklılaşma ve işlevsel yönden hedef dokularda anahtar düzenleyici olarak görev yaparlar (Erdal 2010). Östrojenler hem erkek hem kadınlarda bulunmakla beraber, üreme yaşlarında kadınlarda seviyeleri çok daha yüksektir (Erdal 2010). Bu hormonlar kadınlarda göğüs gibi ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişimini sağlarlar ve adet döngüsüyle ilişkili olan endometrium kalınlaşması ve diğer süreçleri düzenlerler (Erdal 2010). Östradiol, östriol ve östron olmak üzere üç alt tipi bulunmaktadır. En etkin ovaryum östrojeni olan östradioldür. Sonra sırasıyla estriol ve en az etkili olan östrondur (Erdal 2010).



Şekil 8. Östrojenin genel yapısı

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Leguminosae (650 cins, 18000 tür) familyasının dünyada çok geniş bir yayılım alanına sahip bir üyesidir (Doğan 2006). Anavatanı Güney Amerika'dır ve ülkemize yaklaşık 250 yıl önce geldiği tahmin edilmektedir. Türkiye'nin hemen hemen her tarafında yetiştirilmesine karşın en çok Karadeniz bölgesinde yetiştirilir. Kuraklığa dayanıklı türleri bulunmakta ve 1000 m'den daha yükseklerde kolaylıkla yetişmektedir (Acar 1999; Uluocak 1984; Doğan 2006).

Kültür fasulyesinin yabani formu tam olarak bilinmemekle birlikte Meksika ve Orta Amerika'daki tek veya çok yıllık sarılıcı formların olduğu tahmin edilmektedir. Meksika'da çok eski yıllardan beri fasulye tarımının yapıldığı saptanmış ve Amerika'nın keşfiyle İspanyollar tarafından Avrupa'ya getirilmiş buradan da tüm dünyaya yayılmıştır. Ülkemizde fasulye tarımının diğer yemeklik baklagillerden sonra başladığı ve yaklaşık 200 yıldan beri kültürünün yapıldığı tahmin edilmektedir (Anlarsal 2005; Kaya 2011). Dünyada toplam fasulye üretim alanı 26 milyon hektar civarında olup. Fabaceae (Leguminosae) familyasında yer alan fasulye genellikle dikildiği yerdeki bir desteğe sarılarak büyüyen, tek veya çok yıllık türleri olan, otsu bir bitkidir.

Çeşitli stres şartlarına maruz kalan bitkilerde antioksidan enzimlerinde, kök gövde yapılarında, hücre ve moleküler yapılarında değişiklikler meydana gelir. Bu durumu ortadan kaldırmak veya stres etkisini azaltmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu bölümde bu çalışmaların bazıları özetlenmiştir.

Bitkilerde soğuk hasarının ilk etkilerinden biri, kök bölgesinden su alınımlı ve terleme arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanan gövdeden su kaybıdır (Vernieri *et al.* 2001). Bunun sonucunda, kökte olduğu gibi gövdede de büyüme hızı ve yaprak genişlikleri azalır. Daha şiddetli soğuk stresi ise hücresel otolizi ve senesensi artırır (Hund *et al.* 2008; Farooq *et al.* 2009).

Soğuk stresinin bitkiler üzerindeki en önemli etkilerinden biri LPO düzeyinin artmasıdır. Bu artışla birlikte hücre membran yapısı bozulmakta ve bununla beraber klorofil miktarı ciddi derecede düşmektedir (Mahajan and Tuteja 2005; Hu *et al.* 2006; Posmyk *et al.* 2009). UV stresine maruz kalan bitkiler de kök ve gövde uzunluğunun azaldığı, element miktarının değiştiği, tüy ve epidermal hücrelerinin yapısının bozulduğu gözlemlenmiştir (Çil 2006, Tossi *et al.* 2009; Berli *et al.* 2010).

UV B stresi ise uygulama süresi ve şiddetine bağlı olarak klorofil pigmentlerinde genel olarak bir değişime sebep olmazken, karotenoid miktarında artışa sebep olduğu bildirilmiştir (Tossi *et al.* 2009; Berli *et al.* 2010; Alaçık 2014).

Biyotik ve abiyotik strese maruz kaldığı zaman bitkiler çeşitli (Reaktif Oksijen Türleri (ROT) üretirler. Soğuk stresine maruz kalmış bitkilerde H_2O_2 , OH ve $O_2^{\cdot-}$ miktarları artmaktadır. Tüm hücreler için zararlı olan bu toksik maddeleri ortadan kaldırmak için bitki mitokondri, kloroplast ve peroksizomlarından SOD, CAT, POD ve APX gibi çeşitli antioksidan enzimleri üretilmektedir.

Aynı zamanda UV stresine maruz kalan bitkilerde de diğer stres şartlarına maruz kalındığı zamanki gibi ROT miktarlarında artış meydana gelmiş ve bunu baskılamak için antioksidan enzimlerin aktivitelerinde benzer şekilde artış olmuştur (Tossi *et al.* 2009; Berli *et al.* 2010; Szegény *et al.* 2016).

Şimdiye kadar yapılan tüm çalışmalarda çok çeşitli maddeler kullanılarak stresin oluşturduğu zararları en aza, indirmek istenmiştir. Bu amaçla kullanılan maddelerden bazıları bitki hormonlarından olan salisilik asit, absisik asit, hayvan cinsiyet hormonlarından progesteron ve östrojendir. Bu maddelerin farklı stres unsurlarına karşı uygulanması ve yararları kısaca özetlenmiştir.

Keshavaraz (2016) yaptıkları çalışmada soğuk şartlarda yetiştirdikleri ayçiçeği bitkisine stres etkisini azaltmak için salisilik asit uygulamış ve bu uygulamanın soğuk zararlı etkisini azalttığı rapor etmişlerdir. Taşğın (2006) SA uygulamasıyla soğuk şartlarında yetiştirilen buğday bitkisinin yapraklarında donma hasarının düştüğünü belirlemiştir. Benzer bir çalışma da arpa bitkisinde yapılmış ve soğuk stresinin arpa bitkisindeki etkinliğini azaltmak için salisilik asit uygulanmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Mutlu *et al.* 2016). Yapılan çalışmalar güncellenecek olursa sadece soğuk değil aynı zamanda diğer abiyotik ve biyotik streslerin etkisini azaltmak için kullanılan salisilik asit ROT miktarlarında bir azalışa ve iyileşmeye sebep olmaktadır (Miura and Tada 2014).

Bitki düzenleyici ve hormonlardan olan ABA farklı stres koşullarına çeşitli bitkilerde kullanılmıştır (Xuan *et al.* 2010).

Chen vd (2010) yaptıkları çalışmada model organizma olan *Arabidopsis* kullanmışlar ve bu çalışmanın sonucunda ABA'nın kök uzunluğu ve tohum büyüklüğünü artırdığını bulmuşlardır. Yine pirinç bitkisinde soğuk, kuraklık ve tuz stresine karşı ABA uygulanmış ve belirgin şekilde stresin etkilerinin azaltığı belirlenmiştir (Tao *et al.* 2010).

Dumlupınar (2000) fasulye bitkisinin soğuğa dayanıklılığı üzerine ABA'nın kök gövde uzunluğu, kuru ağırlık, protein ve prolin miktarının artırdığını bildirmiştir.

Sadece bitki hormonların iyileştirici gücü araştırılmamış aynı zamanda memeli cinsiyet hormonlarının da iyileştirici etkisi araştırılmıştır. Bunlardan bazıları;

Janeczko vd. (2002), in vitro şartlarda çiçeklenme için ışık veya soğuğa ihtiyaç duyan *Arabidopsis thaliana* ve *Triticum aestivum* bitkilerinde östrojenlerin çiçeklenmeyi uyardığını bildirmişlerdir.

Dogra and Kaur (1994) çimlenen buğday tohumlarının bazı büyüme ve biyokimyasal parametreleri üzerine östrojen, progesteronun etkisini araştırmışlar ve bu hormonların kök ve

gövde uzunluğu, kök ve gövde kuru ağırlıkları, kök sayısı ve çimlenme yüzdesi gibi morfolojik parametreleri uyardıklarını, ayrıca protein içeriği, α -amilaz, peroksidaz ve katalaz aktivitelerini de arttırdıklarını rapor etmişlerdir. Ayrıca bu araştırmacılar, uygulanan memeli cinsiyet hormonlarının düşük konsantrasyonlarda (10^{-6} ve 10^{-8} M) yüksek konsantrasyonlara oranla daha iyi sonuç verdiklerini rapor etmişlerdir. Yine bazı araştırmacılar, bitkilerin cinsiyetinin belirlenmesi olayında bu hormonların etkili olabileceğini öne sürmüşlerdir (Tamindzic and Jo Ann Banks 2004).

Başka bir çalışmada ise buğday bitkisinde kuraklık stresine karşı progesteron uygulanmış ve klorofil içeriğinin arttığı belirlenmiştir (Janeczko *et al.* 2015).

Bu çalışmanın amacı; Türkiye’de ve dünyada tarımı yapılan fasulye bitkisinin soğuğa direncine katkı sağlayabileceği varsayılan bazı bitki sinyal bileşiklerinin ve soğuğa aklimasyon sağlayabilmek için hafif ön stres faktörü olabileceğini tahmin ettiğimiz UV-B ışınlarını, bitkileri üşüme sıcaklıklarına maruz bırakmadan önce uygulamak suretiyle soğuk stresine karşı direnç sağlamada etkili olup olmadıklarını görmek ve strese dirençle alakalı fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerle bulduğumuz sonuçları analiz edebilmektir. Aynı zamanda bu söz konusu sinyal ajanları ve UV-B ışınlarını kombinasyonlu olarak uygulayarak sinergistik etki gösterip göstermediklerini test edebilmektir.

KURAMSAL TEMELLER

Reaktif Oksijen Türleri

Moleküler oksijen, yaklaşık 2,7 milyar yıl önce Dünya'nın erken indirgen atmosferine O₂ üreten fotosentetik organizmalar tarafından salındı ve bunun bir sonucu olarak istenmeyen yan ürünler yani reaktif oksijen türlerinin (ROT) ortaya çıkmasına neden oldu. Bir serbest radikal, bir atomik orbitalde eşleşmemiş bir elektron içeren, bağımsız olarak var olabilen herhangi bir moleküler tür olarak tanımlanabilir. Eşlenmemiş bir elektronun varlığı, çoğu radikal tarafından paylaşılan belirli ortak özelliklerle sonuçlanır. Birçok radikal kararsız ve oldukça reaktiftir. Diğer moleküllere elektron verebilir veya diğer moleküllerden elektron alabilirler, bu nedenle oksidan veya indirgeyici gibi davranırlar. Birçok hastalık durumunda en önemli oksijen içeren serbest radikaller, hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, tekli oksijen, hipoklorit, nitrik oksit radikali ve peroksinitrit radikalidir. Bunlar, DNA, proteinler, karbohidratlar ve lipidler gibi biyolojik olarak ilgili moleküllere zarar verme yeteneğine sahip, çekirdekte ve hücre zarlarında oldukça reaktif türlerdir. Serbest radikaller, hücre hasarına ve homeostatik bozulmaya yol açan önemli makro moleküllere saldırır. Serbest radikallerin hedefleri dokulardaki her türlü molekülü içerir. Bunlar arasında lipidler, nükleik asitler ve proteinler başlıca hedeflerdir.

Eşlenmemiş elektrona sahip moleküllerin molekül büyüklükleri az olmakla birlikte ömürleri kısa ve kararsız olan ROT'lar diğer moleküller ile etkileşmeye girdikten sonra bu moleküllerden bir elektron almış olurlar ve bazen elektronu onlara vermiş olurlar. Diğer moleküllerle etkileştiğinde kolay bir şekilde elektron alışverişine girerler ve onların yapılarını bozarlar. Bu moleküller 2 grupta incelenebilir.

Radikal olanlar: Bunların bir elektronu eksik olmasına rağmen, diğer moleküller ile kolay bir şekilde elektron alışverişine girerek oksidasyon yaparlar. Örnek olarak süperoksit anyonu (O₂⁻.) ve hidroksil radikali (•OH) verilebilir.

Radikal olmayanlar: Bu moleküllerin eksik elektron ihtiyacı olmamasına rağmen, diğer molekülleri ile önceki gruba göre çok zayıf halde oksidasyona girerler. Örnek olarak; H₂O₂ ve Singlet Oksijen (¹O₂) gibi (Genişel 2010).

Singlet Oksijen (¹O₂)

Foyer vd. (1997) ve Güler (2008) araştırmalarına göre bu molekül yüksek enerjiye sahip ve radikal özelliği bulunmayan bir moleküldür. Ancak güçlü bir oksidandır. Bitkilerde üretimi genellikle fotokimyasal olup asıl kaynağı fotosentezde görev alan klorofil pigmentidir.

$^1\text{O}_2$ içerdği yüksek enerjiyi transfer ederek, kovalent tepkimelere girerek diğer moleküllerin yapısını değiştirir. Singlet Oksijen karbon-karbon çift bağları ile tepkimeye girer. $^1\text{O}_2$ çoklu moleküller ile tepkimeye girdiğinde büyük seviyede yıkıcıdır ve canlılarda hasara neden olan oksijen türlerindendir (Cadenas 1989; Durmuş 2003). Çift bağlı olan yağ asitleri ile reaksiyona girer ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretir ve etkili halde lipidlerin peroksidasyonu başlatabilir (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003). Gechev vd. 2002; Minibaeva ve Gordon 2003 çalışmalarına göre hücrelerde membranların glikolipidler, fosfolipidler, steroller ve gliseridler yapısındaki çift bağlı olan yağ asitleri ile tepkimeye girer ve sonuçta peroksitler, aldehitler, hidroksi yağ asitlerine benzer lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumunu sağlarlar (Minibaeva and Gordon 2003).

Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Canlı organizmalarda olan ve moleküler oksijenin bir elektron alınması sonucunda indirgenir ve bu anyon oluşur. Bu radikal hem enzimatik yolla hem de enzimatik olmayan tepkimeler ile oluşabilir. Organizmalarda temel yeri üretmek için tilakoidlerin membranlarında yerleşen PSI' sistemi'dir. Mitokondrilerde elektron sızıntıları sırasında da üretilir. Alscher vd. (1997) çalışmalarına göre süperoksit anyonunu $^{\cdot}\text{OH}$ ve singlet oksijen oluşumunu başlatır. $\text{O}_2^{\cdot-}$ güçlü reaktiviteye sahiptir ve lipidler ile başka bileşiklerin oksidasyonuna da sebep olabilir. Fridovich (1995) ve Mutlu (2009) incelemelerine göre $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalın lipid peroksidasyonuna, hücre zarının bozulması, hücrelerde toksisite ve DNA'nın tek zincir kırıklarına neden olduğu gösterilmiştir. Delledone vd. (2001) ve Desikan vd. (2005) çalışmalarına göre bu radikal hücreye doğrudan zarar vermez. $\text{O}_2^{\cdot-}$ H_2O_2 ile tepkimeye girer ve organizma için çok daha zararlı bir molekül $^{\cdot}\text{OH}$ üretilmesinde etkili olur (Güler 2008; Mutlu 2009). Süperoksit radikali, kloroplastların elektron taşıma zinciri (ETS) ve bitki hücresinin diğer bölümlerinde elektron transfer sırasında O_2 'nin kısmi indirgenmesi üzerine üretilir. O_2 'nin süperoksit radikali üretmek üzere indirgenmesi, kloroplastların tilakoidlerinde lokalize olan siklik olmayan ETS'de gerçekleşir. Mitokondriyal ETS'de sitokrom c oksidaz, O_2 ile etkileşime girdiğinde normalde H_2O üretilir. Ancak O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ oluşturmak için sitokrom c dışındaki ETS bileşenleriyle de reaksiyona girebilir. Süperoksit anyonu bitki hücresinde oluşan ilk ROS'tur ve kısa bir yarılanma ömrü ile daha az reaktif olduğundan, bu nedenle kendi başına herhangi bir büyük hasara neden olmaz. Bunun yerine, her ikisi de membran lipid peroksidasyonuna neden olabilen $^{\cdot}\text{OH}$ ve $^1\text{O}_2$ gibi daha reaktif ve toksik formlara dönüşebilir (Alscher *et al.* 1997).

Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Orta derecede reaktif bir oksijen türü olan hidrojen peroksit, O₂^{•-}'nin tek değerli indirgenmesi veya protonlanmasıyla üretilir. Düşük pH koşulları altında veya çoğunlukla SOD tarafından katalize edilen bir reaksiyon ile H₂O₂'ye dismute edilerek enzimatik olmayan bir şekilde de meydana gelebilir (Hagar *et al.* 1996). H₂O₂, proteinlerin denatürasyonuna, DNA'da kırılmalara, ve kloroplastlarda tiol grubu içeren enzimlerin aktivitesinin inhibe edilmesine neden olur ve bitki hücrelerinde oldukça toksik bir maddedir (Slezak *et al.* 2007). O₂^{•-}'lerin üretildiği yerlerde yani peroksizom organelinde, mitokondrilerde elektron sızıntılarında, hücre zarlarında ve ekstraselüler matriks'de fazla miktarlarda H₂O₂ de meydana gelir. Öte yandan peroksizomlarda foto solunum esnasında da üretilebildiği Mittler vd. (2004) tarafından belirlenmiştir. Bu molekülün büyüklüğünden dolayı difüzyon halinde taşınır. Bir taraftan güçsüz asittir ve diğer taraftan büyük bir oksidasyon özelliği vardır. Eşlenmemiş elektron bu molekülde olmadığından dolayı radikal olmayan özelliğinde bir maddedir. Bitkilerde özellikle Calvin döngüsü enzimleri, CuMg-SOD ile Fe-SOD enzimleri, H₂O₂ tarafından inaktive edilmektedir (Halliwell 2006; Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003; Mutlu 2009).

Hidroksil radikali (•OH)

Serbest radikallerle kıyaslandığında çok yüksek hasar potansiyeline sahip oksidan maddedir, iyonlaştırma etkisiyle su moleküllerinin bozunması sonunda oluşabilir (Mutlu 2009). Hücredeki tüm biyolojik maddelerle reaksiyona giren, fazla üretildiğinde hücre ölümüne sebep olan en reaktif ve toksik radikaldir (2003; Halliwell 2006; Mittler 2006). Nötr pH'ta Fe (Fe²⁺, Fe³⁺) gibi geçiş metalleri tarafından katalize edilen H₂O₂ ve O₂^{•-} arasındaki Fenton reaksiyonu ile üretilir. DNA, proteinler ve lipidler gibi biyomoleküllerle etkileşme ve bunlara zarar verme potansiyeline sahiptir. Bu son derece toksik ROS'u temizlemek için herhangi bir enzimatik sistem yoktur; bu nedenle, artan birikimi hücre ölümüne yol açar.

Lipid Peroksidasyonu

Lipidlerin peroksidasyonları, hem hücrenin hem de organellerin memberanlardaki fosfolipidlerin aşırı poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı bilinmektedir sonuçta hasara neden olur ve hasarları geri dönüşsüzdür (Akkus 1995). Kararlı olmayan lipid radikalının O₂ ile reaksiyona girerek ve sonuç olarak lipidlerin peroksitleşmiş radikalleri üretilir (Spiteller 2001; Kuru 2007; Erdal 2010). İkidenden fazla çift bağları olan yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehid (MDA) üretilir (Yılmaz ve Ozan 2003). Bu bileşiğin içsel seviyesini ölçmek için tiyobarbitürik asit kullanılmaktadır (Yılmaz ve Ozan 2003; Kuru 2007; Erdal 2010).

Antioksidan Enzimler

Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (E.C.1.15.1.1) metalloenzim ailesine aittir ve evrensel olarak tüm aerobik organizmalarda bulunur. Stres koşulları altında, SOD hayati bir rol oynar ve ROS kaynaklı hasarlara karşı birincil savunma hattını oluşturur (Alscher and Hess 1993).



Süperoksit dismutaz enzimi ROT'ların parçalanmasında belli bir rolü olduğu belirlenmiş, antioksidan savunmanın ilk savunma zincirini oluşturur (Moller 2001). Süperoksit dismutaz enzimi bütün canlılarda ve tüm hücre alt yapısında olan kendi aktivitesini çeşitli streslere tepki şeklinde arttırdığı ve bu artışların strese için direnç kazanma olduğu keşfedilmiştir (Bowler *et al.* 1991; Van Camp *et al.* 1994; Foyer *et al.* 1997; Apel and Hirt 2004; Turk *et al.* 2014). Süperoksit dismutaz enziminin üç izoenzimi bulunur. Bu enzimler; (Cu/ZnSOD), (MnSOD) ve (Fe SOD) dir. Süperoksit dismutaz enziminin bu üç formu KCN ve H₂O₂'ye duyarlılıklarına göre farklılık gösterirler (Scandalios 1993; Bowler *et al.* 1994; Allen 1995). Onlardan MnSOD KCN ve H₂O₂'ye dirençli olup ve tüm hücrelerin mitokondrilerinde görülür. Cu/Zn SOD KCN ve H₂O₂'ye duyarlıdır ve yüksek bitkilerin sitozol ve kloroplastlarının içinde bulunurlar. Önceki SOD çeşiti olan, hidrojen peroksit duyarlıyken, potasyum siyanide direnç kazanmıştır (Bowler *et al.* 1992; Güler 2008). Öte yandan FeSOD, homodimer şeklindedir (Alscher ve Erturk 2002). Süperoksit dismutaz enziminin stres durumunda oluşan oksidatif hasara karşı tek başına güçlü olmadığı ileri sürülmüştür (Pitcher *et al.* 1991).

Guaiacol Peroksidaz (POD)

POD'lar (E.C.1.11.1.7) farklı biyolojik olaylarda önemli rolü olan büyük bir enzim grubu sayılır. Süperoksit dismutaz enzimi ve katalaz enzimi ile etki gösterirken ROT'ların parçalanmasında aktif etkisi olan HEM prostetik kısımlarına sahip bir enzimdir (Banci 1997; Kim *et al.* 2000). Peroksidazlar, hidrojen peroksitten yararlanarak fenoller ve hidrokinonlar benzer çok sayıda aromatik olan bileşenlerin hidrojen alımında katalitik rolleri vardır (Bergmeyer and Grabl 1983).

POD'ların fazla şekilde fizyolojik mekanizmalarda irtibatı olduğu ve hücre reaksiyonlarında önemli bir işlevi olduğu tanımlanmıştır (Durmus 2003). Stres şartlarındaki bitkilerde POD'ların etkinliklerinin arttığı ifade edilmiştir (Asada 1992, Erdal and Türk 2015,

Genisel *et al.* 2015). Peroksidaz enzimi, bitkilerin hücresi içinde en önemli antioksidan enzimlerindendir (Bakardjieva and Christov 1996). Molekül ağırlıkları 35-100 kDa arasında değişmektedir. POD'lar H₂O verirler ve çoklu organik ve inorganik maddeleri (BH₂) kullanıp hidrojen peroksiti aradan kaldırır.



Peroksidazlar diğer birçok metabolik süreçte de etkili olurlar. Mesela oksin metabolizması. POD enzimin aktivitesi, bir çok stres faktörlerinden büyük miktarda etkilenir, o yüzden POD enzimi, strese karşılaşılan bir enzim tanımlanır (Whetten *et al.* 1998; Jaleel *et al.* 2007; Mutlu 2005).

Katalaz (CAT)

CAT (E.C.1.11.1.6) enzimi oksijen kullanan tüm mikroroganizmalarda, omurgalı olanlarda, omurgalı olmayanlarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunur ve canlılarda çok yaygın dağılım gösterirler (Bergmeyer and Grabl 1983). Tek bir katalaz molekülü bir saniye içinde bir kaç milyon H₂O₂ moleküllerini katalizler.

CAT enzimi bitkisel dokularında hidrojen peroksitin temizlenmesinde önemli rolü olduğu ifade edilmiştir (Patykowski and Urbanek 2003). Katalaz enziminin esas işlevi, oksijen varlığında hücre reaksiyonlarının bazı yerlerinde sentezlenen, radikal özellikleri hidrojen peroksitn veya karboksil gruplarının özellikle hücre zarlarında oluşabilecek hasarlarını engellemektedir. Zira H₂O₂, ¹O₂ ve [•]OH radikallerinin bir güç mekanıdır (Scandalios 1993; Chaudiere and Ferrari 1999). Katalaz enzimi, mitokondirilerin elektron taşıma sızıntılarında oksijen az elektron alırken hidrojen peroksit üretilir (Chaudiere and Ferrari 1999).

(Kataliz eden Aktivitesi)



(Peroksidatif Aktivite)



Streb vd. (1993) araştırmalarında ifade etmiştir ki CAT enzimi nisbeten kararsız bir enzimdir. Işığın fazla olduğu ve strese maruz kalan bitkilerde oluşan hidrojen peroksitin yüksek konsantrasyonlarda olduğu durumlarda aktivitesi engellenebilir. CAT enziminin tek olduğu yer peroksizomlardır ve bir küçük miktarda mitokondrinin matriksinde bulunmamaktadır bu yüzden CAT enzimi nisbeten az etkinliğe sahiptir (Asada 1992; Scandalios 1993). Katalaz enziminin aktivitesinin artışında iki vitamin (E ve K) ve iki antioksidant madde (askorbik asit,

glutasyon) yararlanılır. Bunun nedeni kolay bir şekilde elektron almalarına rağmen (Keha and Küfrevioğlu 2000; Taşgın 2004).

Askorbat peroksidaz (APX)

Askorbat peroksidaz (E.C.1.1.1.11.1) askorbat-glutasyon (ASC-GSH) döngüsünün önemli bir bileşenidir ve sitozol ve kloroplastta üretilen H_2O_2 'yi ortadan kaldırır. APX, askorbik asiti indirgeyici bir ajan olarak kullanarak H_2O_2 'yi H_2O ve DHA'ya dönüştürür. Askorbat peroksidaz enzimi, iki molekül askorbattan yararlanarak H_2O_2 'yi suya dönüştüren antioksidan bir enzim olarak bilinmektedir (Noctor and Foyer 1998). Bu reaksiyon sonucunda askorbat iki molekül monodehidro askorbata (MDHA) dönüşür. MDHA mono dehidroaskorbat redüktaz tarafından tekrar askorbata dönüştürülür (Kumar *et al.* 2011). APX, glutasyon askorbat döngüsünün ayrılmaz bir bileşenidir (Noctor and Foyer 1998). APX'in bitki hücrelerinde tilakoid ve mikrozomal membranlara bağlı formlarda, sitoplazmada ve stromada çözülmüş formlarda ve apoplast da olmak üzere en az beş izoformu vardır (Yamaguchi 1995; Noctor and Foyer 1998). tAPX, gmAPX, sAPX, cAPX gibi izoformlardan üretilen APX ailesi, H_2O_2 'ye karşı CAT'a kıyasla daha yüksek bir afinitesi vardır. APX'in izoformları, elektron vericidirler ve askorbat olmadan çok kararsız olurlar (Miyake and Asada 1996). Sitoplazmadaki APX'ler, kloroplast APX'lerine benzerler (Ranieri *et al.* 1996; Van Acker *et al.* 1998; Güler 2008). APX'ler, genelde askorbata olan yüksek afiniteleri olduğundan dolayı guaiakol peroksidazlarla farkları belirlenmiştir (Nakano and Asada, 1987; Güler 2008).



Glutasyon (GSH)

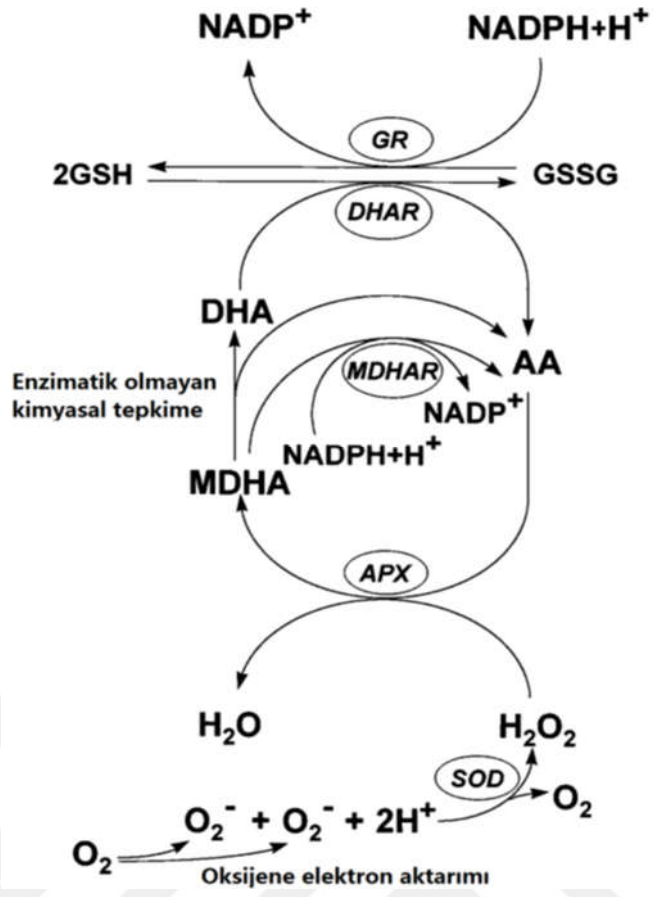
Glutasyon esasen düşük moleküler ağırlıklı bir tiyol tripeptittir (γ -glutamylcysteinyl-glycine) ve sitozol, kloroplastlar, endoplazmik retikulum, mitokondri, vakuoller, peroksizomlar ve apoplast gibi tüm hücresel bölmelerde geniş dağılıma sahiptir ve ROS'un neden olduğu oksidatif hasara karşı hücre içi savunmanın temelini oluşturur. ATP'ye bağlı iki adım, glutation sentezini belirler; ilk olarak, γ -glutamilsistein, glutamat-sistein ligaz (GCL) varlığında Cys ve Glu'dan sentezlenir ve ardından glutasyon sentetaz (GS), GSH'yi vermesi için Gly'ye γ -glutamilsistein yardımcı olur. GSH, hücre bölünmesi, hücre farklılaşması, hücre ölümü ve yaşlanması, patojen direnci, enzimatik aktivitenin düzenlenmesi, sülfat taşınmasının düzenlenmesi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, metabolitlerin konjugasyonu, proteinlerin ve nükleotitlerin sentezi, sentezi gibi kapsamlı biyolojik süreçlerde ayrılmaz bir rol oynar. Herschbach vd. (1994) ifadelerine göre GSH'nin rolü bitkilerin hücrelerinde sülfür

reaksiyonlarında büyük bir fizyolojik rolü olduğu ileri sürmüştür. Herschbach vd. 1994 GSH'nin, proteinsiz tiyol grupları içerirken diğer taraftan sülfür yıkımını düzenler. Diğer taraftan ağır metaller bitkiler tarafından kontrol geçerler (Grill *et al.* 1989; Rauser 1987; Scheller *et al.* 1987). GSH bitkilerde ve hayvanlarda redoks tamponu olarak ve antioksidan özeline sahip olan maddedir (Foyer and Halliwell 1976; Meister 1994). GSH, antioksidan fonksiyonu sayesinde, ROT'ların detoksifikasyonunda işlevi belirlenmiştir (Foyer *et al.* 1994; Creissen *et al.* 1996; Güler 2008). Başka bir görevi gen ekspresyon işlevinde rolü vardır (Dron *et al.* 1988; Wingate *et al.* 1988). Bitki hücrelerinin bölünmesinde redoks kontrolü olayında rolü belirlenmiştir (Sanchez-Fernandez *et al.* 1997; Shaul *et al.* 1996).

Askorbat (L-Askorbik Asit, C Vitamini)

Askorbik asit (AA), potansiyel olarak bir dizi enzimatik ve non-enzimatik ortamda elektron bağışlama yeteneğinden dolayı, artan ROS seviyesinden kaynaklanan oksidatif strese karşı önemli bir savunma rolü olan bol, güçlü, düşük moleküler ağırlıklı ve suda çözünür bir antioksidandır. Bitkilerin tümünde askorbat üretilebilir (Burns 1957). Hidroksil, süperoksit ve singlet oksijen radikallerine direkt olarak etki eden önemli bir primer antioksidan maddedir (Buettner and Jurkiewicz 1996). Fotosentezin basamaklarının dengede tutulması ve ışık hasarını önlemede etkilidir (Forti and Elli 1995). Bitki hücrelerinde antioksidan özelliği vardır. Enzimlerin aktivitelerinin korunmasında önemli rol oynar (Padh, 1990). Bunlara ilave olarak askorbat, önemli bir antioksidan olan α -tokofenollerin okside formlarını indirgeyen güçlü bir sekonder antioksidan olarak görev yapar (Padh, 1990).

Bitkilerde H_2O_2 'nin temizlenmesi için çok önem sağlayan substrat askorbattır (Mehlhorn *et al.* 1996; Nakano and Asada 1987). GSH, ona benzer askorbat masraflanmazlar (Noctor and Foyer 1998). (Şekil 9).



MATERYAL ve YÖNTEMLER

Kullanılan Kimyasallar ve Aletler

Soğutucu	: Arçelik
Dikey difriz (-20 °C)	: Siemens
Dikey difriz dondurucu (-80 °C)	: Thermo Scientific
Mini Elektroforez	: BIO-RAD
Dijital terazi (hassas)	: Shimadzu-AY220
Tüp karıştırıcısı	: Fisons Whirlimixer Cyclone Vortex Mixer
Manyetik karıştırıcı ve ısıtıcı	: Chiltern, model HS31
Masa üstü santrifüjü	: Hettich, model EBA-22
Otomatik pipetler	: Ependorf pipet
Dijital pH metre	: Mettler Toledo
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat, model CC1
Kuru blok inkübatörü	: Allsheng miniT-100
Su banyosu	: WiseBath Fuzzy Control Systemes
Soğutmalı masa santrifüjü	: Hettich Universal
Spektrofotometre	: Shimadzu UV-visible-1800
Mikroplate spektrofotometre	: Thermo, Scientific Multi Scan Go
UV-B lambası ve kabini	: TLD 15W/08 UVP

Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanma Koşulları

Çalışmalarımızda kullanılan kimyasallar Merk ve Sigma-Aldrich firmalarından satın alınmıştır. Kullanılan çözeltilerin yapılışı aşağıda verilmiştir.

- **Protein tayini:** 1 M KH_2PO_4 (pH 6,75) 3,4 gr KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülür. 1 M NaOH ile pH 6.5'a ayarlanır ve toplam hacim distile su ile 250 ml yapılır.
- **Protein tayini:** 15ml Bicinchoninic asit 0,3 ml CuSO_4 ile karıştırıldı (BCA reaktifi)
- **Antioksidan enzimlerin homojenizasyon çözeltisi:** 0,1 M K_2HPO_4 (pH 6,70), %1 PVP ve 1 mM EDTA (3,4 gr KH_2PO_4 200 ml deiyonize suda çözülmüş, Normalitesi bir olan sodyum hidroksit ile pH 6,7'ye ayarlanmış ve sonra toplam hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır. Bunun üzerine 2,45 gr PVP ile 0,75 gr EDTA sıra ile ilave edilmiştir.
- **Katalaz aktivitesi için tampon** 103,5 mM KH_2PO_4 , (pH 7,5) 1,42 gr KH_2PO_4 , yaklaşık 80 ml saf suda çözülmüş ve 1 M NaOH ile pH 7,5'e ayarladıktan sonra

çözelti hacmi distile su ile 100 ml yapılmıştır.

- **Katalaz aktivitesi için substrat çözeltisi:** (40 mM H_2O_2), %35 H_2O_2 çözeltisinde 346 µl alınıp son hacim saf su ile 100 ml yapılmıştır.
- **Katalaz aktivitesi için standart grafik:** (5 mM H_2O_2 çözeltisi) %35'lik H_2O_2 çözeltisinde 40 µl alınır ve son hacmi distile suyla 100 ml yapılmıştır.
- **SOD için gerekli tampon çözelti:** 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7,8) 1,7 gram KH_2PO_4 200 ml deiyonize suda çözülmüş, pH 7,8'e ayarlanmış ve son toplam hacim saf su ile 250 ml'ye ayarlanmıştır.
- **SOD aktivitesi reaksiyon karışımı:** (13 mM metionin, w/v), bunun için 0,586 gr metionin alınmış ve yukarıda SOD için verilen tampon çözelti içinde çözünerek son hacim 250 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.
- **SOD reaksiyon karışımı için:** (63 µM NBT), 0,0128 g NBT alınır ve yukarıda hazırlanan SOD tampon çözeltisi içinde çözünerek son hacim 250 ml yapılmıştır.
- **SOD reaksiyon karışımı için:** (0,1 mM EDTA), bunun için 0,073 g EDTA, SOD tampon çözeltisi içinde çözünerek son hacim 250 ml yapılmıştır.
- **SOD aktivitesi için 2. Çözelti:** (13 µM riboflavin), 0,019 gr Riboflavin alınıp, 500 ml distile suda çözdükten sonra 3 ml reaksiyon karışımı hazırlamak için 390 µL Riboflavin çözeltisi ilave edilerek hazırlandı.
- **Peroksidaz aktivitesi tampon çözeltisi:** 100 mM Na_2HPO_4 , (pH 5.5), 3,55 gr Na_2HPO_4 100 ml saf suda çözülmüş ve pH 5,5'e ayarlanmıştır. Son olarak toplam hacim saf su ile 250 ml yapılmıştır.
- **Peroksidaz aktivitesi substrat çözeltisi:** (5 mM guaiacol+5 mM H_2O_2), bunun için 54 m µl quaiacol ve 15 µl H_2O_2 (%35 ve d=1,13 gr/mol) yaklaşık 90 ml fosfat tamponunda (100 M, pH 5,5) çözülmüş ve son hacim aynı tamponla 100 ml yapılmıştır.
- **APX aktivitesi ölçümü için çözeltiler:** (50 mM KH_2PO_4), 0,17 gr potasyum fosfat çözüldürülmüş ve pH'sı 6,75 yapılmış, son hacim 250 ml'ye tamamlanmıştır. 0,225 gr askorbik asit (20 µM) ve 100 µl H_2O_2 (5mM) ve 0,0147 gr EDTA (0,2 mM) çözeltisi hazırlanmıştır.
- **Lipid peroksidasyonu homojenizasyon çözeltisi:** (%0,1 TCA), yaklaşık 80 ml deiyonize suya 0,1 gr TCA ilave edilip, son hacim 100 ml yapıldı.
- **Lipid peroksidasyonu reaksiyon çözeltisi:** (%0,5'lik TBA), 80 ml deiyonize suda 20 gr TCA çözülmüş, daha sonra içerisine %0,5 tiyobarbutirik asit ilave edilerek son hacim 100 ml yapıldı.
- **H_2O_2 tayini için:** (%0,1 lik TCA), 0,1 gr TCA yaklaşık 80 ml saf su da çözülerek hazırlanmıştır ve so hacmi 100 ml yapılmıştır (homojenizasyon çözeltisi).

- **H₂O₂ tayini için:** 10 mM KH₂PO₄: 0,136 gr potasyum 100 ml saf su içerisine ilave edilerek pH sı 7 ye ayarlanmıştır.
- **Fenolik madde tayini için:** (0,1 M KH₂PO₄ (pH 6,75), 3,4 gr KH₂PO₄ 200 ml deiyonize suda çözölmüş, 1 M NaOH ile pH6,75 ayarlanmış ve son hacim deiyonize suyla 250 ml tamamlanmıştır.
- **Fenolik madde tayini için:** (%20 lik Na₂CO₃ çözeltisi), bunun için 20 gr Na₂CO₃ 100 ml saf suda çözöndürölerek hazırlanmıştır.
- **Akrilamid/Bis-akrilamid (%30 akrilamid ve %2,7 Bis):** Bunun için 29,2 gr Akrilamid yaklaşık 80 ml saf suda çözönmüş ve üzerine 0,8 gr Bis eklendikten sonra son hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- **Ayırma jelinin tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8):** Bunun için 18,15 gr Tris-HCl 50 ml saf suda çözönmüş ve 1 M HCl ile pH 8,8 yapılmıştır. Sonra, saf su ile çözelti hacmi 100 ml yapılmıştır.
- **Yükleme tamponu için (0.5 M Tris-HCl, pH 6,8):** 6 gr Tris-HCl 80 ml saf suda çözöndürölrmüş, 1 M HCl ile pH 6,8'e ayarlanmış ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- **SDS (%10):** Bunun için 10 gr SDS yaklaşık 80 ml suda çözölmüş ve son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- **Elektroforez tank içi tamponu (0,025 M Tris-HCl, 0,192 M Glisin, %0,1 SDS, pH 6,8):** Bunun için 3 gr Tris-HCl, 1 gram SDS ve 14,4 gr Glisin alınmış, yaklaşık 900 ml saf suda çözöndölten sonra pH'sı 6,8'e ayarlanmıştır. Çözeltinin son hacmi saf su ile 1000 ml'ye ayarlanmıştır.
- **GR aktivitesi için:** (0,25 mM'lık NADPH) Bunu hazırlamak için 0,0022 gr NADPH yaklaşık 8 ml saf suda çözönmüş ve son hacmi 10 ml yapılmıştır.
- **GR aktivitesi için:** 1 mM oksitlenmiş glutatyon (GSSG), bunun için 0,0061 gr GSSG, 10 ml distile su içersinde iyice çözönmüştür.
- **GR aktivitesi için:** 0,5 mmol EDTA çözeltisi için, 0,0014 gr EDTA 10 ml deiyonize su içersinde çözöndürölrmüştür.
- **GR aktivitesi için:** 50 mM Tris-HCl çözeltisi için, 0,06 gr Tris, bir miktar saf su içersinde çözöndürölrmüş, sonra pH:7.8'e ayarlanmış ve son hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır.
- **NR ve NiR aktivitesi çözeltileri:** NR aktivitesinde kullanılan ekstraksiyon çözeltisi (100 mM Tris (pH 7,6), 7,5 mM sistein, %1 PVP, %0,5 BSA, 1 mM Na-EDTA ve 5 mM merkaptöetanol), bunun için 1,2 gr Tris-HCl yaklaşık 80 mL saf suda çözölür ve pH'sı 7,6'ya ayarlanır. Sonra bu çözeltiye 1 gr PVP, 0,037 gr Na-EDTA, 0,5 gr BSA, 0,09 gr sistein, 40 µL merkaptöetanol ilave edilmiş ve son hacim distile suyla 100

mL olacak şekilde ayarlanmıştır.

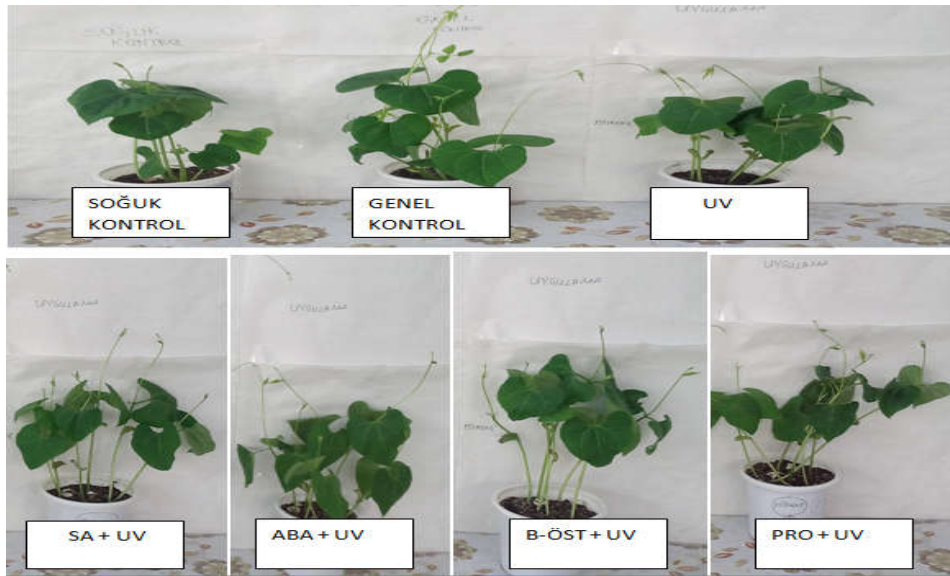
- **NR için aktivite tamponu:** Bunun için 0,272 gr KH_2PO_4 , 0,0074 gr Na-EDTA, 0,02 gr KNO_3 ve son olarak 4 mg NADH yaklaşık 15 ml distile suda çözülmüş ve son pH 7,8'e ayarlanmıştır. Çözeltinin son hacmi distile su ile 20 ml yapılmıştır.
- **1 M Baryum asetat:** Bunun için 5 gr baryum asetat'ın 15 ml saf suda çözüldükten sonra son hacmi 20 ml'ye tamamlanmıştır.
- **%1 Sülfanilamid:** Bunun için 1 gr sülfanilamid, 80 ml 2 N HCl içinde çözüldükten sonra son hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- **%0,02'lik N-1-Naftil Etilendiamin Dihidroklörür (NED):** Bunun için 0,04 gr N-1-Naftiletilendiamin dihidroklörür, 100 ml distile suda çözülmüş ve daha sonra son hacim 200 ml'ye tamamlanmıştır.
- **Glutaminsentaz aktivitesi çözeltileri:** Homojenizasyon çözeltisi (250 ml), bunun için 6 gr HEPES, 150 mL saf suda çözülmüş ve bunun üzerine 0,19 gr DTT, 18 μl merkaptoetanol, 0,07 gr EDTA ve 0,24 gr MgCl_2 ilave edildikten sonra, pH'sı 7,6'ya ayarlanmış ve son hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
- **Reaksiyon karışımı (100 ml):** Bunun için 12,15 gr Tris-HCl alındı ve yaklaşık 80 ml saf suda çözüldü, çözelti üzerine 0,5 gr ATP, 0,24 gr Sistein, 0,96 gr MgSO_4 , 0,55 gr hidroksilamin hidroklorür ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) ve son olarak 0,95 gr glutamat ilave edilmiş ve pH'sı 7,6'ya ayarlanmış ve son olarak çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- **%10'luk FeCl_3 Reaktifi (120 mL):** Bu çözelti için ayrı 3 çözelti hazırlanmıştır; 12 gr FeCl_3 alınır ve yaklaşık 30 ml 0,2 M HCl içinde çözüldürülmüş ve son hacmi 40 ml'ye tamamlanmıştır (çözelti 1). 28,8 gr TCA alınmıştır ve yaklaşık 30 ml saf su içinde çözüldürüldükten sonra hacmi 40 ml'ye tamamlanmıştır (çözelti 2). Son olarak 40 mL %5'lik HCl çözeltisi hazırlanmıştır (çözelti 3). Hazırlanan bu üç çözelti birbiriyle karıştırılmıştır yani (çözelti 1+ çözelti 2+ çözelti 3=120 ml olacak şekilde).

Yöntemler

Bitkilerin yetiştirilmesi

Bu araştırmada fasulye (*Phaseolus vulgaris* L., cv. Lunatus) bitkisi kullanılmıştır. Tohumlar %75'lik etil alkolde iyice yıkanmış ve peşine %5'lik sodyum hipoklorit (ticari çamaşır suyu) ile 5 dk sterilizasyon yapıldı. Steril edilen tohumlar, 3-5 kez çeşme suyuyla ve sonra 3-5 kez distile su ile yıkama işlemine tabi tutuldu. İyice temizlenen tohumlar distile su içerisinde 8 saat ön ıslatma işlemine tabi tutuldu. Daha sonra tohumlar çimlendirilmek amacıyla önce içerisine kurutma kâğıdı serilmiş plastik kaplara yerleştirilmiş ve ortamın nemlendirilmesi

için su ilavesi yapılmış ve 1 haftalık çimlenme ve büyüme peryodu boyunca hergün ortama saf su ilavesi yapılmıştır. Bu süre sonunda kapların içerisinde eşit büyüme gösteren fideler (bireyler arasındaki genetik farklılıkları minimize edebilmek amacıyla) seçilerek (ok küçük ve çok büyük olanlar alınmamıştır) hazırlanan kum dolu saksıların içerisine eşit sayılarda (10 fide/saksı) olacak şekilde ekim yapılmıştır. Müteakiben bitkiler, bir iklim kabininde normal şartlarında (24/20°C, 14/10 s foto periyod, 15,000 lüks, %70 nem) yetiştirilmiştir. Her saksıda bulunan fideler hasat edileceği güne kadar, hergün eşit miktarda su ile sulanmıştır. Bitkiler 11 ilave gün bu şartlarda büyütüldükten sonra saksılardaki bitkiler gruplara ayrılarak yapılacak uygulamaları gösterecek şekilde üzerleri etiketlenilmiştir. UV-B uygulaması řu şekilde yapılmıştır: Saksıların içerisindeki bitkiler UV-B lambası yerleştirilmiş özel bir kabinin içerisine konuldu ve 10 sn 20 W m⁻² boyunca UV-B ışığına maruz bırakıldıktan sonra UV-B ışığı kapatılarak 1 dk beklendikten sonra bu işlem 3 kez daha tekrar edilerek UV uygulaması sonlandırıldı. Aynı zaman diliminde hazırlanan bitki hormonları salisilik asit (SA) 10⁻⁴ M, absisik asit (ABA) 10⁻⁴ M, memeli cinsiyet hormonları östrojen (S) 10⁻⁶ M, progesteron (PRO) 10⁻⁹ M olacak şekilde bitkilere püskürtmeli olarak yapraklarına (50 ml sinyal bileşiği/saksı) uygulanmıştır. Tüm bu uygulamalar sonrasında bitkiler, iklim odasına taşınmış sıcaklık tedricen düşecek şekilde 14 saat boyunca ışık, 9 °C ve 10 saat boyunca karanlık, 5°C'olacak şekilde sıcaklık ayarlanmıştır. Belirlenen konsantrasyonlar, n çalışmalar yapılmış ve soğuk uygulamasından sonraki kök gövde uzunluğu, protein miktarındaki artışa ve MDA içeriklerine bakılarak seçilmiştir (şekil 10).



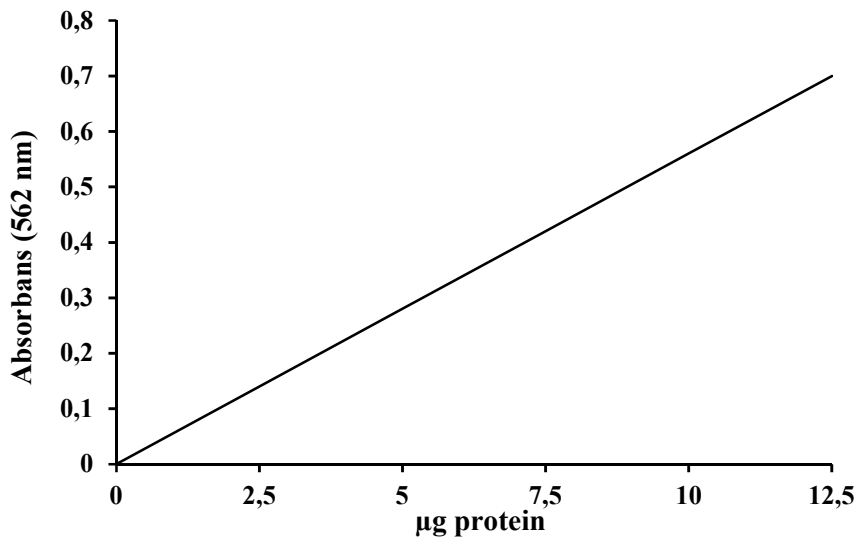
şekil 9. Soğuk, UV ve hormon uygulanan fasulye bitkileri

Kök ve gövde uzunluğu belirlenmesi

Fasulye bitkileri dikkatlice hasat edilmiş ve kök-gövde uzunluğu hassas bir cetvel yardımıyla ölçülmüştür. Bulgular cm/bitki olarak sunulmuştur (Bozcuk 1978).

Protein tayini

Taze bitki dokularından 0,5 gr alınan örnek, sıvı azot ile iyice un haline getirildi ve üzerine 5 ml 100 mM fosfat tamponu (pH 6,70) pipetlendi ve soğuk bir havanda iyice homojenize edildi. Oluşan homjenat 12,000xg'de +4 °C'de 15 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası elde edilen berrak süpernatant protein tayini için kullanıldı. Bu amaçla süpernatanttan 20 µl alınıp üzerine 200 µl BCA (Bicinchoninic asit+CuSO₄) reaktifi pipetlendi. Karışım 60 °C'de 15 dk süreyle inkübe edildi. Sonra, örnek oda sıcaklığına geledikten sonra absorbansı bir nanodrop-plate spektrofotometrede 562 nm'de köre karşı okunmuştur. Kör, ekstrakt yerine 20 µl BCA reaktifi kullanılarak hazırlandı. Örneklerin protein içeriği hesaplamaları, standart bir grafik üzerinden yapıldı ve protein miktarları µg protein/gr taze doku olarak sunuldu. Standart grafik için 1 ml'sinde 1 mg protein içeren sığır albumini (BSA) ile hazırlanmış stok çözeltisinden plate (96 kuyulu) kuyularına 0.0, 2.5, 5, 7.5, 10 ve 12.5 µg protein içerecek şekilde pipetleme yapıldı ve kuyuların hacimleri steril saf su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Bu kuyulara, 200 µl BCA reaktifi ilave edilip plate hafifçe karıştırıldı. Kör örnek için 200 µl BCA ve 20 µl steril saf su kullanıldı. Yükleme yapılan plate, 60 °C'de 20 dk inkübe edildi ve plate absorbansı 562 nm'de köre karşı kaydedildi. Ölçümler sonrasında, 562 nm absorbans değerlerine karşılık gelen protein içeriği kullanılarak bir standart grafik elde edilmiştir (Şekil 11).



Şekil 10. Protein tayini için kullanılan standart grafik

Total klorofil içeriği

Bitki taze yapraklarında klorofil-a, klorofil-b, toplam klorofil ve karotenoid miktarı için aşağıdaki prosedür kullanıldı (Witham *et al.* 1971). Taze yaprak örnekleri 0,2 gram olacak şekilde tartıldı ve önce sıvı azotta sonra %80'lik soğuk aseton içerisinde son hacim asetonla 10 ml olacak şekilde homojenize edildi. Daha sonra homojenat Whatman filtre kağıdından süzülerek elde edilen ekstrakt 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Homojenatların hacmi tekrar kontrol edildi ve hacimleri 10 ml yapıldı. Tüplerden süpernatantlar alınarak 450, 645 ve 663 nm'de absorbans değerleri yeşil ışıkla aydınlatılmış koşullarda kaydedildi. Süpernatantların üç farklı dalga boyunda kaydedilen absorbans değerleri aşağıda verilen denklemlerde yerine konulmasıyla bitki yaprak dokusunun 1 gr'da bulunan klorofil-a, klorofil-b, total klorofil ve karotenoid miktarları hesaplandı ve mg/doku olarak sunuldu.

$$\text{mg klorofil a/gr doku} = ((12,7 \times (A663) - 2,69 \times (A645)) \times (V/1000 \times W))$$

$$\text{mg klorofil b/gr doku} = ((22,9 \times (A645) - 4,68 \times (A663)) \times (V/1000 \times W))$$

$$\text{mg toplam klorofil/gr doku} = ((20,2 \times (A645) + 8,02 \times (A663)) \times (V/1000 \times W))$$

$$\text{mg toplam karotenoid/gr doku} = (4,07 \times A450) - (0,0435 \times k_{la} + 0,367 \times k_{lb})$$

Yukarıdaki denklemlerde;

A: Klorofil ekstraktının belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerini,

V: %80'lik asetonun son hacmini,

W: Dokunun taze ağırlığını (gr) ifade eder.

Lipid peroksidasyon (LPO) seviyesi

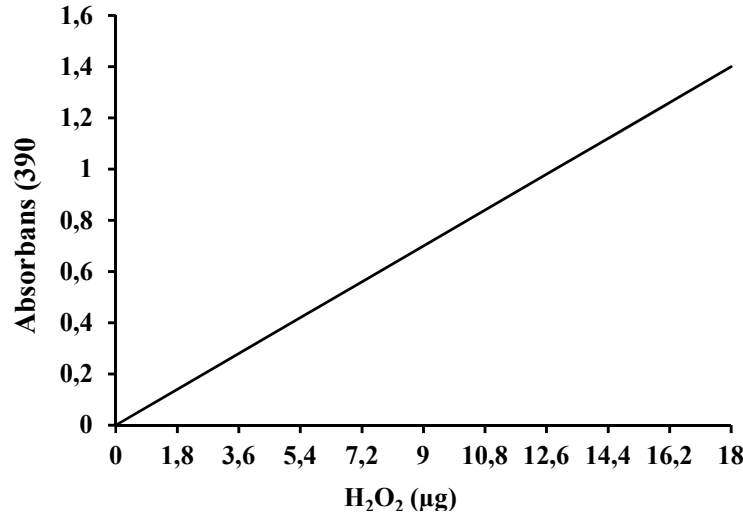
Lipid peroksidasyonu (malondialdehid içeriği olarak) belirlenmesi Heath ve Packer (1968) metoduna göre yapıldı. Malondialdehid (MDA) içeriğini belirlemek için 0,5 gr örnek 4 ml %0,1 TCA içinde iyice homojenize edildi ve homojenat 12,000xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan alınan 1 ml üzerine, %0,5'lik TBA (Tiobarbutirik asit, 20 TCA içinde hazırlanmış) çözeltisinden 4 ml ilave edildi. Hazırlanan tüpler, 100 °C'de 30 dk inkübe edildi. Reaksiyon, tüplerin bir buz küvetine alınmasıyla sonlandırıldı. Tüpler, 5,000xg'de 10 dk (+4 °C) santrifüj edildi ve berrak süpernatantın absorbansı 532 nm'de ve 600 nm'de okundu.

MDA içeriğini hesaplamak için; 532 nm'deki absorbans değerinden 600 nm'deki absorbans değeri çıkarıldı. MDA içeriğinin hesaplanmasında, MDA (nmol/ μ l): $[(A532 - A600)/155000] \times 10^6$ denklemi kullanıldı. Sonuçlar MDA nmol/ml olarak sunuldu (Heath and Packer 1968; Jaleel *et al.* 2007).

Hidrojen peroksitin (H_2O_2) içeriği

Bu deneyde ilk olarak 0,4 gr bitki dokusu 4 ml soğuk %0,1 TCA içerisinde homojenize edilmiş ve homojenat 12000xg'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra elde edilen süpernatantın 0,5 ml'si, 0,5 ml K_2HPO_4 (10 mM; pH 7,0) içinde homojenize edilmiş ve üzerine KI çözeltisinden 1 ml pipetlenmiştir. Örneklerin, absorbans değerleri 390 nm'de belirlenmiştir. Bulgular standart bir grafik yardımıyla gr doku başına düşen H_2O_2 miktarı ($\mu g \cdot gr^{-1}$ yaprak) olarak hesaplanmış ve sunulmuştur (Velikova *et al.* 2000).

Gerekli standart grafiği hazırlamak için H_2O_2 (%35) çözeltisinden Ependorf tüplere (2 ml) sırayla; 1.8, 3.6, 5.4, 7.2, 9, 10.8, 12.6, 14.4, 16.2, 18 μg içerecek şekilde H_2O_2 pipetlemesi yapıldı. Tüplerin son hacmi 1 ml olacak şekilde K_2HPO_4 (10 mM; pH 7,0) tamponu ile karıştırıldı. Sonra her tüpe KI çözeltisinden 1 ml pipetlendi. Örnek absorbansı, 390 nm'de Kör örneğe karşı ölçüldü (Şekil 12).



Şekil 11. H_2O_2 miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Taze doku (0.5 gr), önce sıvı azot içinde ve sonra %0,2 polivinilpirolidon (PVP) ve 1 mM EDTA içeren 5 ml ekstraksiyon tamponu (0,1 M KH_2PO_4 , pH 7,0) içinde öğütüldü ve homojenat +4 °C'de 12,000xg'de 15 dakika santrifüjlendi. Örneklerin protein içeriği Bradford'un (1976) yöntemine göre belirlendi ev süpernatantlar enzim aktivite ölçümü için kaynak olarak kullanıldı.

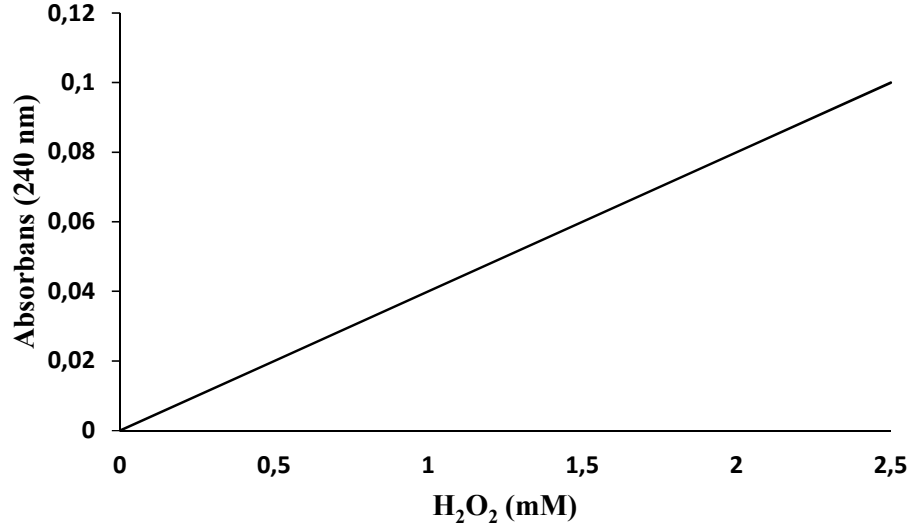
Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanır (mor renk

oluşur) (Agarwal and Pandey 2004). SOD aktivitesi, enzim tarafından nitro mavi tetrazolyum (NBT) boyasının optik yoğunluğundaki düşüşün kaydedilmesiyle belirlendi. 3 mL'lik reaksiyon karışımı, 2 mM riboflavin, 13 mM metiyonin, 75 mM NBT, 0,1 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 50 mM fosfat tamponu (pH 7,8), 50 mM sodyum karbonat ve 0,05 ml enzim fraksiyonu içeriyordu. Reaksiyon, riboflavin solüsyonu ilave edilerek ve tüpler, 15 dakika süreyle iki adet 30W'lık floresan lambanın altına yerleştirilerek başlatıldı. Maksimum rengi veren enzim içermeyen tam bir reaksiyon karışımı kontrol olarak görev yaptı. Işık kapatılarak ve tüpler karanlıkta bırakılarak reaksiyon durduruldu. Işınlanmayan tam bir reaksiyon karışımı kör olarak görev yaptı. Absorbans 560 nm'de kaydedildi ve 1 ünite enzim aktivitesi, absorbans okumasını enzimsiz tüplere göre %50'ye düşüren enzim miktarı olarak alındı (Sairam ve Srivastava 2000; Yordanova *et al.* 2004).

Katalaz (CAT) aktivitesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için kullanılan yöntem, Gong vd. (2001)'in uyguladığı yöntemdir. CAT aktivite ölçümü ortamındaki H_2O_2 'nin O_2 ve H_2O 'ya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır. Reaksiyonda azalan H_2O_2 miktarını belirlemede kullanılacak olan H_2O_2 standart grafiği (Şekil 13) hazırlanmıştır. Bunun için, 5 mM H_2O_2 çözeltisinden 3 ml'lik spektrofotometre tüplerine sırasıyla; 0,0, 0,5, 1, 1,5, 2 ve 2,5 mM içerecek şekilde pipetleme yapıldı. Tüplerin hacmi saf su ile 1,5 mL'ye tamamlanmış ve üzerlerine 1,47 ml KH_2PO_4 (104 mM; pH 7) ve 30 µl saf su ilave edilmiştir. Küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 240 nm'de absorbans belirlenmiştir (Şekil 13). CAT aktivite ölçümü için 3 ml'lik spektrofotometre küvetine, 103 mM KH_2PO_4 (pH 7) tamponundan 1,475 ml ve 40 mM'lık H_2O_2 substrat çözeltisinden 1,5 ml konulduktan sonra, üzerine 30 µl enzim ekstraktı ilave edilir. Küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dk aralıklarla köre karşı absorbansı okunur. Ölçümlerde absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanır. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla µmol cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürülür. 25 °C'de, 1 dakika içinde substratı 1 µmol azaltan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilir ve sonuçlar mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak sunulur (Gong et al. 2001).



Şekil 12. CAT aktivitesini ölçmek için kullanılan standart grafik

Guaiacol Peroksidaz (POX) aktivitesi

Guaiacol peroksidaz (POX) aktivite tayini, guaiacol ve H₂O₂'nin substrat olduğu reaksiyonun bir ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır. Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 100 ml 0,1 M KH₂PO₄ (pH 5,5) ve 5 mM guaiacol içeren substrat çözeltisinden 3 ml konulduktan sonra, üzerine 10 µl enzim ekstraktı pipetlenir. Sonra 470 nm'de 5 dakika süreyle absorbanstaki artış 1 dakika periyotlarla kaydedilir ve absorbansın doğrusal olarak arttığı alandaki artış baz alınarak belirlenen absorbans 1 dakika başına oranlanmıştır. 25 °C'de 1 dakika içinde absorbansı 0,01 birim artıran enzim miktarı, 1 enzim ünitesi (EU) olarak kabul edilmiş ve sonuçlar mg protein başına düşen enzim ünitesi (EU/mg protein) olarak sunulmuştur (Yee *et al.* 2002).

Askorbat Peroksidaz (APX) enzimi aktivitesi

APX enzimin aktivitesi, 290 nm'de absorbansın azalmasına bağlı olarak belirlendi (Nakano and Asada 1981). APX'in aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponundan pH'sı 7,0 olarak, 250 µmol askorbik asit (ASA), 5 milimolar H₂O₂ ve 100 µl enzim ekstrasyonu içeren 3,1 ml'lik hazırlanan reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlendi. APX enziminin aktivitesi, 290 nm'de ASA için 2,8 mM⁻¹cm⁻¹ epsilon katsayısı kullanımıyla hesaplandı. Sonuçlar U.mg⁻¹ protein olarak ifade edildi.

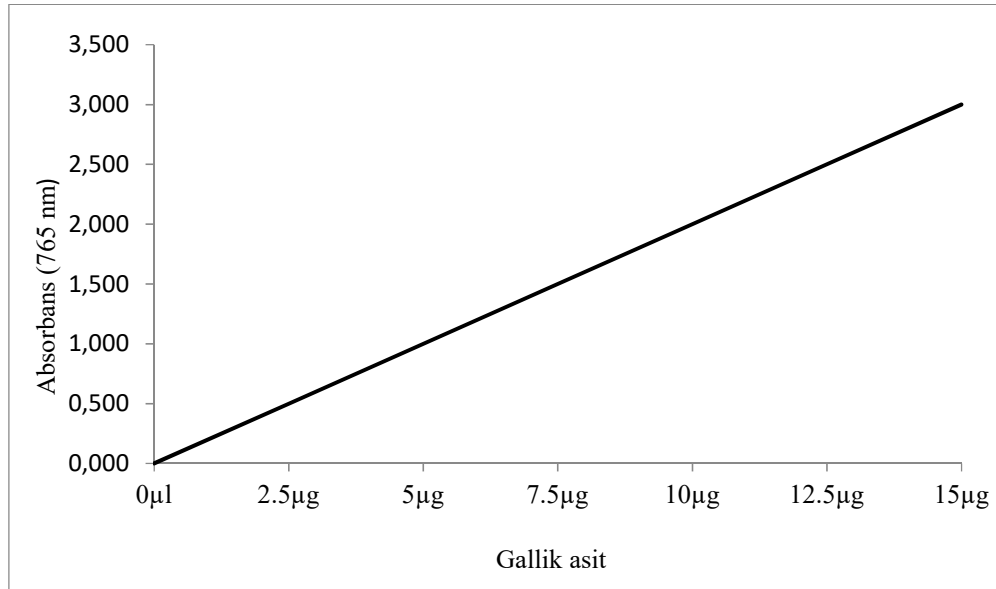
Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tayini

GR aktivitesi, küçük modifikasyonla Foyer ve Halliwell (1976) tarafından tarif edilen yöntemle belirlendi. Aktivite, NADPH oksidasyonu nedeniyle 340 nm'de absorbanstaki

azalma ölçülerek test edilir. Bunun için 3 ml reaksiyon karışımı, 0,1 M Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM EDTA, 0,2 mM NADPH, 1 mM GSSG, 5 mM MgCl₂ ve 50 ml enzim özütü içerir. Reaksiyon, GSSG ilavesiyle başlatılır ve NADPH oksidasyon hızı, 3 dakika boyunca 340 nm'de izlenir. Enzim aktivitesi, NADPH için molar yok olma katsayısı (6,2 mM⁻¹ cm⁻¹) kullanılarak belirlenir. Bir enzim ünitesi, A290/dk'da 0,01'lik bir artışa neden olan miktar olarak tanımlanır. GR aktivitesi U.mg⁻¹ protein olarak sunuldu.

Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarında fenolik madde tayini için 0,2 gr doku, 2 ml %80'lik soğuk metanol (+4 °C) içinde homojenize edildi. Daha sonra, 10 ml'lik bir falkon tüpüne 1 ml ekstrakt alındı ve üzerine %10'luk FCR'den (folin reaktifi) 2,5 mL eklendi. Bu işlem 5 dakika sonra, karışım üzerine 2 ml sodyum karbonat (Na₂CO₃, %7,5) pipetlendi (toplam hacim 5,5 ml). Karışım 10 dakika 50 °C'deki bir su banyosunda hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Banyodan alınan tüpler, oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi ve sonra 4 °C'de 10,000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatantın absorbansı bir spektrofotometrede 765 nm'de kör örneğe karşı okundu. Kör, ekstrakt yerine 1 ml saf su kullanılmış örnek tüp. Ekstraktlardaki toplam fenolik madde içeriği, bilinen miktarlarda gallik asit kullanılarak aynı yöntemle göre belirlenen bir standart eğri (Şekil 14) üzerinde belirlenmiş ve bulgular µg fenolik madde/gr doku olarak sunulmuştur.



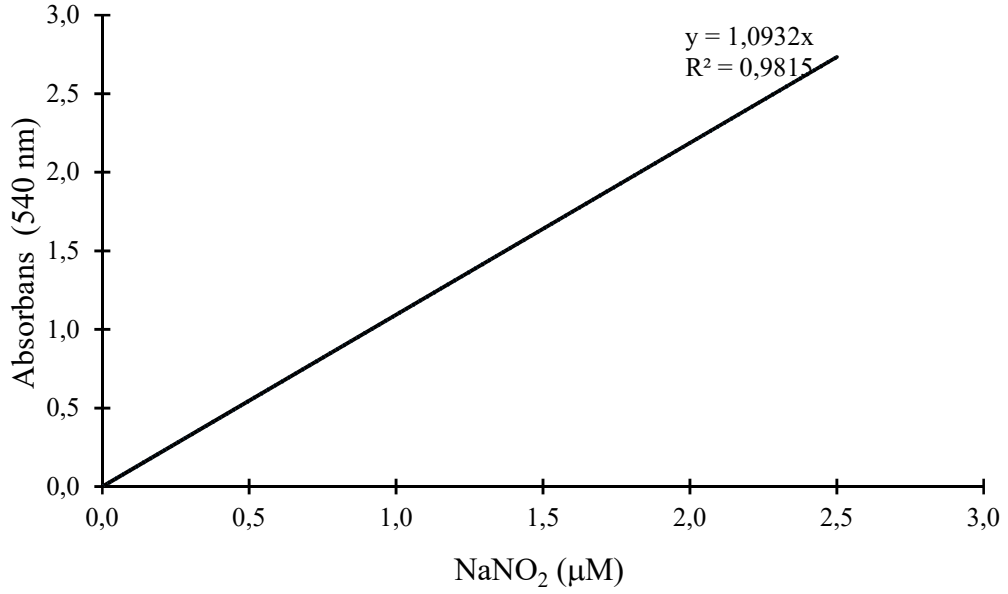
Şekil 13. Toplam fenolik madde miktarını belirlemek için kullanılan grafik

Azot Metabolizması Enzimlerinin Aktiviteleri

Nitrat redüktaz (NR) aktivitesinin tayini için, Jaworski (1971) metodu kullanıldı. Enzim özütü hazırlamak için, bitki dokuları (200 mg) önce sıvı azotla iyice ekstrakte edildikten sonra, 3 mM EDTA, 1% BSA (w/v), 5 mM Sistein ve %0,1 PVP içeren 2,5 ml 50 mM Fosfat tamponu (KH_2PO_4 ; pH 7,5) tamponu içinde homojenize edilir (Zheng-xun *et al.* 2007).

Nitrat redüktaz (NR) aktivitesinin tayini

Homojenat 15000 g'de 15 dk santrifüj edilir (+4 °C). Daha sonra, temiz bir tüpe, 200 mM NaNO_3 (veya KNO_3) içeren 25 mM'lık fosfat tamponundan (pH 7,5) 1,20 ml konulur. Tüpün üzerine 3 mM NADH'dan 400 µl pipetlenir. Bu karışım üzerine 100 µl enzim özütü pipetlenir ve tüp bir vortekste hafifçe çalkalanır. Tüp, 30 °C'de 30 dk inkübe edilir. Sonra tüp üzerine 100 µl 1 M Çinko Asetat ilave edilerek reaksiyon durdurulur. Tüp, 7000 g'de 5 dk santrifüj edilir (+4 °C). Peşine süpernatant temiz bir tüpe alınır. Karışımın renk reaksiyonu için; Temiz tüpe alınan süpernatant üzerine 1 ml %1 sülfanilamid (1,5 M HCl içinde) + 1 ml %0,02 N-(1-Naftil etilenediamin dihidroklorür (NED-HCL) (1,5 M HCl içinde) ilave edilir. Tüp karıştırıldıktan sonra, gelişen pembe rengin absorbansı 20 dk sonra 540 nm'de ölçülür. Kör, 3 NO'lu işlemiden itibaren enzim yerine 100 µl saf su kullanılarak işlemlere devam edilir (Barro *et al.* 1991). Reaksiyon sonunda tüpte oluşan NO_2 iyonlarının miktarı üzerinden enzim ünitesi belirlenir. Bunun için belirli miktarlarda 1,8 ml hacimlerde NaNO_2 içeren çözeltiler hazırlanır. Bu çözeltiler üzerine üzerine 1 ml %1 sülfanilamid (3 M) ve 1 ml %0,02 NED-HCL ilave edilir. Gelişen pembe rengin absorbansı 30 dakika sonra 540 nm'de ölçülür. Hazırlanan standart grafik (Şekil 15) kullanılarak örneklerde oluşan NO_2 miktarı belirlenir. Bir ünite NR, 1 µmol NO_2 üretmek için gerekli enzim miktarıdır. Sonuçlar EU/mg protein miktarı olarak sunulmuştur.



Şekil 14. NR ve NiR enzim aktivitesi tayininde kullanılan standart grafik

Nitrit redüktaz (NiR) aktivitesi

Enzim özütü hazırlamak için, bitki dokuları (200 mg) önce sıvı azotla iyice ekstrakte edildikten sonra, 3 mM EDTA, %1 BSA, 5 mM Sistein ve %0,1 PVP içeren 2.5 ml 50 mM Fosfat tamponu (KH₂PO₄; pH 7,5) tamponu içinde homojenize edilir. Homojenat 15,000xg'de 15 dk santrifüj edilir (+4 °C). Daha sonra, temiz bir tüpe; 1,5 ml fosfat tamponu (0,5 M; pH 7,5), 100 μl sodyum nitrit (15 mM NaNO₂), 200 μl metilviolen (5 mM) ve 200 μl 190 mM sodyum bikarbonat konulur. Bu karışımın üzerine 100 μl enzim özütü pipetlenir ve tüp hafifçe alt-üst edilir. Tüpün ağzı paraflimle kapatılır ve 35 °C'de 30 dk inkübe edilir. Sonra, tüpteki reaksiyon, koyu mavi renk kaybolana kadar şiddetli çalkalanır ve kaynar suda 1 dk tutulur. Tüp, 7000xg'de 5 dk santrifüj edilir (+4 °C). Peşine, elde edilen süpernatant temiz bir tüpe alınır. Karışımın renk reaksiyonu için; Tüp üzerine 1 ml %1 sülfanilamid (1,5 M HCl içinde hazırlanmış) + 1 ml %0.02 N-(1-Naftil etilenediamin dihidroklorür (NED-HCL) ilave edilir. Tüp karıştırıldıktan sonra, gelişen pembe rengin absorbansı 20 dk sonra 540 nm'de ölçülür. Kör örnek için enzim yerine 100 μl saf su konulur (enzim haricindeki tüm bileşenleri içermelidir). Tüpte kalan ve tüketilmeyen nitrit iyonlarının konsantrasyonları, standart eğri (Şekil 15) kullanılarak elde edilir. Bir ünite NiR, 30 °C'de 1 dakika başına 1 μmol nitriti tüketmek için gereken enzim miktarı olarak hesaplandı. Sonuçlar EU/mg protein olarak sunulmuştur.

Glutamin sentaz (GS) aktivitesi tayini

Bu enzimin aktivitesi Zheng-xun vd. (2007) tarafından önerilen yöntemle göre yapılmıştır. Enzim özütü hazırlamak için, bitki dokuları (250 mg) önce sıvı azotla iyice ekstrakte edilir. Ekstrakt sonra, 4 ml ekstraksiyon çözeltisi içinde iyice homojenize edilir.

Ekstraksiyon çözeltisi; 0,1 M HEPES tamponu (pH 7,6) olup içinde 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM 2-Merkaptoetanol ve 10 mM MgCl₂ içerir. Sonra, homojenat 15,000xg'de 15 dk santrifüj edilir (+4 °C). Süpernatant temiz bir tüpe alınır. Başka bir temiz tüpe ise 2 ml reaksiyon karışımı ilave edilir. Reaksiyon karışımı; 0,1 M Tris-HCl (pH 7,6) tamponu olup, içinde 10 mM ATP, 80 mM MgSO₄, 80 mM hidroksilamin hidroklorür (NH₂OH-HCl), 20 mM sistein ve 50 mM Glutamat bulundurmaktadır. Tüpteki reaksiyon karışımı üzerine, 200 µl enzim özütü pipetlenir ve tüp alt üst edilerek karıştırılır. Bu karışım 35 °C'de 30 dakika inkübe edilir. Sonra üzerine, %10'luk FeCl₃ Reaktifinden 1 ml eklenir ve karıştırılır. Proteinlerin çökmesi için 10 dk. beklenir. Tüpler sonra 10,000xg'de 5 dk santrifüj edilir. Tüplerin süpernatantı temiz bir tüpe alınır. Süpernatantın absorbansı 540 nm'de okunur. Kör, enzim yerine 200 µl su katılmış örnektir. Sonuçlar µmol γ-glutamyl hydroxamate min⁻¹ mg⁻¹ yaş ağırlık olarak ifade edilmiştir.

Toplam çözünebilir karbohidrat tayini

Toplam çözünebilir karbohidrat (KH) tayini için bitki yapraklarından alınan 0,1 gr örnek önce sıvı azotta ve sonra 2,5 M HCl'nin 5 ml'si içinde homojenize edildi. Oluşan ekstrakt 3 s kaynar bir su banyosunda inkübe edilmiştir. Örnekler soğutulmuş ve üzerlerine nötralleştirmek için Na₂CO₃ ilave edilmiştir. Ekstraktların üzeri distile su ile 50 ml'ye tamamlanmış ve 12,000xg'de 20 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Süpernatanttan 1 ml alınarak üzerine taze hazırlanan Antron çözeltisi (3 ml) ilave edilmiş ve örnekler soğuk suda soğutulmuştur. Oda sıcaklığına kadar soğutulan örneklerin absorbansı 630 nm'de kör örneğe karşı okunmuştur. Total çözünebilir karbohidrat miktarı benzer şekilde saf glukoz ve fruktozla hazırlanan standart bir grafik kullanılarak gr doku/µg cinsinden sunulmuştur (Dische 1962).

SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS PAGE)

Fasulyenin yapraklarından izole edilen çözünebilir proteinlerin değişiklikleri sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) ile analiz edildi (Laemmli 1970). Proteinler %4–10 kesikli jel SDS-PAGE sisteminde yürütülerek molekül büyüklüklerine göre ayrıldı. Çalışmada, önce elektrofrez cam plakaları elektrofrez sistemi (Biorad elektrofrez dikey elektrofrez sistemi) aparatına yerleştirildi. Ayırma jeli hazırlandı (%10) ve elektrofrez camları arasına pipetlendi. Bu işlemden önce jel içinde hava kabarcığı kalmaması için jeldeki hava kabarcıkları bir vakum pompasıyla alındı. Camlar arasına dökülen jel yüzeyinin düzgün ve pürüzsüz olması için izopropil alkol kullanıldı. Polimerleşmeden sonra izopropil alkol kısmı döküldü ve jellerin üstü saf su ile yıkandı. Polimerleşme sonrası jeller 3-5 saat +4 °C'de tutuldu. Daha sonra yığılma jeli hazırlandı (%4) ve zaman geçirmeden camlar arasına pipetlendi ve hemen uygun kuyucuk tarakları yerleştirildi. Yaklaşık 60 dk sonra, jelden tarak nazikçe

ıkarıldı ve jeli bulunduran cam plakalar elektroforez sistemi tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına taze hazırlanan yürütme tamponu yüklendi. Proteinler, rnek tamponu içinde her bir kuyuya 20 µg protein içerecek şekilde hazırlandı. Örneklerin son hacmi, 850 µl olması için 1/1,25 oranında örnek tamponu pipetlendi. rnek tamponu içindeki protein örnekleri 5 dk kaynar (100 °C) su banyosunda bekletildi. Örnekler oda ısısına geldiğinde, jel kuyularına bir mikropipet ile yükleme yapıldı. Molekül ağırlıkları bilinen ticari markır proteinler de aynı işemlere tabi tutularak numunelerle birlikte jele yüklenmiştir. Elektroforez tank kapağı kapatıldı ve anot (+) kablo ile katot (+) kablolar yerlerine takıldı. Yüklenen proteinler, ilk önce 80 voltluk sabit akımda 30 dk yürütüldü (+4 °C). Yarım saat sonra, akım 120 volta ayarlandı ve yaklaşık 3 saat +4 °C’de yürütme işlemi gerçekleştirildi. Polipeptidlerin yürüme hattı sonlandığında, elektrik akımı kesildi ve jel cam plakalar arasından dikkatlice alındı. Jellerdeki proteinlerin jele iyice fiksasyonu olması için jeller fiksasyon zltisinde 45 dk çok hafıf hızda (75 rpm) alkalandı. Fiksasyon sonrası jeller boyama zltisine (Commasie Brilliant Blue-R250) alındı. Boyama işlemi 1 gece düşük hızda (150 rpm) alkalanarak gerçekleştirildi. Boyama işlemi bitince, jeller yıkama zltisinde şeffaşlaşana ve bantlar net görülene kadar yıkandı.

Yığma jeli hazırlanırken, %30 akrilamid-%0,8 bis-akrilamid zltisinden 830 µl alındı ve üzerine sırayla 1 M Tris-HCl’den (pH 6,8) 630 µl, %10 SDS’den 50 µl, 5 µl %10 TEMED ve 3,4 ml distile su konularak karıştırıldı. Bu zlti üzerine her zaman taze hazırlanan %10 amonyum persülfattan 45 µl pipetlendi.

Ayırma jelinin hazırlanmasında, %30’luk akrilamid-%0,8’lik bis-akrilamid zltisinden 3,2 ml alındı ve bunun zerine 1 M Tris-HCl’den (pH 8,8) 2,03 ml, %10 SDS’den 80 µl, %5’lik TEMED’den 4 µl ve son olarak 2,61 ml distile su eklenmiştir. Bu zlti üzerine son olarak 1 gr 95 µl amonyum persülfat pipetlenmiştir

İstatistik Analizler

Çalışmada bulgular için tam bir randomize tasarımıda 3 kez tekrarlanan veriler üzerinde tek yönlü varyans analizi testi (ANOVA) uygulandı. Uygulamaların ortalamaları arasındaki anlamlı farklılıkları hesaplamak için SPSS 16.0 versiyonu ile $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde Duncan’ın çoklu karışılaştırma testi kullanıldı. Veriler tüm tablolarda ortalama $\pm$ standart hata olarak sunuldu..

ARAŞTIRMA BULGULARI

Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Kök Gövde Uzunlukları Üzerine Etkisi

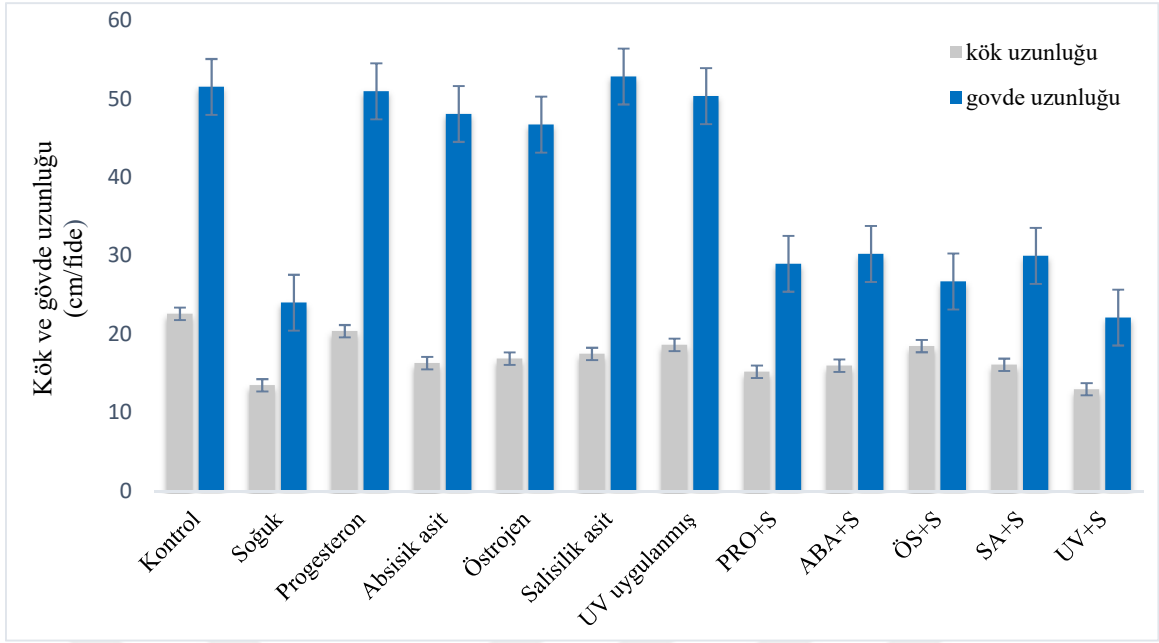
Fiziksel çevre stresi olan soğuk ve UVB'nin etkisini azaltmak için kullanılan bitkisel ve memeli cinsiyet hormonlarının kök ve gövde uzunluğuna etkisi ölçülmüştür (Tablo 1). Soğuk kontrol kök uzunluğu en az (13,5 cm), tek başına hormon uygulamalarında kök uzunluğu en çok progesteron da (20,4 cm), gövde uzunluğu ise SA (52,88 cm) da olmuştur. Ayrıca iyileştirici etken olarak kullanılan UV ışığının uygulaması, hormonların soğuğa etkisini daha da artmıştır.

Tablo 1. Soğuk + UV stresine karşı uygulanan bitki ve memeli cinsiyet hormonlarının kök gövde uzunluğuna (cm/fide) etkisi

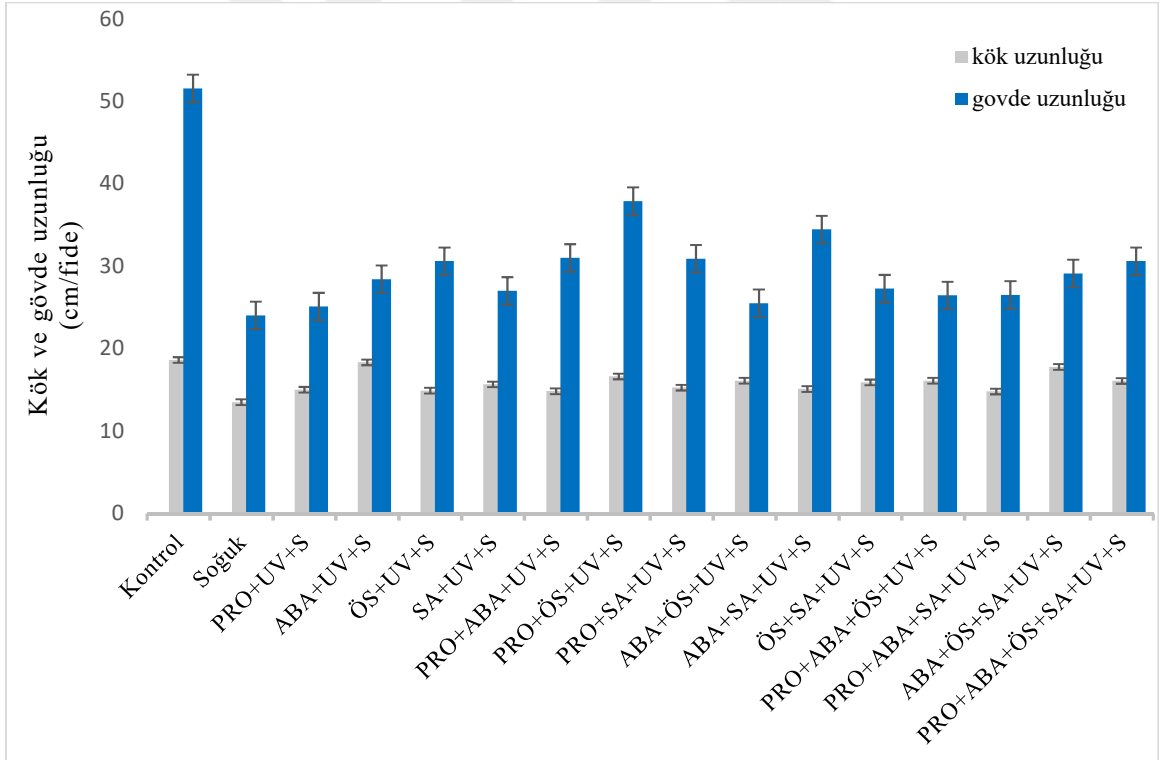
UYGULAMALAR	KÖK (cm/bitki)	GÖVDE (cm/bitki)
K	22,62 ±0,216a	51,55 ±0,15a
S	13,5 ±0,11f	24,03 ±0,21f
PRO	20,4 ±0,18b	51±0,31a
ABA	16,33±0,14d	48,11±0,12b
ÖS	16,9±0,15d	46,75±0,21b
SA	17,5±0,16c	52,88±0,24a
UV	18,66±0,15c	50,37±0,16b
PRO+S	15,22 ±0,12e	29 ±0,19d
ABA+S	16 ±0,11d	30,25 ±0,11d
ÖS+S	18,5 ±0,149c	26,75 ±0,26e
SA+S	16,11 ±0,126d	30±0,12d
UV+S	13,00±0,21f	22,14 ±0,15f
PRO+ UV+S	15 ±0,14e	25,1 ±0,24e
ABA+UV+S	18,33 ±0,14c	28,41 ±0,12d
ÖS +UV+S	14,90 ±0,16e	30,6 ±0,14d
SA+UV+S	15,66 ±0,11e	27 ±0,21d
PRO+ABA+UV+S	14,83±0,16e	31,05 ±0,26d
PRO+ÖS+UV+S	16,63 ±0,12d	37,88 ±0,38c
PRO+SA+UV+S	15,27 ±0,14e	30,9 ±0,09d
ABA+ÖS+UV+S	16,1 ±0,12 d	25,5 ±0,24e
ABA+SA+UV+S	15,1 ±0,14e	34,44 ±0,12c
ÖS+SA+UV+S	15,9 ±0,16ed	27,27 ±0,28e
PRO+ABA+ÖS+UV+S	16,1 ±0,08d	26,44 ±0,15e
PRO+ABA+SA+UV+S	14,8 ±0,09e	26,5 ±0,11e
ABA+ÖS+SA+UV+S	17,77 ±0,14c	29,11 ±0,16d
PRO+ABA+SA+ÖS+UV+S	16,08 ±0,18d	30,6 ±0,21d

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

*S= Soğuk uygulaması K= Kontrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit
UV= UV uygulanmış



Şekil 15. Tekli hormon uygulamalarının kök gövde uzunluğuna etkisi



Şekil 16. Çoklu hormon uygulamalarının kök ve gövde uzunluğuna etkisi

Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Yaş ve Kuru Ağırlık Üzerine Etkisi

Kontrole göre kıyaslandığında her hormon uygulaması yaş ağırlığı yaklaşık olarak %40 oranında artırmıştır. Çoğu uygulamalarda soğuk uygulamasına (S) göre yaş ve kuru ağırlıkların artırmışlardır (Tablo 2. ve Şekil 18 ve 19). ABA, PRO, SA, ABA+S, ABA+UV+S,

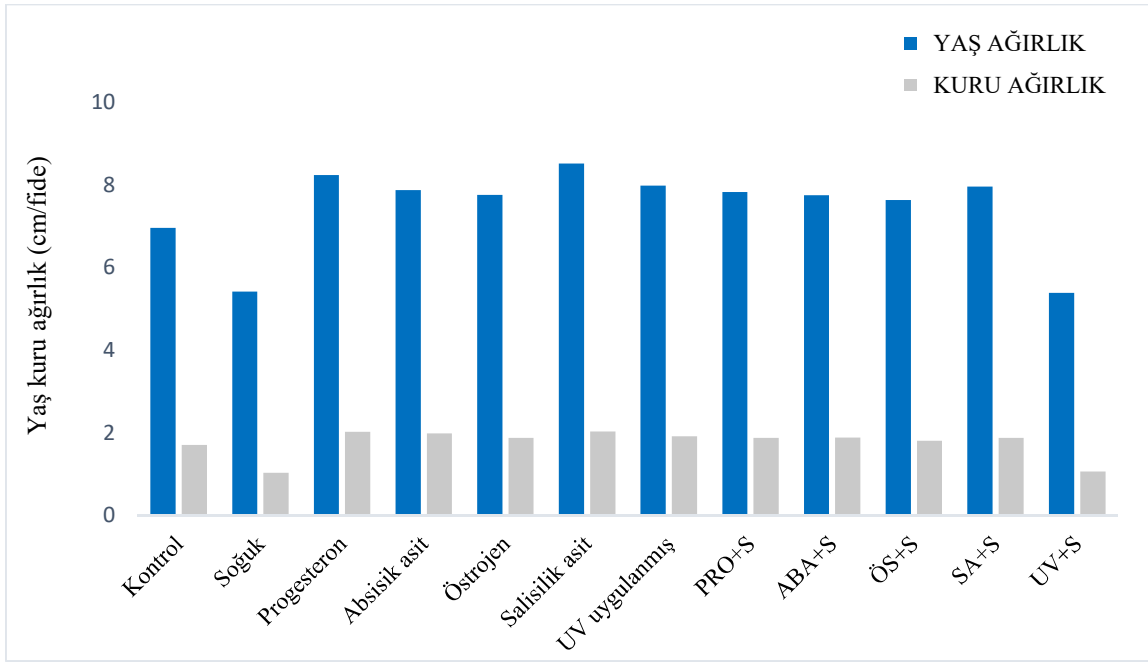
PRO+ABA+ÖS+UV+S uygulamaları yüksek kuru ağırlık oluşturmıştır. Öte yandan PRO uygulamasında soğuk kontrole göre %95 kuru ağırlık ve SA uygulamasında % 96 kuru ağırlığa sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Soğuk stresine karşı uygulanan bitki ve hayvan cinsiyet hormonlarının yaş ve kuru ağırlığa etkisi

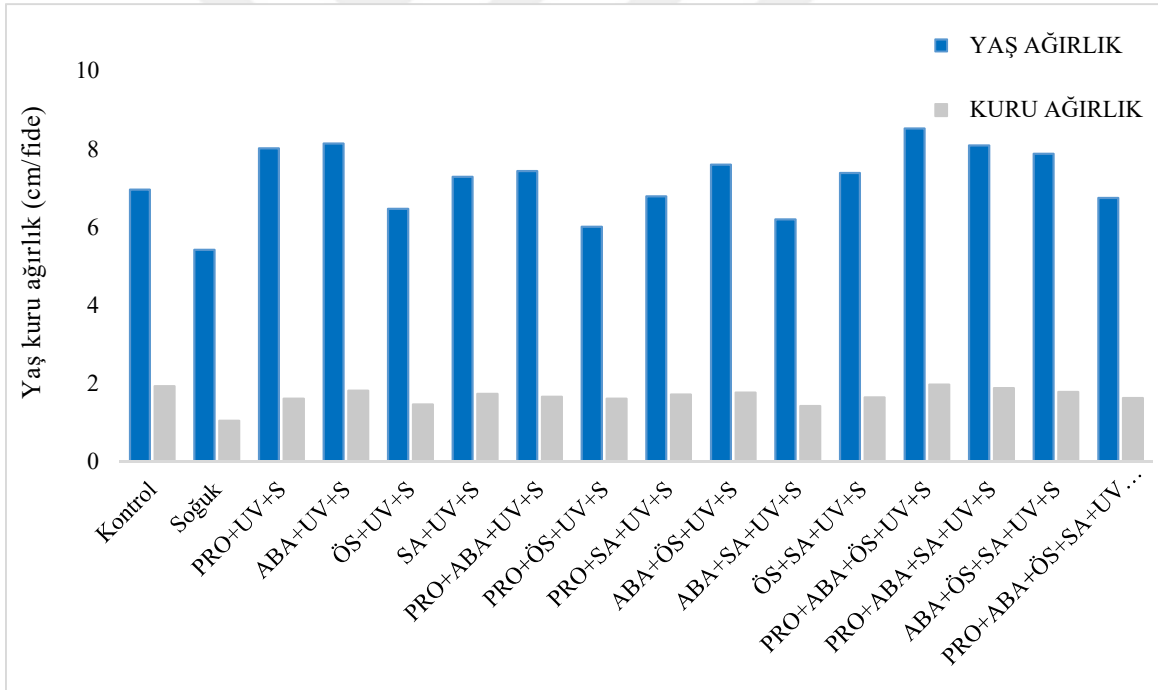
UYGULAMALAR	Yaş ağırlık (gr/bitki)	Kuru ağırlık (gr/bitki)
K	6,96±0,20bc	1,71±0,11bc
S	5,42±0,25d	1,04±0,10d
PRO	8,24±0,21a	2,03±0,12a
ABA	7,87±0,15ab	1,99±0,08ab
ÖS	7,76±0,11ab	1,88±0,11ab
SA	8,52±0,13a	2,04±0,14a
UV	7,98±0,18ab	1,92±0,12ab
PRO+S	7,83±0,20ab	1,88±0,14ab
ABA+S	7,75±0,16bc	1,89±0,08ab
ÖS+S	7,63±0,21b	1,81±0,09ab
SA+S	7,96±0,16ab	1,88±0,12ab
UV+S	5,39±0,20d	1,07±0,09d
PRO+ UV+S	8,02±0,23ab	1,61±0,08bc
ABA+UV+S	8,14±0,16ab	1,81±0,14bc
ÖS +UV+S	6,47±0,19c	1,46±0,16c
SA+UV+S	7,29±0,17bc	1,73±0,11b
PRO+ABA+UV+S	7,44±0,11bc	1,66±0,8bc
PRO+ÖS+UV+S	6,01±0,19c	1,61±0,04bc
PRO+SA+UV+S	6,79±0,15bc	1,71±0,12bc
ABA+ÖS+UV+S	7,60±0,21b	1,76±0,07b
ABA+SA+UV+S	6,20±0,18c	1,42±0,14c
ÖS+SA+UV+S	7,39±0,13bc	1,64±0,05bc
PRO+ABA+ÖS+UV+S	8,53±0,22a	1,97±0,09ab
PRO+ABA+SA+UV+S	8,09±0,11ab	1,88±0,08ab
ABA+ÖS+SA+UV+S	7,88±0,20ab	1,78±0,11ab
PRO+ABA+SA+ÖS+UV+S	6,75±0,10bc	1,62±0,07bc

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

*S= Soğuk uygulaması K= Kontrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit UV= UV uygulanmış



Şekil 17. Tekli hormon uygulamalarının yaş ve kuru ağırlık üzerine etkileri



Şekil 18. Çoklu hormon uygulamalarının yaş ve kuru ağırlık üzerine etkileri

Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Çözünabilir Protein İçeriği Üzerine Etkisi

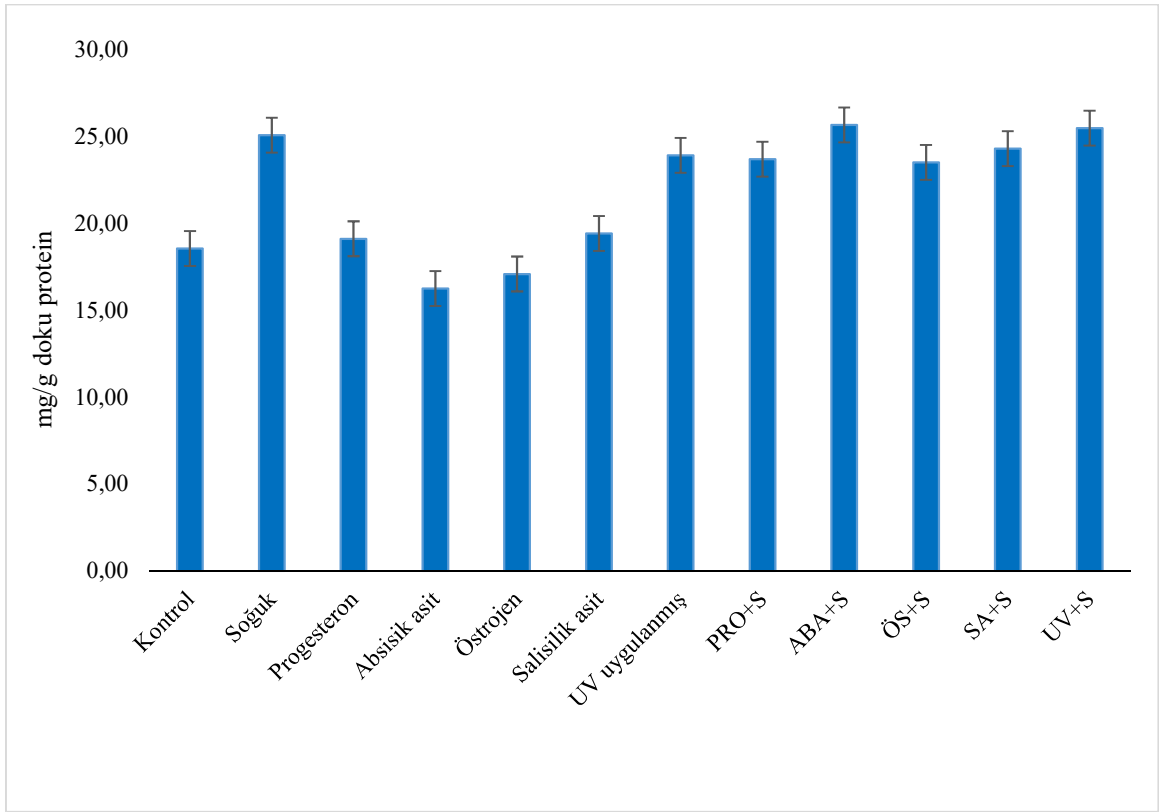
Fasulye bitkisinin yapraklarında soğuk stresi kontrole göre protein içeriğini artırmıştır (Tablo 3). Strese maruz kalan bitkileri iyileştirmek için kullanılan hormon uygulamalarda ise soğuğa (25,07 mg) göre protein miktarında azalmaya neden olmuştur. Çoklu uygulamalarda ise

soğuğa göre protein miktarında yaklaşık %10- 20 arasında azalma belirlenmiştir. En yüksek protein değerleri yapraklarda PRO+UV+S, ABA+UV+S, ÖS+UV+S ve SA+UV+S uygulamalarından elde edilmiştir (Tablo 3 ve Şekil 20 ve 21).

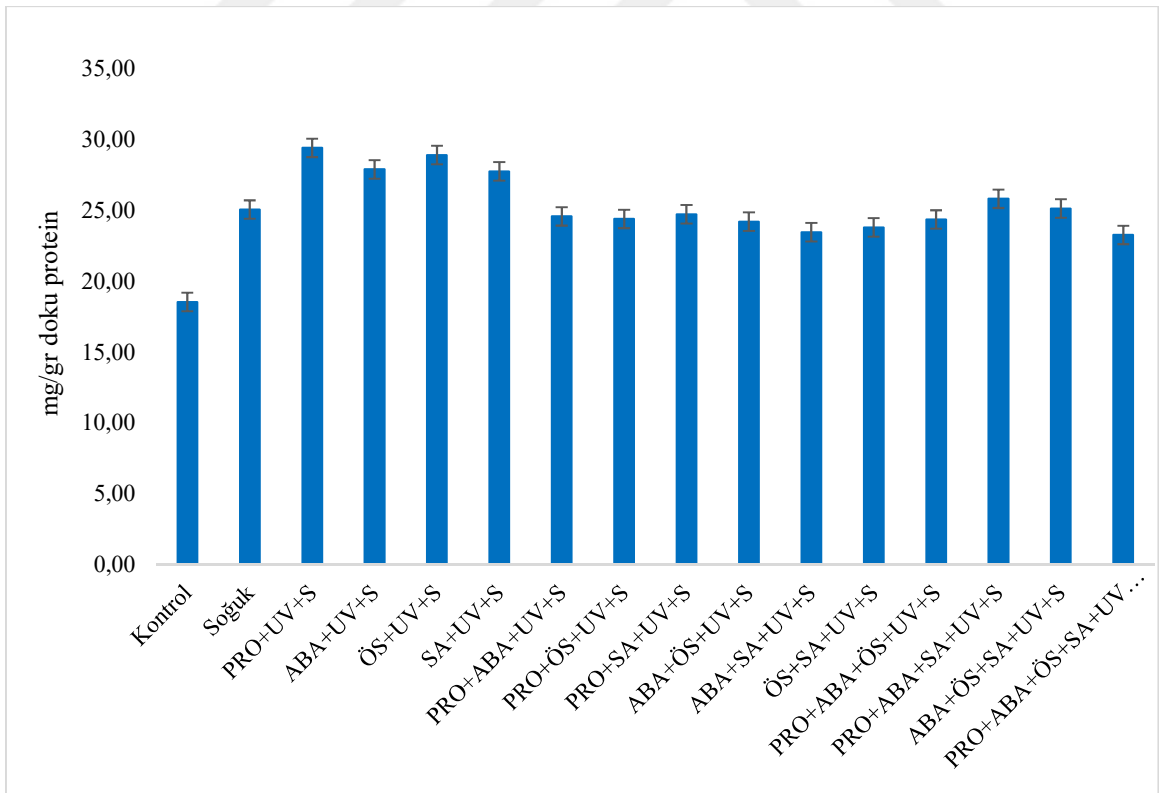
Tablo 3. Soğuk ve UV stresine maruz kalan fasulye bitkisinde protein içeriği

UYGULAMALAR	PROTEİN (mg/gr doku)
K	18,55±0.21e
S	25.07±0.25C
PRO	19,11±0.22e
ABA	16,15±0.14f
ÖS	17,08±0.22e
SA	19,41±0.28e
UV	23.90±0.14cd
PRO+S	23,69±0.18d
ABA+S	25.66±0,14c
ÖS +S	23.51 ±0.11d
SA +S	24,30±0.09c
UV +S	25.47±0.28 c
PRO+ UV +S	29,42±0.22 a
ABA+UV +S	27,91±0.24b
ÖS +UV +S	28,92±0.22a
SA+UV +S	27,77±0.14b
PRO+ABA+UV +S	24,59±0.12c
PRO+ ÖS +UV +S	24,41±0.12c
PRO+SA+UV +S	24,74 ±0.15c
ABA+ ÖS +UV+S	24,22±0.11cd
ABA+SA+UV +S	23,47±0.09d
ÖS +SA+UV +S	23,81 ±0.08d
PRO+ABA+ ÖS +UV +S	24,37±0.11c
PRO+ABA+SA+UV	25,83±0.18c
ABA+ ÖS +SA+UV +S	25,14±0.22c
PRO+ABA +ÖS +SA+UV+ S	23,28 ±0.12ed

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. *S= Soğuk uygulaması K= Kotrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit UV= UV uygulanmış



Şekil 19. Tekli ve ikili uygulamalardaki protein miktarı



Şekil 20. Çoklu hormon uygulamasındaki protein içeriği

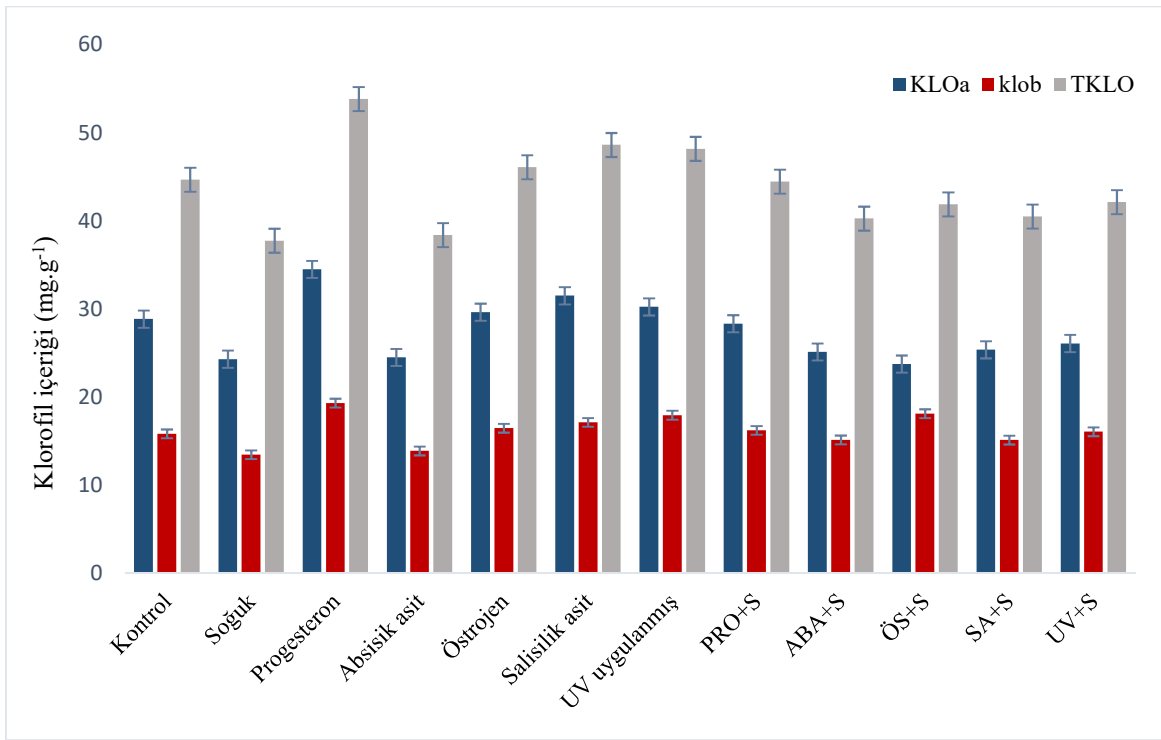
Soğuk, UV ve hormon Uygulamalarının Klorofil ve Karotenoid İçeriği Üzerine Etkisi

Tablo 4 ve Şekil 22 ve 23'te görüldüğü gibi soğuk uygulamasında toplam klorofil miktarı 37,75 mg iken, UV+S uygulanmasıyla bu oran %10 artışla 42,13 mg'a yükselmiştir. Sadece toplam klorofil değil aynı zamanda klorofil a ve b miktarlarında artış görülmüştür. Bitki ve memeli cinsiyet hormon uygulamalarında genel ve soğuk kontrole göre klorofil a, klorofil b miktarlarında artış gözlenmiştir. Karotenoid içeriğinde ise soğuk şartlarda düşüş gözlemlenirken hormon uygulamalarında artış belirlenmiştir (Tablo 5).

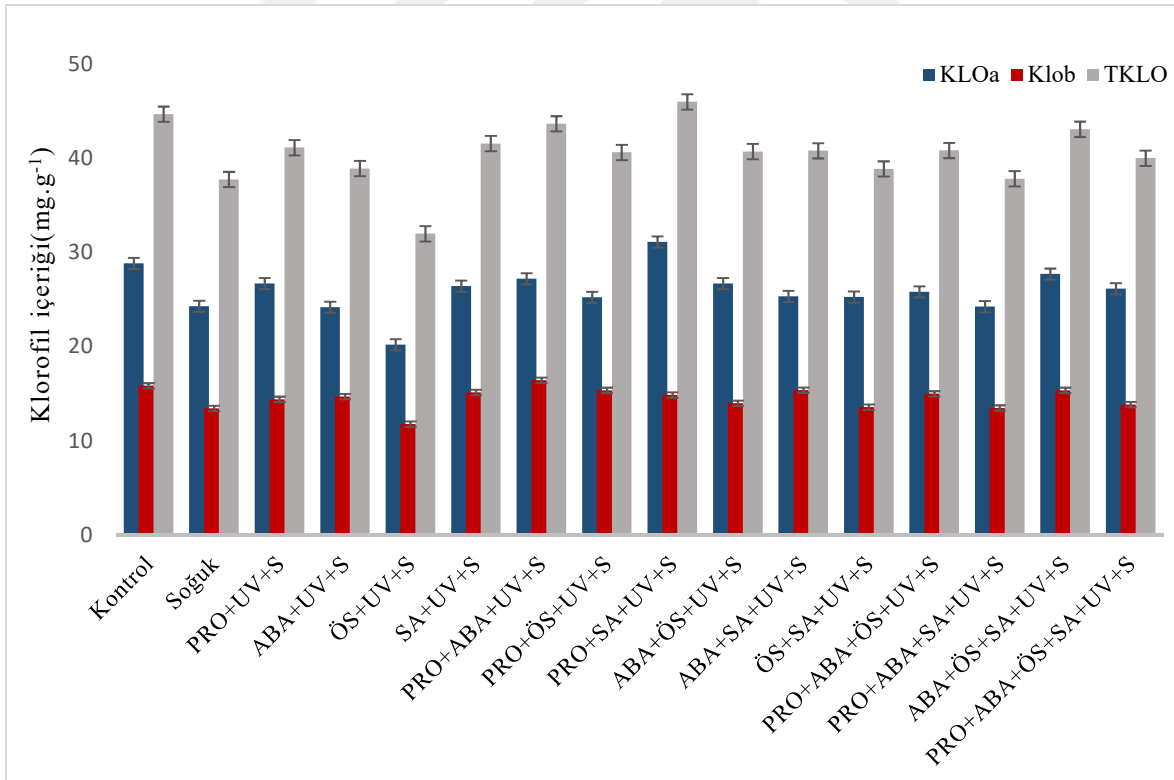
Tablo 4. Soğuk ve UV'ye maruz kalan fasulye bitkisinde klorofil içerikleri (mg/gr doku)

UYGULAMALAR	Kloa	Klob	Tklo
K	28,85 ±0,35c	15,83 ±0,cd	44,68
S	24,3 ±0,21e	13,45±0,14e	37,75
PRO	34,5±0,28a	19,32±0,31a	53,82
ABA	24,5±0,11e	13,88±0,12e	38,38
ÖS	29,64±0,33c	16,46±0,29c	46,1
SA	31,5±0,21b	17,12±0,26b	48,62
UV	30,24±0,28b	17,93±0,32b	48,18
PRO+S	28,33 ±0,32c	16,22 ±0,28c	44,45
ABA+S	25,12 ±0,15d	15,14±0,15d	40,26
ÖS+S	23,75 ±0,26e	18,12±0,38b	41,87
SA+S	25,37 ±0,18d	15,12±0,16d	40,49
UV+S	26,07±0,24d	16,06±0,22c	42,13
PRO+ UV+S	26,71 ±0,35d	14,42±0,19d	41,13
ABA+UV+S	24,2 ±0,22e	14,71±0,11d	38,91
ÖS +UV+S	20,21 ±0,25f	11,78±0,25f	31,99
SA+UV+S	26,52±0,14d	15,14±0,15d	41,56
PRO+ABA+UV+S	27,22 ±0,28c	16,44 ±0,33c	43,66
PRO+ÖS+UV+S	25,25±0,32d	15,37 ±0,22d	40,62
PRO+SA+UV+S	31,12±0,31b	14,87 ±0,16d	45,99
ABA+ÖS+UV+S	26,66±0,15d	14 ±0,12ed	40,71
ABA+SA+UV+S	25,35±0,16d	15,4±0,15d	40,8
ÖS+SA+UV+S	25,28±0,26d	13,59 ±0,14e	38,87
PRO+ABA+ÖS+UV+S	25,83±0,28d	15± 0,21d	40,83
PRO+ABA+SA+UV+S	24,25±0,15e	13,5±0,24e	37,82
ABA+ÖS+SA+UV+S	27,70±0,23c	15,37±0,09d	43,08
PRO+ABA+ÖS+SA+UV+S	26,16±0,19d	13,85±0,16e	40,01

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. *S= Soğuk uygulaması K= Kontrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit, UV= UV uygulanmış



Şekil 21. Klorofil a (Kla), Klorofil b (Klb) ve Toplam klorofil (TKLO) içeriği



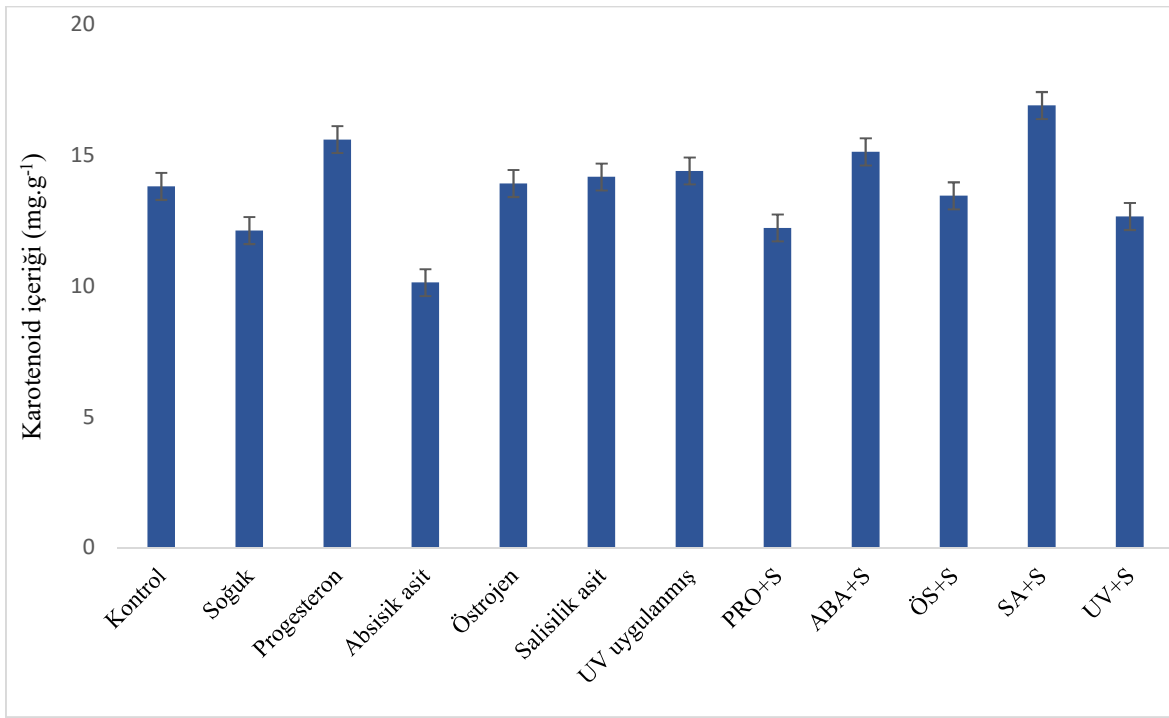
Şekil 22. Çoklu hormon uygulamalarında Klorofil a (Kla), Klorofil b (Klb) ve Toplam klorofil (TKLO) içeriği

Tablo 5. Soğuk ve UV'ye maruz kalan fasulye bitkisinde karotenoid içerikleri (mg/gr doku)

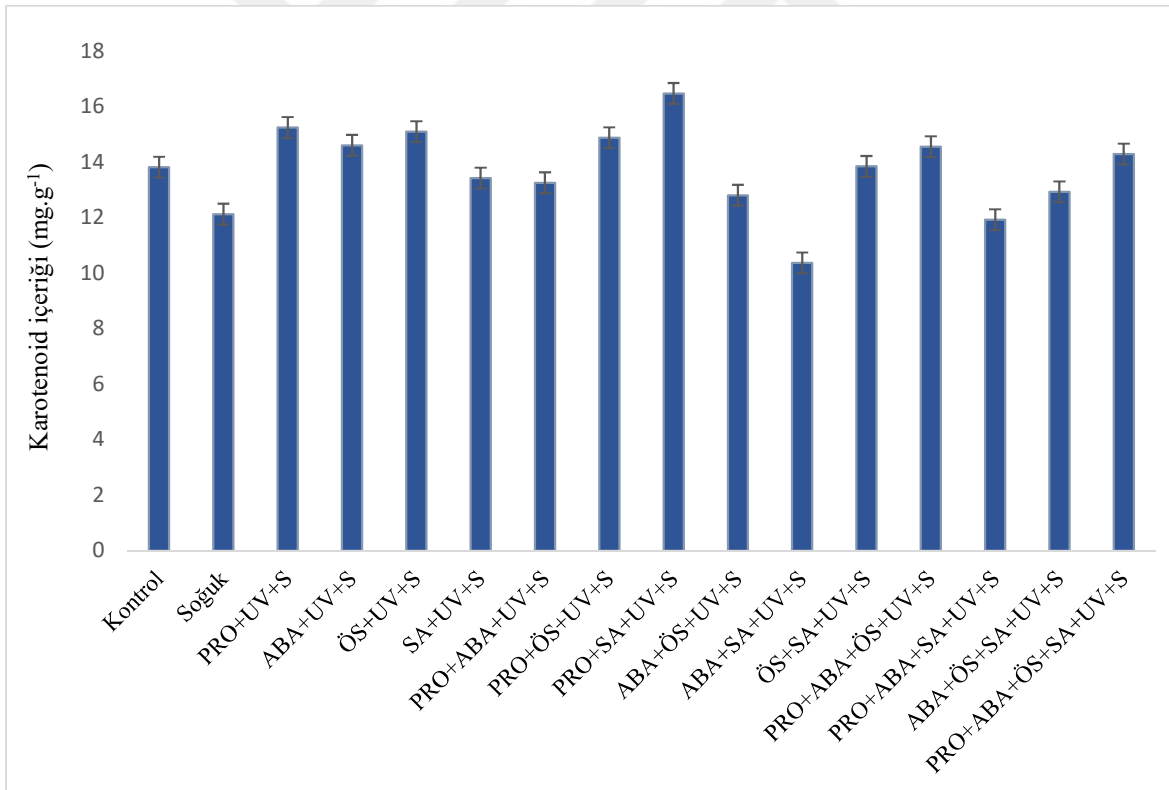
UYGULAMALAR	Karotenoid
K	13,82±0,12e
S	12,13±0,12e
PRO	15,61±0,21b
ABA	10,14±0,11f
ÖS	13,93±0,09d
SA	14,18±0,19cd
UV	14,41±0,15c
PRO.+S	12,23±0,11e
ABA+S	15,14±0,08b
ÖS+S	13,46±0,15d
SA+S	16,91±0,19a
UV+S	12,67±0,16e
PRO+UV+S	15,25±0,18b
ABA+UV+S	14,61±0,12c
ÖS+UV+S	15,10±0,21b
SA+UV+S	13,43±0,11d
PRO+ABA+UV+S	13,26±0,12d
PRO+ÖS+UV+S	14,88±0,15bc
PRO+SA+UV+S	16,48±0,15a
ABA+ÖS+UV+S	12,81±0,16e
ABA+SA+UV+S	10,37±0,11f
ÖS+SA+UV+S	13,85±0,14d
PRO+ABA+ÖS+UV+S	14,56±0,09c
PRO+ABA+SA+UV+S	11,93±0,08e
ABA+ÖS+SA+UV+S	12,93±0,11e
PRO+ABA+ÖS+SA+UV+S	14,29±0,16c

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

. *S= Soğuk uygulaması K= Kotrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit, UV= UV uygulanmış



Şekil 23. Tekli hormon uygulamalarında Karotenoid içeriği



Şekil 24. Çoklu hormon uygulamalarında Karotenoid içeriği

Soğuk, UV ve hormon Uygulamalarının H₂O₂ içeriği üzerine etkisi

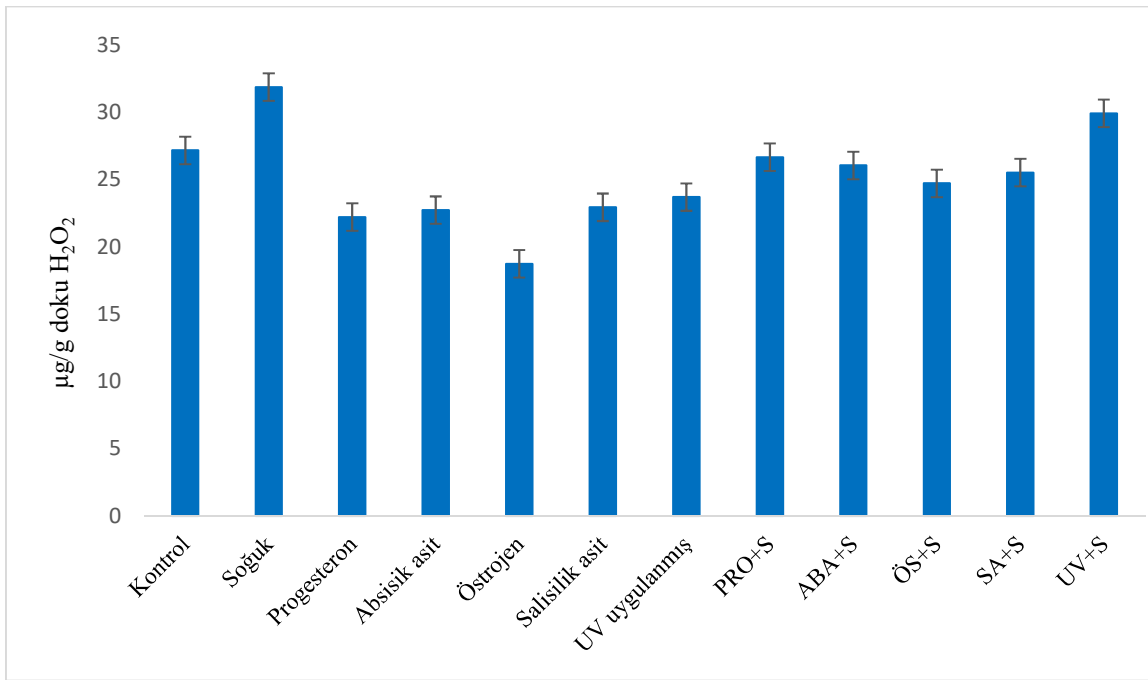
H₂O₂ içeriği, soğuk uygulamasında, kontrol bitkisine göre önemli derecede artış göstermiştir. Oysa soğuk uygulamasıyla karşılaştırıldığında yapılan diğer tüm uygulamalarda

H₂O₂ içeriğinin istatistiki olarak azaltılmış olduğu (PRO+ABA+ β-Ö +UV +S uygulaması hariç) belirlenmiştir (Tablo 6, Şekil 26 ve 27).

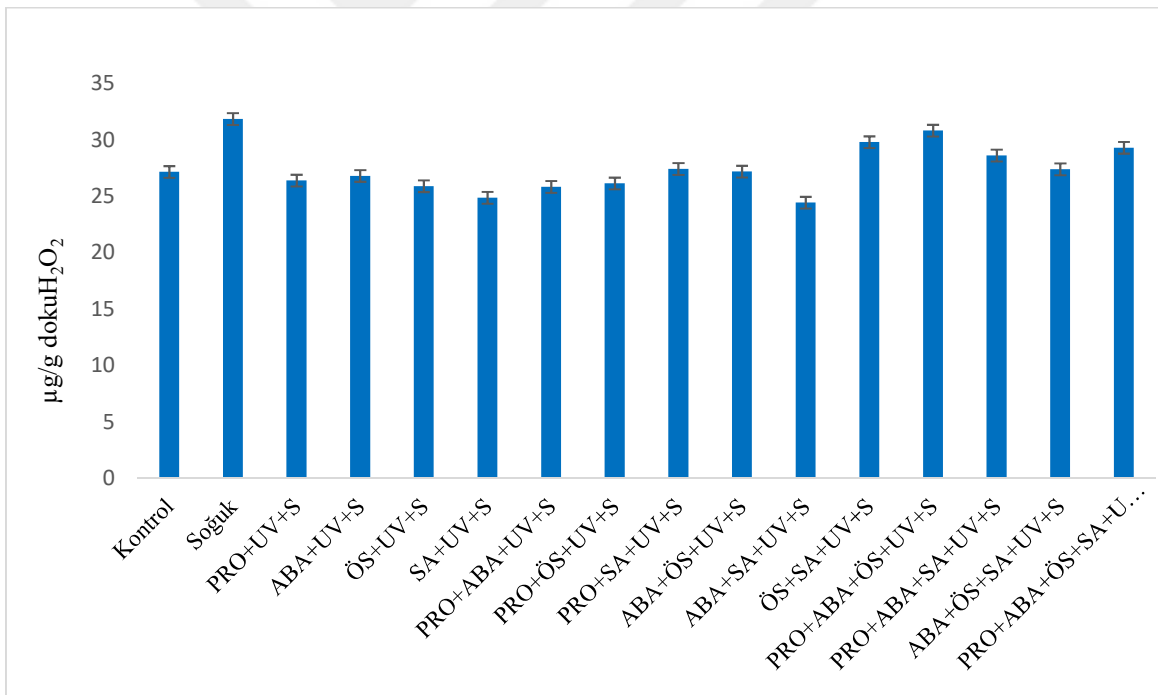
Tablo 6. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen H₂O₂ içerikleri

UYGULAMALAR	H ₂ O ₂ (µg/g)
K	27,18±0,20c
S	31,88±0,38a
PRO	22,22±0,09e
ABA	22,74±0,14e
ÖS	18,75±0,08f
SA	22,95±0,14e
UV	23,71±0,09e
PRO.+S	26,67±0,21c
ABA+S	26,06±0,14cd
ÖS+S	24,73±0,18d
SA+S	25,53±0,25d
UV+S	29,93±0,12b
PRO+UV+S	26,41±0,19c
ABA+UV+S	26,83±0,14c
ÖS+UV+S	25,92±0,24d
SA+UV+S	24,89±0,18d
PRO+ABA+UV+S	25,86±0,12d
PRO+ÖS+UV+S	26,16±0,11cd
PRO+SA+UV+S	27,44±0,16c
ABA+ÖS+UV+S	27,21±0,15c
ABA+SA+UV+S	24,45±0,12d
ÖS+SA+UV+S	29,82±0,21b
PRO+ABA+ÖS+UV+S	30,84±0,32a
PRO+ABA+SA+UV+S	28,64±0,16b
ABA+ÖS+SA+UV+S	27,42±0,12c
PRO+ABA+ÖS+SA+UV+S	29,33±0,17b

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. .*S= Soğuk uygulaması K= Kontrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit, UV= UV uygulanmış



Şekil 25. Tekli hormon uygulamalarında H₂O₂ miktarı



Şekil 26. Çoklu hormon uygulamalarında H₂O₂ miktarı

Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının MDA İçeriği Üzerine Etkisi

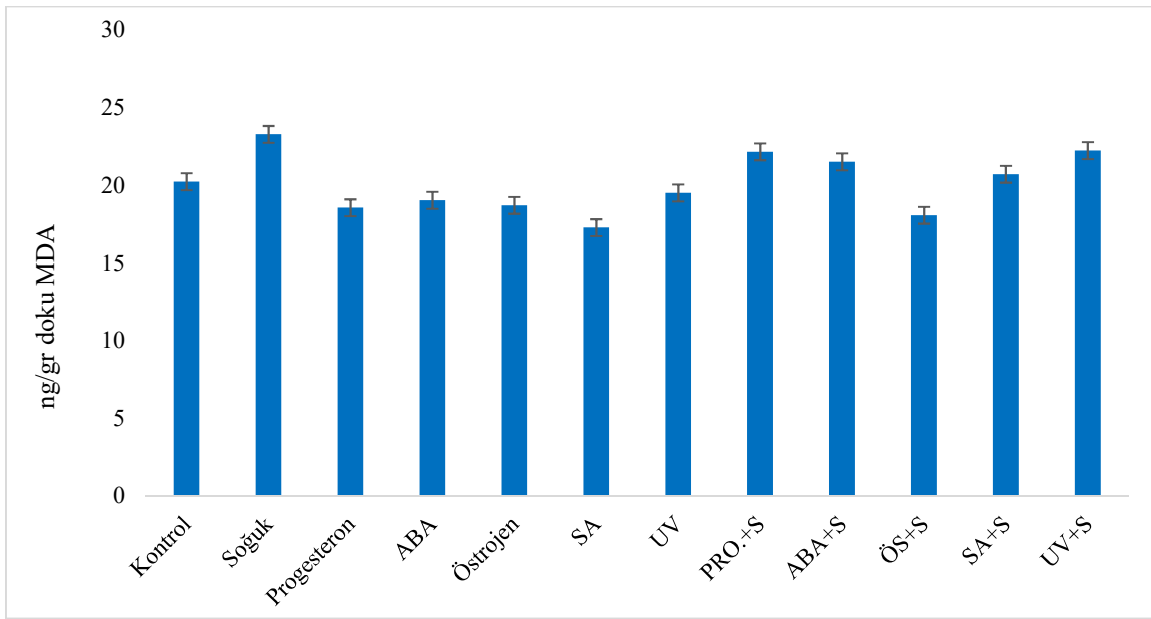
Kontrole nazaran (20,24 ng/g doku), yapılan soğuk uygulamasının (23,28 ng/g doku) MDA içeriğini istatistiki olarak artırdığı, tüm tekli uygulamaların MDA içeriğini, kontrole dahi kıyasla önemli düzeylerde azalttığı, fakat ABA ve UV uygulamalarında alınan değerlerin istatistiki olarak kontrolden farklı olmadığı, ikili uygulamaların soğuk uygulamasıyla karşılaştırıldığında MDA değerlerinin düşüş gösterdiği, hatta ÖS+ S uygulamasında kontrolden

bile daha düşük MDA değeri tespit edilmiştir. Diğer çoklu uygulamalarında da yine MDA değerlerinin kontrolden daha düşük olduğu (istatistiki olarak PRO + UV + S uygulaması hariç, 22,04 ng/g doku) ve hatta bazı çoklu uygulamaların GK'den bile düşük olduğu (ÖS + UV + S, SA + UV + S, PRO + ÖS + UV + S, vs. ABA + ÖS + SA + UV + S) tespit edilmiştir. Özellikle PRO + ABA + SA + UV + S (16,64 ng/g doku) uygulamasında diğer tüm uygulamalar dikkate alındığında en düşük MDA değerinin elde edildiği grup olmuştur (Tablo 7, Şekil 28 ve 29).

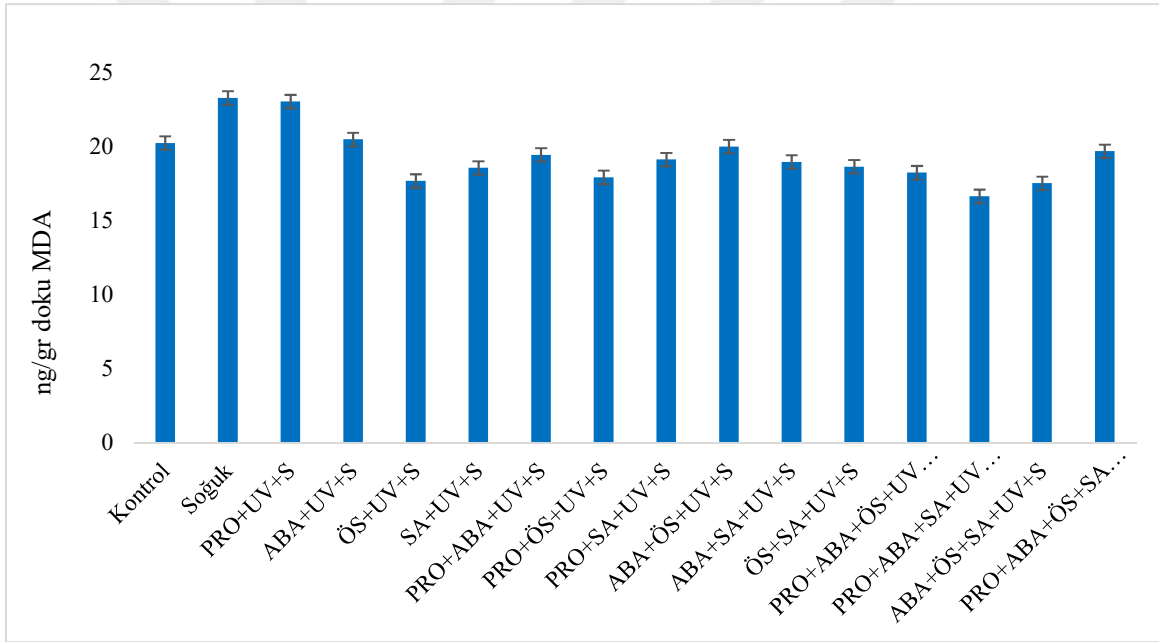
Tablo 7. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen MDA içerikleri

UYGULAMALAR	MDA (ng/gr doku)
GK	20,24±0,12b
SK	23,28±0,22a
PRO	18,56±0,08d
ABA	19,04±0,08c
ÖS	18,72±0,07d
SA	17,28±0,11e
UV	19,52±0,22c
PRO+S	22,16±0,14b
ABA+S	21,52±0,24b
ÖS+S	18,08±0,11d
SA+S	20,72±0,15b
UV+S	22,24±0,19a
PRO+UV+S	22,04±0,21a
ABA+UV+S	20,48±0,16b
ÖS+UV+S	17,68±0,08e
SA+UV+S	18,56±0,07d
PRO+ABA+UV+S	19,44±0,12c
PRO+ÖS+UV+S	17,92±0,07ed
PRO+SA+UV+S	19,12±0,07c
ABA+ÖS+UV+S	20,00±0,16b
ABA+SA+UV+S	18,96±0,11cd
ÖS+SA+UV+S	18,64±0,14d
PRO+ABA+ÖS+UV+S	18,24±0,08d
PRO+ABA+SA+UV+S	16,64±0,11f
ABA+ÖS+SA+UV+S	17,52±0,08e
PRO+ABA+ÖS+SA+UV+S	19,68±0,8c

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. *S= Soğuk uygulaması K= Kontrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit, UV= UV uygulanmış



Şekil 27. Tekli hormon uygulamalarında MDA miktarı içeriğine etkisi



Şekil 28. Çoklu hormon uygulamalarında MDA içeriği değişimi

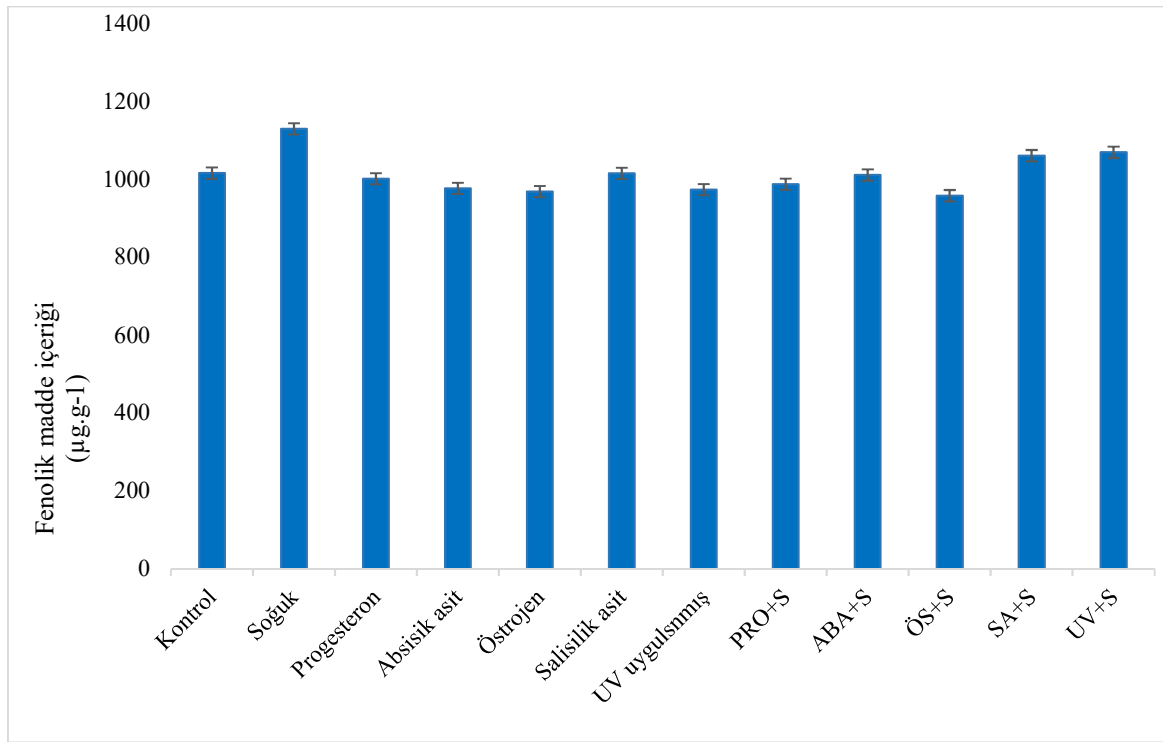
Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Toplam Fenolik Madde İçeriği Üzerine Etkisi

Kontrole ile soğuğa maruz kalmış fasulye bitkisini kıyaslandığında soğuk stresinin fasulye bitkisinde fenolik madde miktarını artırdığını bariz olarak görmek mümkündür. (Tablo 8). Soğuk uygulamasıyla karşılaştırıldığında ise, yapılan tüm uygulamalardaki fenolik madde içeriklerinin istatistiki olarak daha düşük değerlerde olduğu ve hatta bazı uygulamalardaki fenolik madde içeriklerinin kontrolden ($1015,3 \mu\text{g.gr}^{-1}$ doku) bile düşük olduğu (Örneğin; SA+UV+S, ÖS +SA+UV+S, ÖS+UV+S, ABA+UV+S, sırasıyla $787,3 \mu\text{g.gr}^{-1}$ doku, $799,7 \mu\text{g.gr}^{-1}$ doku, $807,7 \mu\text{g.gr}^{-1}$ doku, $840,7 \mu\text{g.gr}^{-1}$) belirlenmiştir (Tablo 8, Şekil 30 ve Şekil 31).

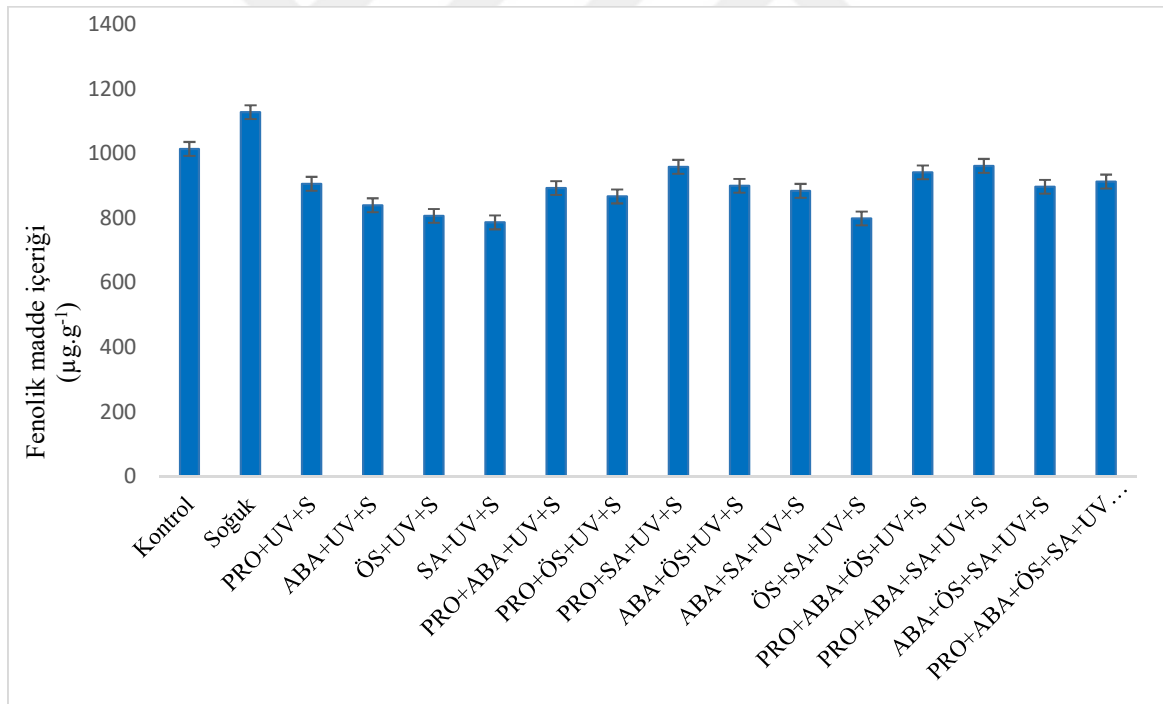
Tablo 8. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen fenolik madde içerikleri

UYGULAMALAR	Fenolik madde ($\mu\text{g.gr}^{-1}$ doku)
K	1015,333 $\pm$ 7,07b
S	1129 $\pm$ 0,12,72a
PRO	1000,667 $\pm$ 8,48b
ABA	976,333 $\pm$ 4,24c
ÖS	968 $\pm$ 9,89c
SA	1014,667 $\pm$ 14,14b
UV	973 $\pm$ 4,24c
PRO.+S	987 $\pm$ 9,89c
ABA+S	1010,333 $\pm$ 6,36b
ÖS+S	957,666 $\pm$ 8,48c
SA+S	1060,333 $\pm$ 18,38b
UV+S	1068,667 $\pm$ 15,55b
PRO+UV+S	907 $\pm$ 9,89d
ABA+UV+S	840,666 $\pm$ 5,65d
ÖS+UV+S	807,666 $\pm$ 7,07e
SA+UV+S	787,333 $\pm$ 8,48f
PRO+ABA+UV+S	893,666 $\pm$ 5,65d
PRO+ÖS+UV+S	867,666 $\pm$ 4,24d
PRO+SA+UV+S	959,666 $\pm$ 7,07c
ABA+ÖS+UV+S	901 $\pm$ 8,48d
ABA+SA+UV+S	885,333 $\pm$ 7,07d
ÖS+SA+UV+S	799,666 $\pm$ 5,65e
PRO+ABA+ÖS+UV+S	942,666 $\pm$ 9,89c
PRO+ABA+SA+UV+S	962,666 $\pm$ 5,64c
ABA+ÖS+SA+UV+S	898 $\pm$ 7,07d
PRO+ABA+ÖS+SA+UV+S	914 $\pm$ 5,65d

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. .*S= Soğuk uygulaması K= Kotrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit, UV= UV uygulanmış



Şekil 29. Tekli hormon uygulamalarında fenolik madde içerikleri



Şekil 30. Çoklu hormon uygulamalarında fenolik madde içerikleri

Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Toplam Karbohidrat İçeriği Üzerine Etkisi

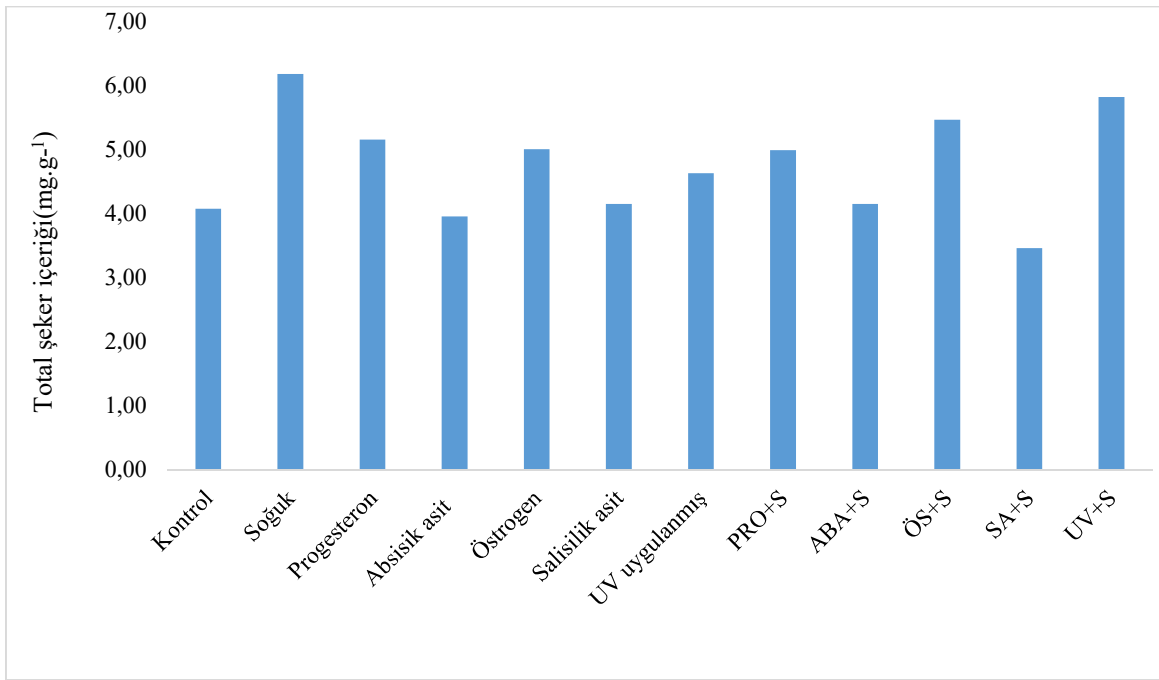
Toplam karbohidrat içeriği, kontrole (4,08 mg) nisbeten soğuk uygulama grubunda (6,18 mg) istatistiki anlamda önemli artış göstermiştir. Yani yapılan soğuk uygulaması total karbohidrat içeriğini artırıcı yönde etki etmiştir. Öte yandan, yapılan diğer tüm uygulamalarda

elde edilen değerlerin, soğuk uygulama değerinden düşük olduğu, hatta bazı uygulamalarda alınan değerlerin kontrolden alınan değerlerden dahi düşük olduğu (ABA, SA + S, ABA + UV + S, PRO+ABA+UV+S, ABA+SA+UV+S, PRO+ABA+SA+UV+S, sırasıyla 3,96, 3,46, 3,42, 3,88, 3,59, 3,52 mg) tespit edilmiştir (Tablo 9, Şekil 32 ve Şekil 33).

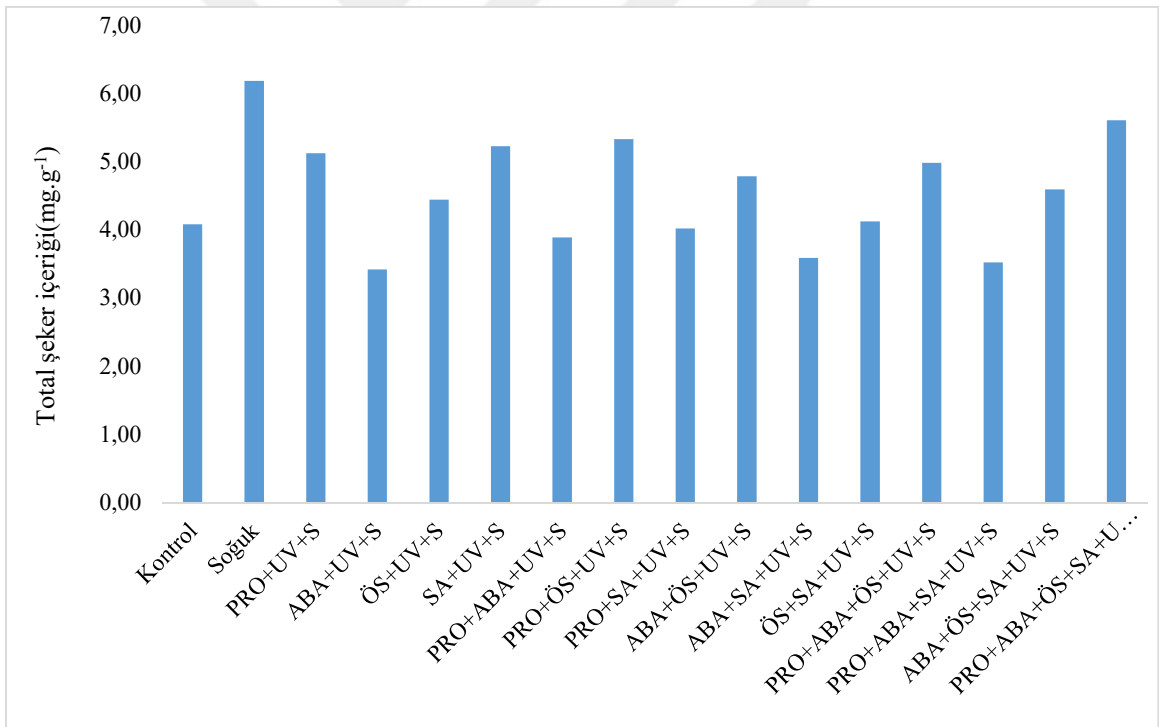
Tablo 9. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen toplam karbohidrat içerikleri

UYGULAMALAR	Toplam karbohidrat içeriği(mg.gr ⁻¹ doku)
K	4,08±0,05e
S	6,18±0,14a
PRO	5,16±0,09c
ABA	3,96±0,07e
ÖS	5,01±0,12c
SA	4,15±0,11e
UV	4,63±0,11d
PRO.+S	5,00±0,12c
ABA+S	4,15±0,14e
ÖS+S	5,47±0,11b
SA+S	3,46±0,12e
UV+S	5,83±0,11b
PRO+UV+S	5,12±0,14c
ABA+UV+S	3,42±0,1f
ÖS+UV+S	4,44±0,12d
SA+UV+S	5,23±0,15bc
PRO+ABA+UV+S	3,88±0,11e
PRO+ÖS+UV+S	5,33±0,11bc
PRO+SA+UV+S	4,02±0,08e
ABA+ÖS+UV+S	4,78±0,11cd
ABA+SA+UV+S	3,59±0,12e
ÖS+SA+UV+S	4,12±0,14e
PRO+ABA+ÖS+UV+S	4,98±0,15c
PRO+ABA+SA+UV+S	3,52±0,09e
ABA+ÖS+SA+UV+S	4,59±0,14d
PRO+ABA+ÖS+SA+UV+S	5,6±0,15b

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. *S= Soğuk uygulaması K= Kontrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit, UV= UV uygulanmış



Şekil 31. Tekli hormon uygulamalarında şeker içerikleri



Şekil 32. Çoklu hormon uygulamalarında şeker içerikleri

Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının SOD Enzim İçeriği Üzerine Etkisi

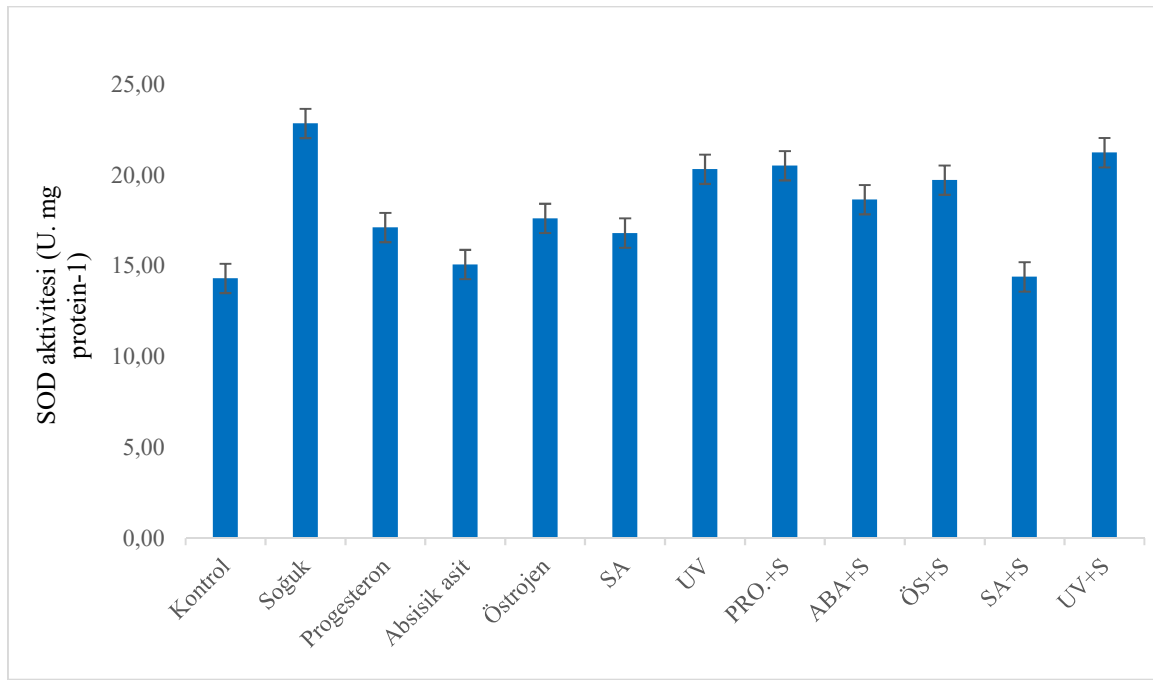
Soğuk uygulamasıyla SOD aktivitesinin kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak önemli düzeyde arttığı (K: 14,32, S: 22,86 U.mg⁻¹ protein) tespit edilmiştir. Hatta Soğuk uygulamasında elde edilen bu SOD değerlerinin diğer tüm uygulamalardan elde edilen

değerlerden daha yüksek olduğu, oysa kontrol ile kıyaslandığında ise, SOD değerlerinin diğer tüm uygulama gruplarında nisbeten yüksek olduğu (SA +S, SA+UV +S, PRO+ABA+SA+UV+S uygulamaları hariç, sırasıyla; 14,41, 14,54, 14,65 U.mg⁻¹ protein) kaydedilmiştir (Tablo 10 Şekil 34 ve 35).

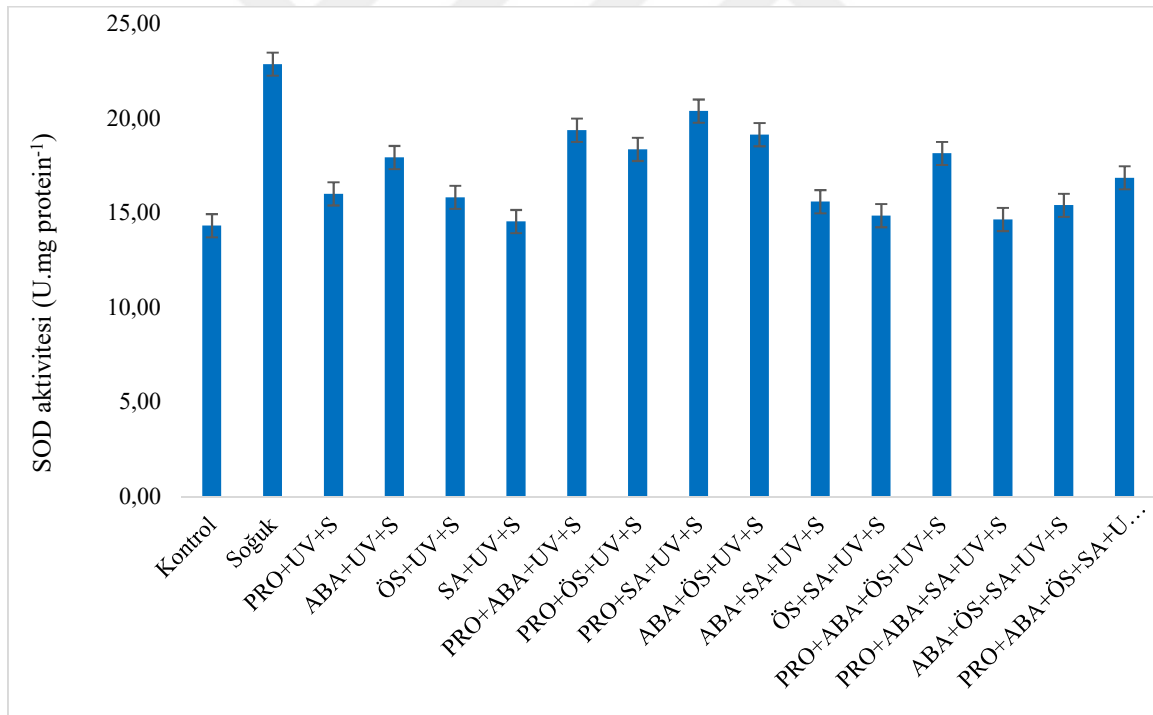
Tablo 10. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen SOD aktivitesi

UYGULAMALAR	SOD (U.mg ⁻¹ protein)
K	14,32±0,11f
S	22,86±0,28a
PRO	17,13±0,24c
ABA	15,09±0,12e
ÖS	17,63±0,19c
SA	16,82±0,16c
UV	20,34±0,22b
PRO.+S	20,53±0,16b
ABA+S	18,66±0,21c
ÖS+S	19,74±0,33c
SA+S	14,41±0,11ef
UV+S	21,25±0,14a
PRO+UV+S	16,00±0,19d
ABA+UV+S	17,93±0,31c
ÖS+UV+S	15,82 ±0,16d
SA+UV+S	14,54±0,12ef
PRO+ABA+UV+S	19,37±0,33b
PRO+ÖS+UV+S	18,36±0,16c
PRO+SA+UV+S	20,38±0,18b
ABA+ÖS+UV+S	19,14±0,26b
ABA+SA+UV+S	15,59±0,14d
ÖS+SA+UV+S	14,85±0,21e
PRO+ABA+ÖS+UV+S	18,14±0,18c
PRO+ABA+SA+UV+S	14,65±0,21ef
ABA+ÖS+SA+UV+S	15,40±0,11d
PRO+ABA+ÖS+SA+UV+S	16,86±0,29d

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. *S= Soğuk uygulaması K= Kontrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit, UV= UV uygulanmış



Şekil 33. Tekli hormon uygulamalarında SOD aktivitesi



Şekil 34. Çoklu hormon uygulamalarında SOD aktivitesi

Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının CAT Aktivitesi Üzerine Etkisi

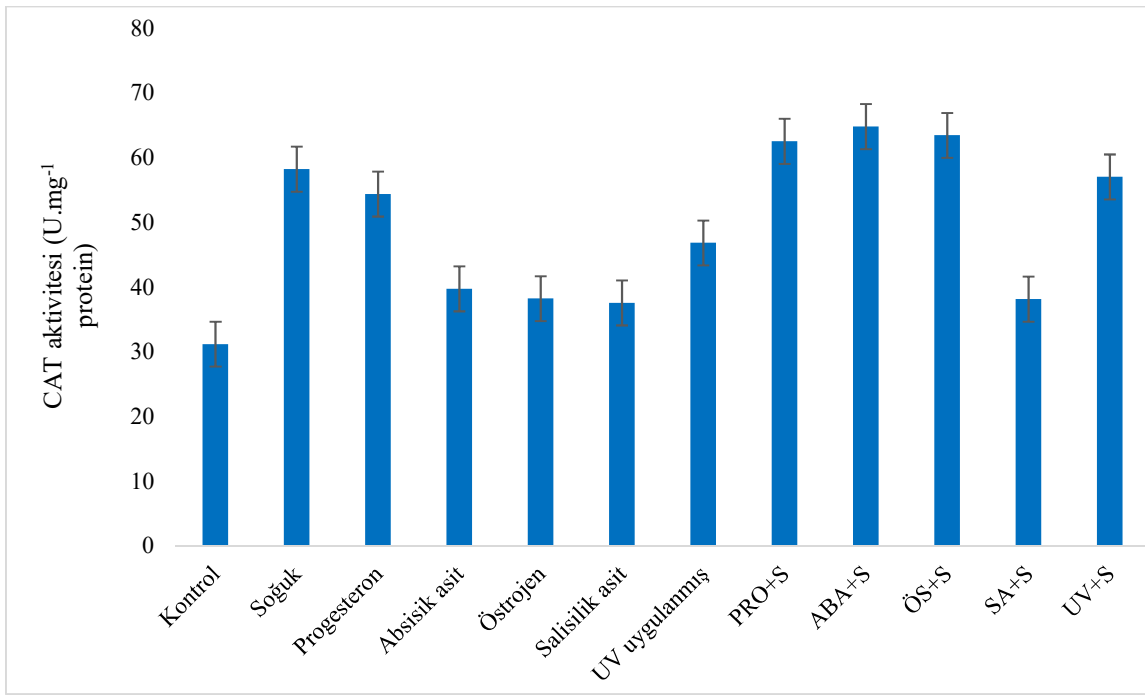
Tablo 11'e bakıldığında, yapılan soğuk uygulamasının fasulyedeki CAT aktivitesini ($58,21 \text{ U.mg}^{-1} \text{ protein}$) kontrole ($31,16 \text{ U.mg}^{-1} \text{ protein}$) göre yaklaşık iki kat artırdığı, bitkilere yapılan diğer uygulamaların çoğunluğunda ise Soğuk uygulamasıyla nispeten birkaç grup (PRO

+ S, ABA + S, ÖS + S) haricinde CAT aktivitesinde istatistiki anlamda önemli düzeylerde azalmaya neden oldukları kaydedilmiştir. Bu uygulamalar içerisinde en fazla CAT aktivitesinin azaldığı grupların SA+UV +S (30,14), ÖS +UV +S (35,14), ABA+UV +S (36,53), PRO+ABA+UV +S (37,31), PRO+ UV +S (38,60), PRO+SA+UV +S (38,66) oldukları tespit edilmiştir (Tablo 11, Şekil 36 ve 37).

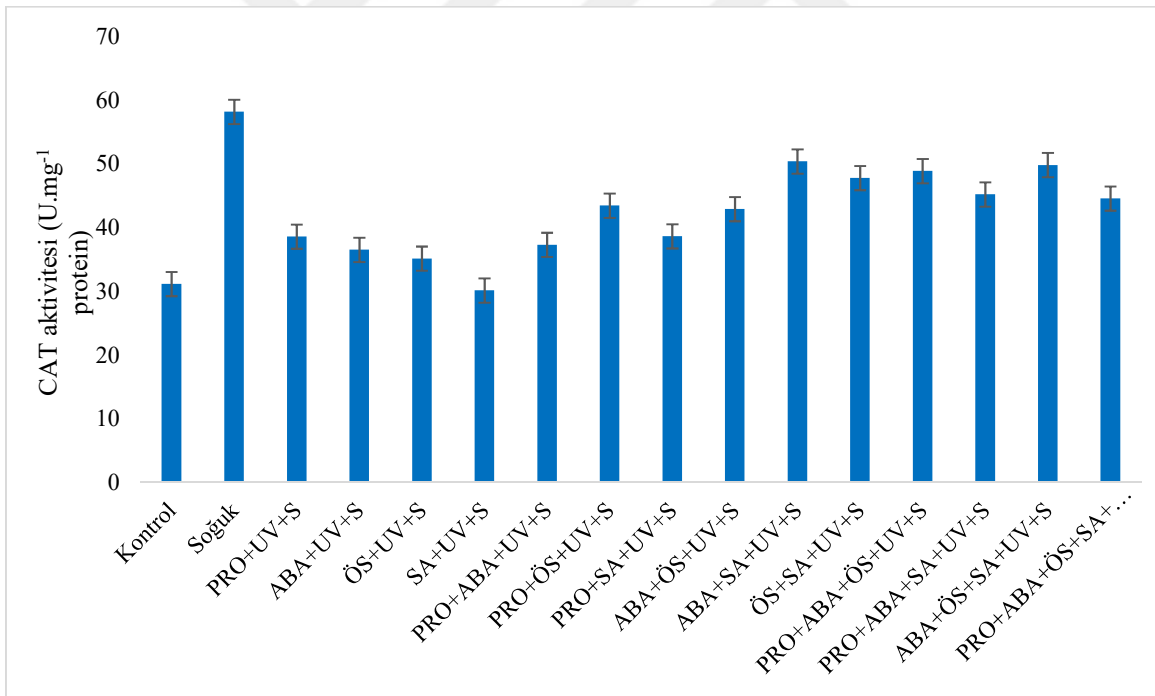
Tablo 11. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen CAT aktivitesi

UYGULAMALAR	CAT (U.mg ⁻¹ protein)
K	31,16±0,19f
S	58,21±0,16b
PRO	54,36±0,28b
ABA	39,71±0,22d
ÖS	38,20±0,16e
SA	37,53±0,12e
UV	46,81±0,28c
PRO.+S	62,52±0,18b
ABA+S	69,40±0,13a
ÖS+S	66,69±0,11a
SA+S	38,12±0,24e
UV+S	57,02±0,15b
PRO+UV+S	38,60±0,12e
ABA+UV+S	36,53±0,14e
ÖS+UV+S	35,14±0,19e
SA+UV+S	30,14±0,29f
PRO+ABA+UV+S	37,31±0,12e
PRO+ÖS+UV+S	43,47±0,16d
PRO+SA+UV+S	38,66±0,12e
ABA+ÖS+UV+S	42,93±0,25d
ABA+SA+UV+S	50,42±0,29c
ÖS+SA+UV+S	47,81±0,21c
PRO+ABA+ÖS+UV+S	48,91±0,31c
PRO+ABA+SA+UV+S	45,24±0,26d
ABA+ÖS+SA+UV+S	49,84±0,19c
PRO+ABA+ÖS+SA+UV+S	44,59±0,15d

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. * Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. *S= Soğuk uygulaması K= Kontrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit, UV= UV uygulanmış



Şekil 35. Tekli hormon uygulamalarında CAT aktivitesi



Şekil 36. Çoklu hormon uygulamalarında CAT aktivitesi

Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının POD Aktivitesi Üzerine Etkisi

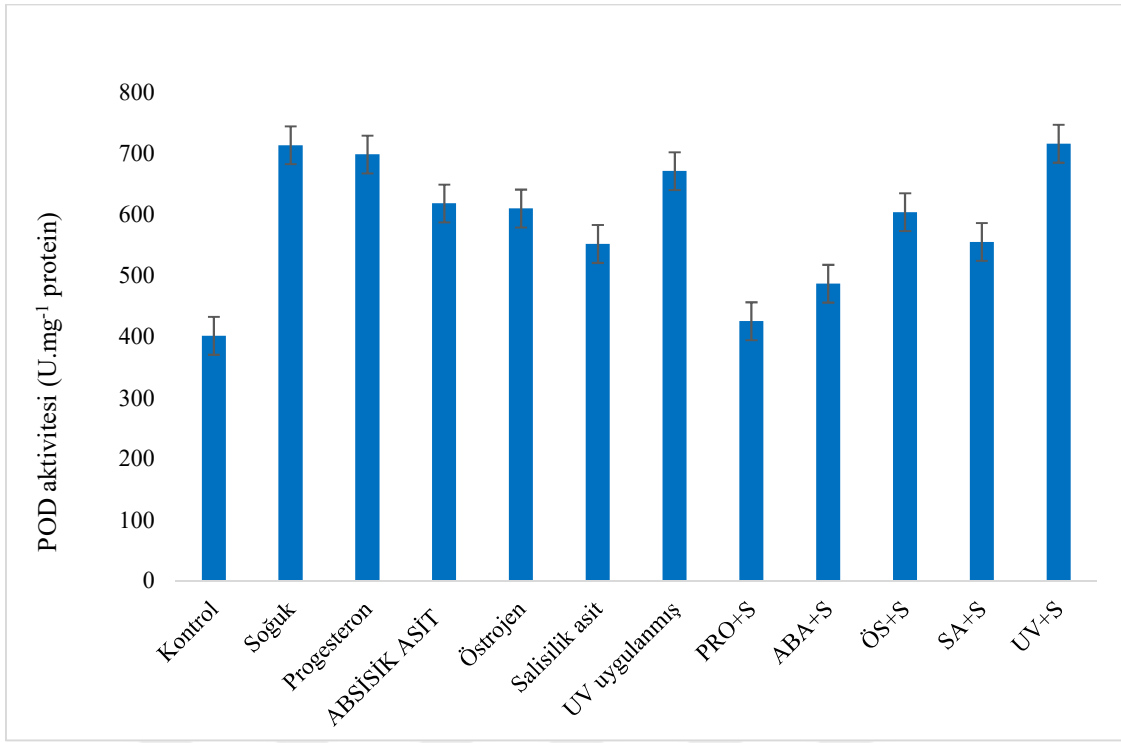
Kontrol ile soğuk uygulama bitkisini kıyaslandığında, bitkilere uygulanan soğukun etkisiyle POD aktivitesinin 401,83'den 714,1U mg⁻¹ protein seviyesine kadar çıktığı görülmüştür. Ancak yapılan diğer uygulamalar soğuk uygulamasıyla karşılaştırıldığında, UV+S (716,7 U.mg⁻¹ protein), PRO+ABA+ÖS+UV+S (709,8 U.mg⁻¹ protein, PRO+ABA+SA+UV+S

(708,3 U.mg⁻¹ protein)'de POD aktivitelerinin istatistiki olarak aynı olduğu, oysa diğer tüm uygulamalarda POD aktivitelerinde çok önemli düşük değerlerin elde edildiği kaydedilmiştir. Tüm uygulamalar içerisinde en düşük POD aktivitesi değerinin PRO+ABA+UV +S uygulamasında olduğu belirlenmiştir (Tablo 12 ve Şekil 38 ve Şekil 39).

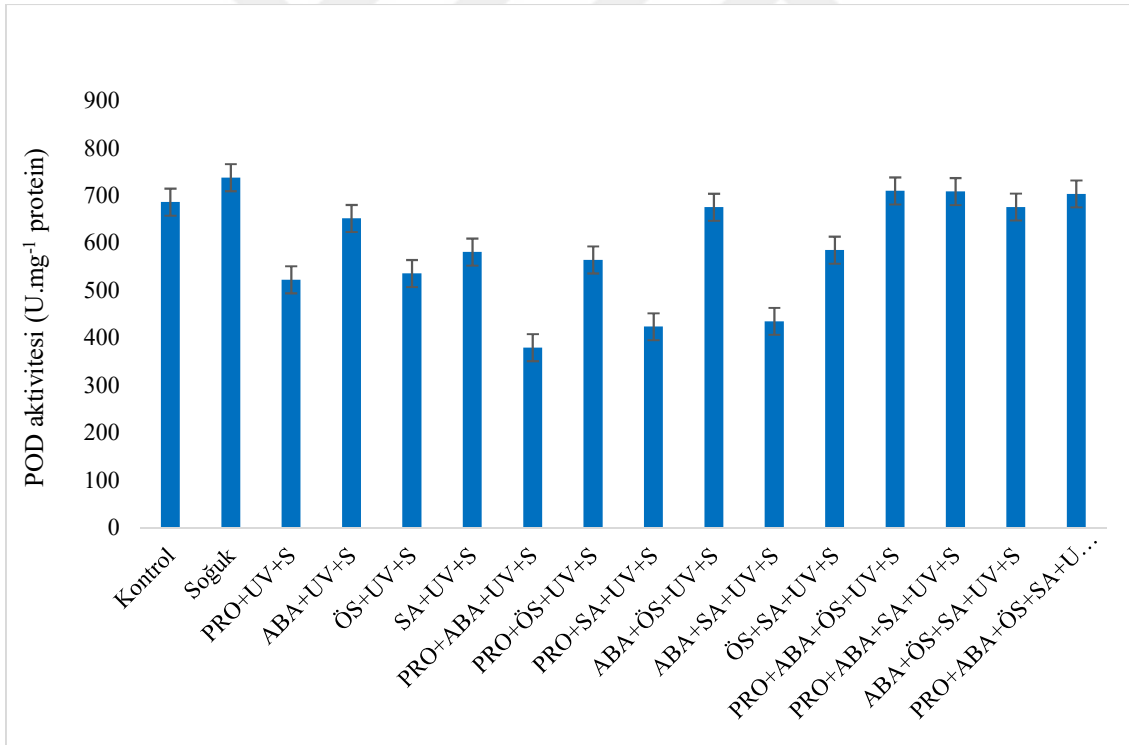
Tablo 12. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen POD aktivitesi

UYGULAMALAR	POD (U.mg ⁻¹ protein)
K	401,829±0,31e
S	714,110±0,23a
PRO	639,128±0,24b
ABA	618,754±0,17c
ÖS	610,503±0,21c
SA	552,432±0,19d
UV	671,860±0,18b
PRO.+S	425,843±0,23e
ABA+S	487,333±0,27e
ÖS+S	604,534±0,23c
SA+S	555,757±0,21d
UV+S	716,686±0,28a
PRO+UV+S	522,240±0,26d
ABA+UV+S	651,725±0,32b
ÖS+UV+S	535,552±0,24d
SA+UV+S	580,843±0,20d
PRO+ABA+UV+S	379,104±0,31f
PRO+ÖS+UV+S	564,104±0,27d
PRO+SA+UV+S	423,337±0,25e
ABA+ÖS+UV+S	675,361±0,23b
ABA+SA+UV+S	434,697±0,22e
ÖS+SA+UV+S	584,889±0,28d
PRO+ABA+ÖS+UV+S	709,840±0,49a
PRO+ABA+SA+UV+S	708,345±0,27a
ABA+ÖS+SA+UV+S	675,629±0,26b
PRO+ABA+ÖS+SA+UV+S	703,433±0,27a

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. * Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. *S= Soğuk uygulaması K= Kontrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit, UV= UV uygulanmış



Şekil 37. Tekli hormon uygulamalarında POD aktivitesi



Şekil 38. Çoklu hormon uygulamalarında POD aktivitesi

Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının APX Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

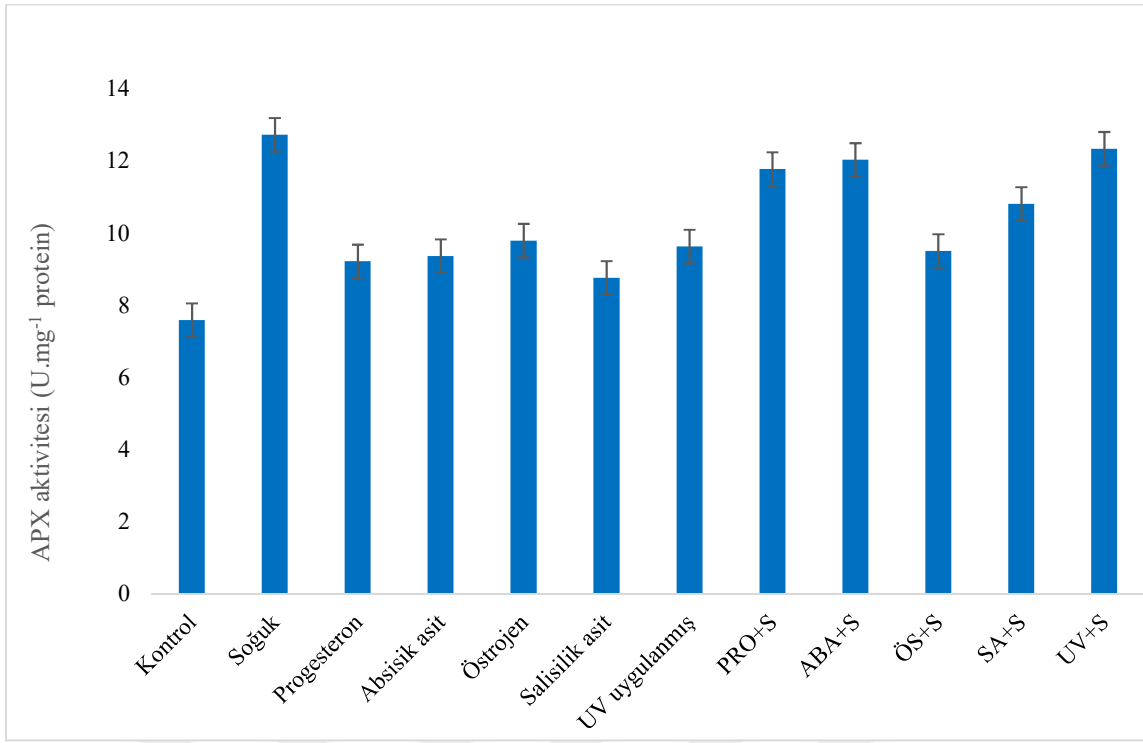
APX enzim aktivitesi, kontrol bitkisinde 7,59 U/mg protein olarak ölçülmüşken, soğuğa maruz kalmış fasulye bitkisinde 12,72 U/mg proteine yükselmiştir (Tablo 13). Yine aynı tablo

incelendiğinde, diğer tüm uygulamalardaki APX değerlerinin soğuk uygulamasıyla nispetle istatistiki açıdan çok önemli düşüşler gösterdiği kaydedilmiştir. Hatta bazı uygulamalardan alınan değerlerin (SA+UV+S'de 6,2; PRO+ABA+UV+S'de 6,3; ÖS+UV+S'de 6,8 U.mg⁻¹) kontrol bitkisinden bile düşük oldukları belirlenmiştir (Şekil 40 ve Şekil 41).

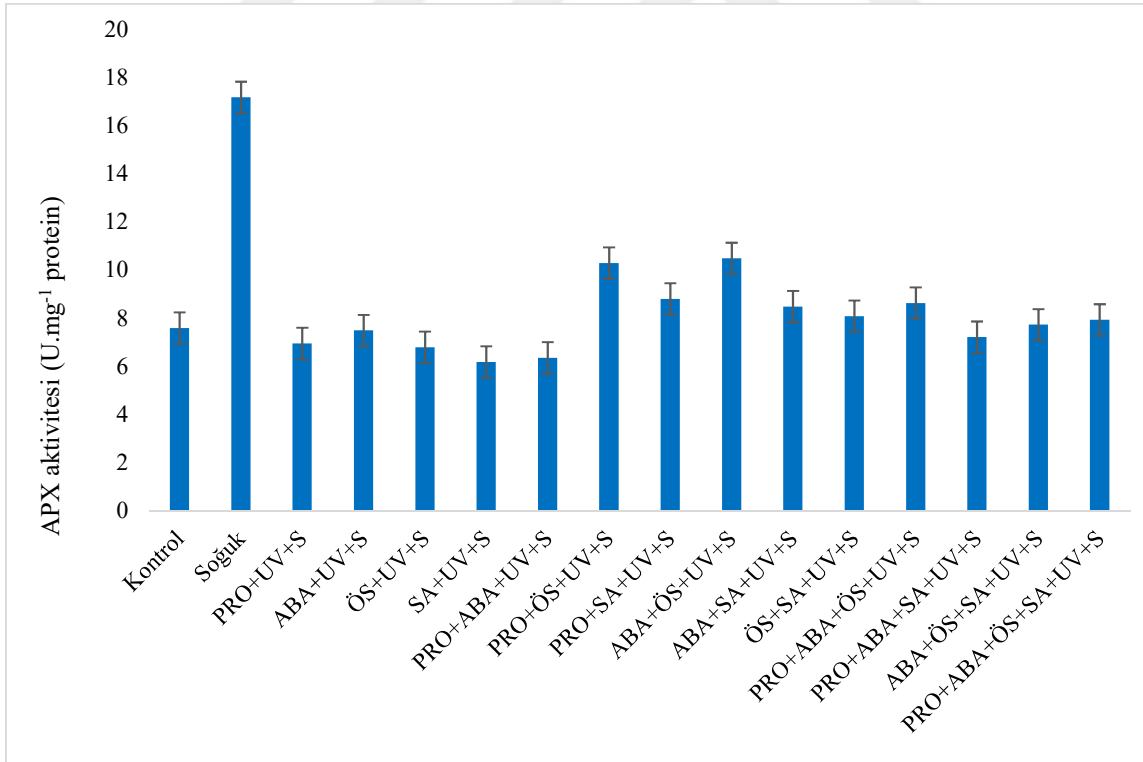
Tablo 13. APX aktivitesi

UYGULAMALAR	APX (U.mg ⁻¹ protein)
K	7,59±0,11d
S	12,72±0,24a
PRO	9,21±0,09c
ABA	9,36±0,1c
ÖS	9,79±0,26c
SA	8,75±0,22b
UV	9,63±0,18c
PRO.+S	11,77±0,21b
ABA+S	12,02±0,24a
ÖS+S	9,50±0,21c
SA+S	10,80±0,11b
UV+S	12,33±0,1a
PRO+UV+S	6,94±0,19e
ABA+UV+S	7,48±0,16d
ÖS+UV+S	6,79±0,12e
SA+UV+S	6,17±0,17f
PRO+ABA+UV+S	6,34±0,12e
PRO+ÖS+UV+S	10,29±0,13b
PRO+SA+UV+S	8,80±0,17d
ABA+ÖS+UV+S	10,49±0,21b
ABA+SA+UV+S	8,48±0,12d
ÖS+SA+UV+S	8,08±0,11d
PRO+ABA+ÖS+UV+S	8,63±0,16d
PRO+ABA+SA+UV+S	7,21±0,14de
ABA+ÖS+SA+UV+S	7,72±0,16d
PRO+ABA+ÖS+SA+UV+S	7,93±0,13d

. * Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. * Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. *S= Soğuk uygulaması K= Kontrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit, UV= UV uygulanmış



Şekil 39. Tekli hormon uygulamalarında APX aktivitesi



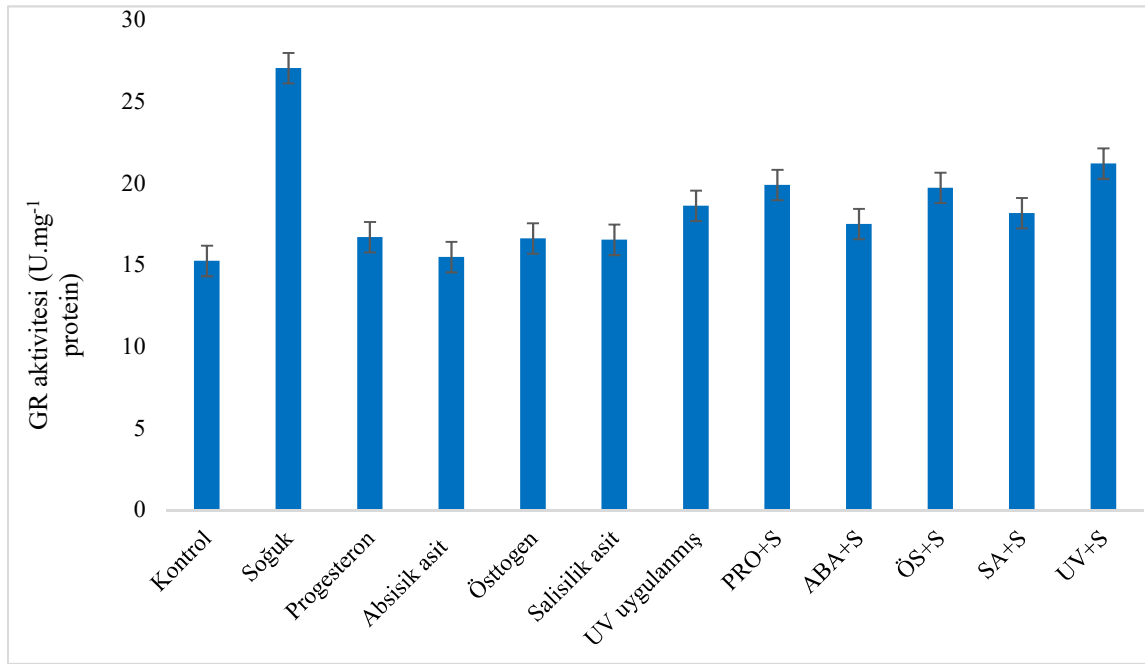
Şekil 40. Çoklu hormon uygulamalarında APX aktivitesi

Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının GR Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

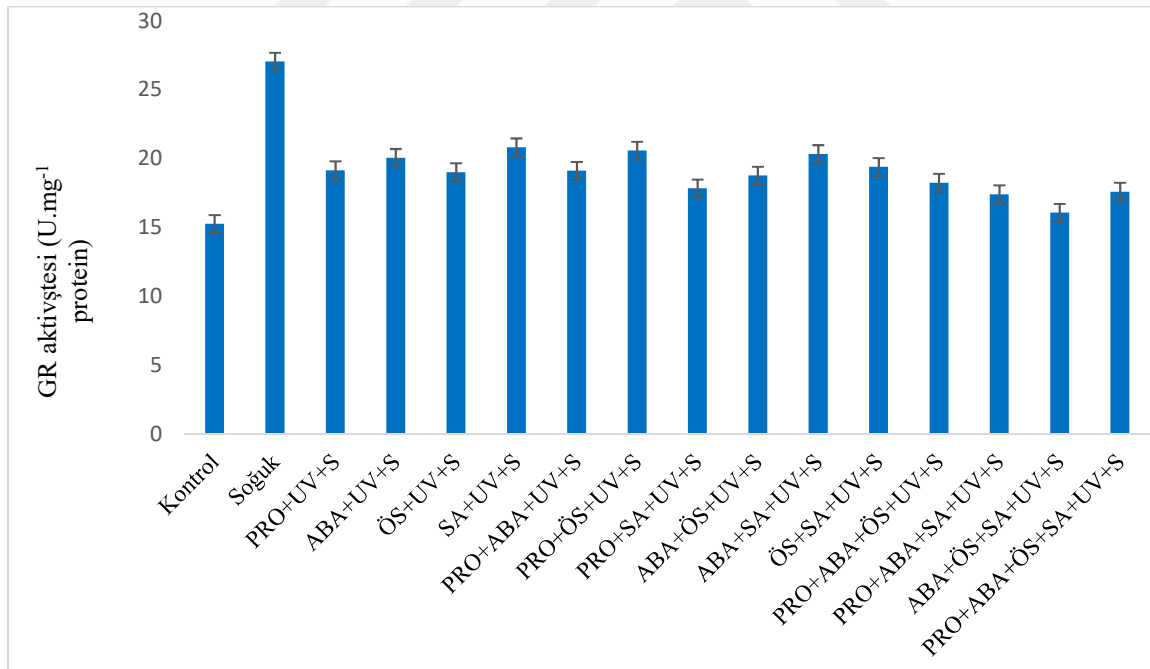
Diğer antioksidan enzimlerde olduğu gibi GR aktivitesi, soğuk uygulamasıyla (27,0 U.mg⁻¹ protein) kontrole (15,2 U.mg⁻¹ protein) göre önemli seviyede (%77 oranında) göre artış göstermiştir. Ancak soğuk uygulamasıyla karşılaştırıldığında, diğer tüm uygulamalardaki GR değerlerinin önemli seviyelerde düşük olduğu, en düşük değerlerin (kontrol haricinde) ABA (14,5 U.mg⁻¹ protein), ABA+ ÖS +SA+UV +S (16,1 U.mg⁻¹ protein), SA (16,5 U.mg⁻¹ protein), ÖS (16,6 U.mg⁻¹ protein) uygulamalarında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 14 ve Şekil 42 ve 43).

Tablo 14. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen GR aktivitesi

UYGULAMALAR	GR (U.mg ⁻¹ protein)
K	15,24±0,14f
S	27,03±0,35a
PRO	16,69±0,12e
ABA	15,47±0,09f
ÖS	16,61±0,08e
SA	16,53±0,12e
UV	18,61±0,15d
PRO+S	19,88±0,22b
ABA +S	17,50±0,16d
ÖS +S	19,71±0,18bc
SA +S	18,16±0,21d
UV +S	21,19±0,25b
PRO+ UV +S	19,13±0,14c
ABA+UV +S	20,04±0,24b
ÖS +UV +S	19,00±0,15cd
SA+UV +S	20,80±0,28b
PRO+ABA+UV +S	19,10±0,12c
PRO+ ÖS +UV +S	20,56±0,19b
PRO+SA+UV +S	17,82±0,18d
ABA+ ÖS +UV+S	18,75±0,19cd
ABA+SA+UV +S	20,32±0,31b
ÖS +SA+UV +S	19,38±0,25c
PRO+ABA+ ÖS +UV +S	18,23±0,18d
PRO+ABA+SA+UV+S	17,39±0,14d
ABA+ ÖS +SA+UV +S	16,05±0,12e
PRO+ABA +ÖS +SA+UV+S	17,58±0,11d



Şekil 41. Tekli hormon uygulamalarında GR aktivitesi



Şekil 42. Çoklu hormon uygulamalarında GR aktivitesi

Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Nitrat Redüktaz (NR) Aktivitesi Üzerine Etkisi

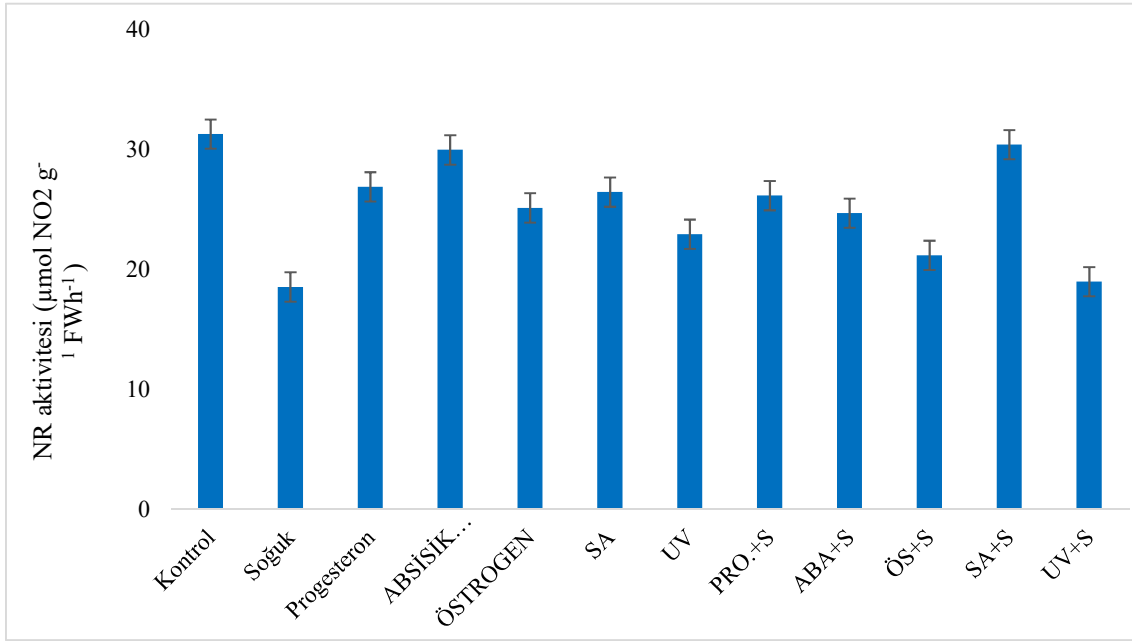
Nitrat redüktaz (NR) hücre ortamında nitrati (NO_3), nitrite (NO_2) indirgeyen bir enzimdir. Enzim aktivitesi belirlenirken ortamda enzim tarafından türetilen NO_2 miktarı hesaplanarak aktivite belirlenmektedir. Fasulyenin yapraklarında bütün uygulama gruplarında NR aktivitesi ölçülmüş ve veriler Tablo 15'te sunulmuştur. Tablo 15 incelendiğinde, soğuk

uygulamasını NR aktivitesini kontrole göre düşürmüştür. Diğer taraftan, soğuk uygulamasına göre, hemen hemen tüm tekli veya kombine uygulanan hormonlar NR aktivitesini artırmıştır. Çoğu gruplarda NR aktivitesindeki artış soğuk uygulamaya nispetle %50'den fazla olmuştur. Kontrol haricinde, diğer tüm uygulamalar içinde en yüksek NR aktivitelerinin ABA+ ÖS +UV+S (32,2 $\mu\text{mol NO}_2$), SA +S (30,4 $\mu\text{mol NO}_2$) ve ABA (30,0 $\mu\text{mol NO}_2$) uygulamalarında ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Şekil 44 ve 45).

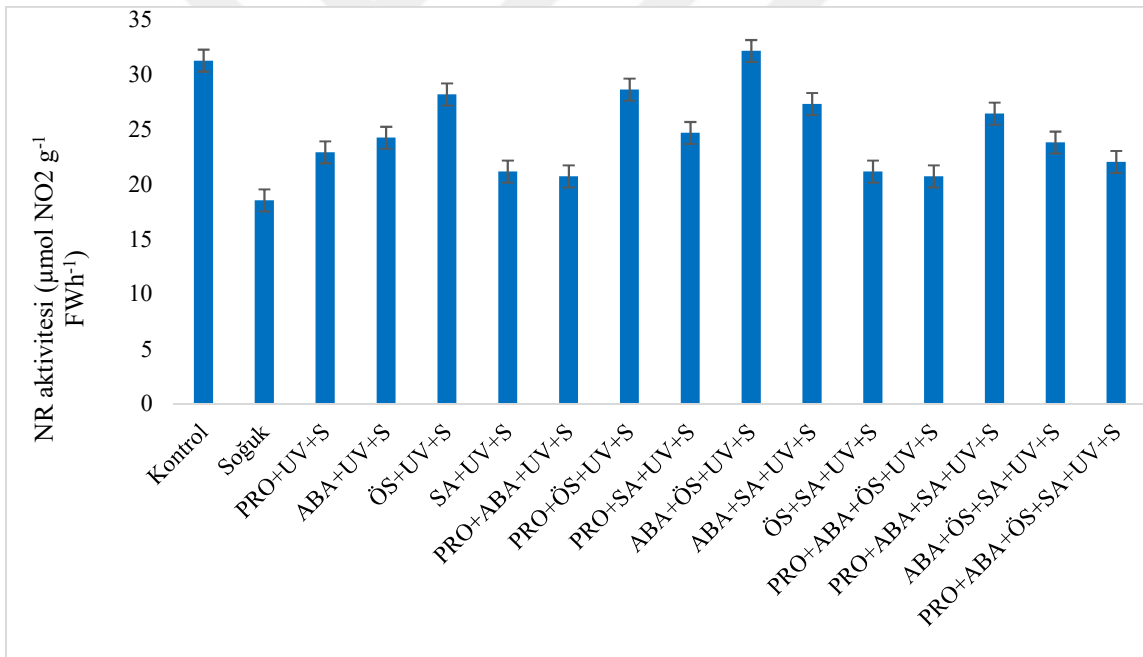
Tablo 15. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen NR aktivitesi

UYGULAMALAR	NR aktivitesi ($\mu\text{mol NO}_2/\text{gr yaş ağırlık}$)
K	31,29 $\pm$ 0,35a
S	18,45 $\pm$ 0,31f
PRO	26,90 $\pm$ 0,28c
ABA	29,97 $\pm$ 0,38b
ÖS	25,14 $\pm$ 0,19d
SA	26,46 $\pm$ 0,24c
UV	22,94 $\pm$ 0,21e
PRO+S	26,16 $\pm$ 0,35c
ABA +S	24,70 $\pm$ 0,18d
ÖS +S	21,18 $\pm$ 0,25e
SA +S	30,41 $\pm$ 0,32b
UV +S	18,98 $\pm$ 0,16f
PRO+ UV +S	22,79 $\pm$ 0,26e
ABA+UV +S	24,63 $\pm$ 0,16d
ÖS +UV +S	28,21 $\pm$ 0,29b
SA+UV +S	21,47 $\pm$ 0,21e
PRO+ABA+UV +S	20,74 $\pm$ 0,18e
PRO+ ÖS +UV +S	28,65 $\pm$ 0,31b
PRO+SA+UV +S	24,41 $\pm$ 0,12d
ABA+ ÖS +UV+S	32,17 $\pm$ 0,29a
ABA+SA+UV +S	27,34 $\pm$ 0,21c
ÖS +SA+UV +S	21,62 $\pm$ 0,14e
PRO+ABA+ β -Ö +UV +S	20,74 $\pm$ 0,25e
PRO+ABA+SA+UV+S	26,46 $\pm$ 0,32c
ABA+ ÖS +SA+UV +S	23,82 $\pm$ 0,18d
PRO+ABA +ÖS +SA+UV+S	22,06 $\pm$ 0,22e

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. * Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. *S= Soğuk uygulaması K= Kontrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit, UV= UV uygulanmış



Şekil 43. Tekli hormon uygulamalarında NR aktivitesi



Şekil 44. Çoklu hormon uygulamalarında NR aktivitesi

Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Nitrit Redüktaz (NiR) Aktivitesi Üzerine Etkisi

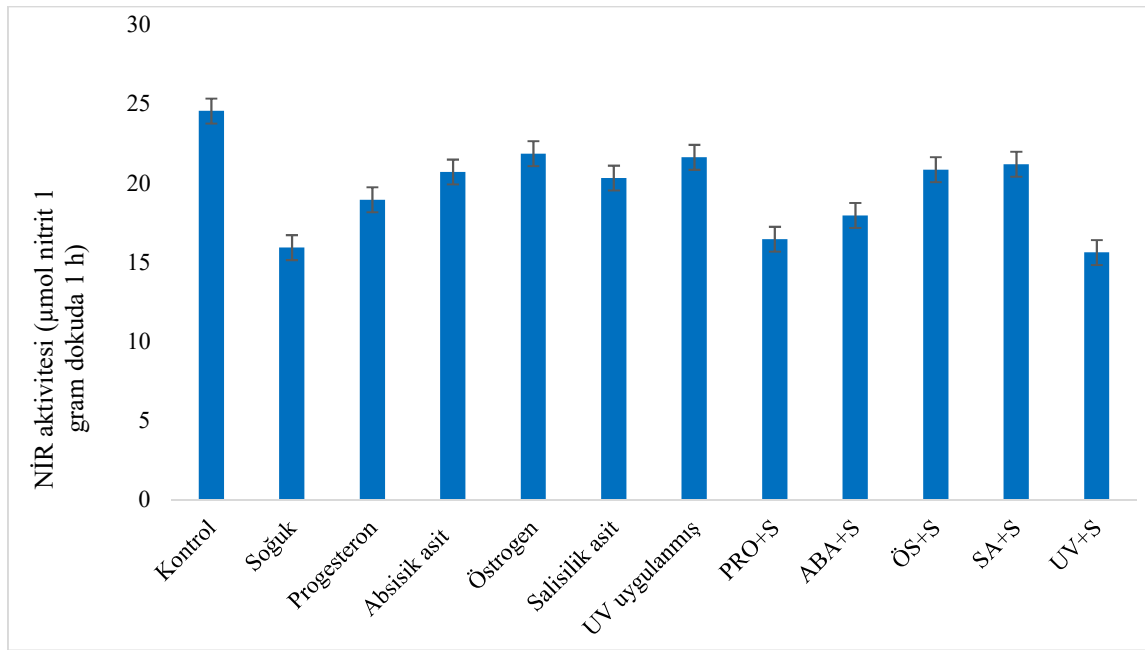
Nitrit redüktaz (NiR) hücre ortamında nitriti (NO₂), amonyuma (NH₄) indirgeyen bir enzimdir. Enzim aktivitesi belirlenirken ortamda enzim tarafından tüketilen NO₂ miktarı hesaplanarak aktivite belirlenmektedir. Çalışmamızda NiR aktivitesi verileri Tablo 16'da sunulmuştur. Tablo 16 incelendiğinde, soğuk uygulaması NiR aktivitesini kontrole göre düşürmüştür. Buna karşılık, soğuk uygulamasına göre, hemen hemen tüm tekli veya kombine uygulanan hormonlar NiR aktivitesini artırmıştır. Örneğin soğuk uygulamasında NiR aktivitesi

15,9 $\mu\text{mol NO}_2/\text{gr}$ iken, hormon uygulamalarında aktivite bu değerden daha yukarı seviyelere çıkmıştır. Tekli hormon uygulamalarında NiR aktivitesi artışı en çok estradiolda olmuş ve 20,8 $\mu\text{mol NO}_2/\text{gr}$ 'a yükselmiştir. Çoklu hormon uygulamalarında NiR artışı en çok (ÖS +SA+UV+S)'da olmuş ve 22,8 $\mu\text{mol NO}_2/\text{gr}$ 'a yükselmiştir (Tablo 16 ve Şekil 46 ve Şekil 47).

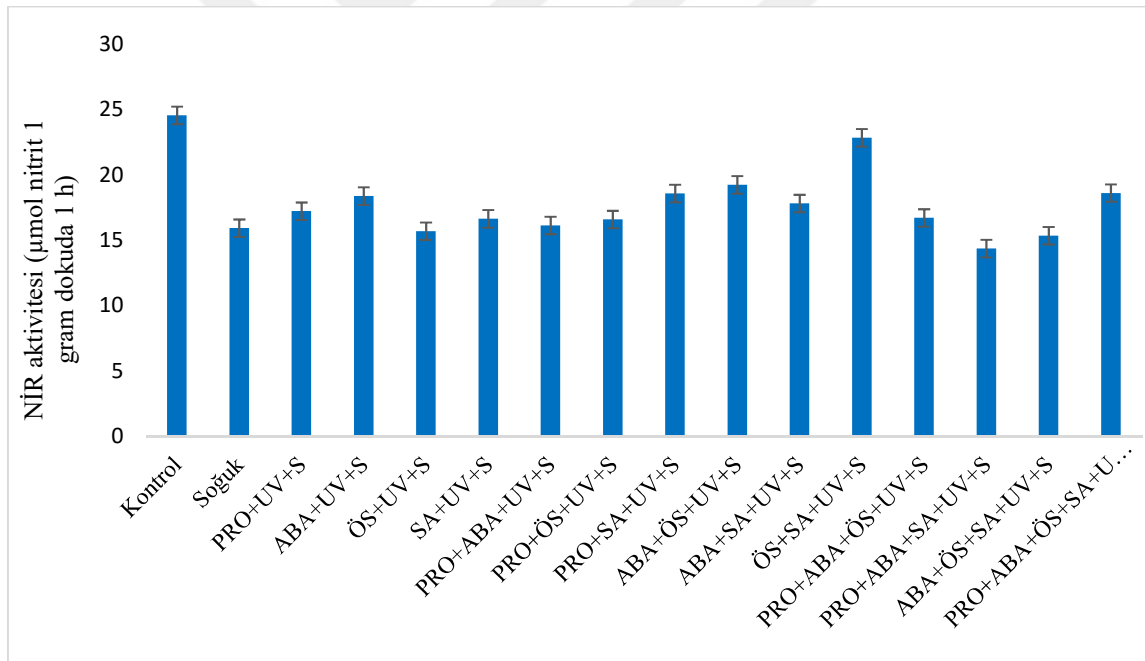
Tablo 16. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen NiR aktivitesi

UYGULAMALAR	NiR aktivitesi ($\mu\text{mol NO}_2/\text{g}$ yaş ağırlık)
K	24,55 $\pm$ 0.42a
S	15,91 $\pm$ 0.29e
PRO	18,94 $\pm$ 0,36c
ABA	20,69 $\pm$ 0.26b
ÖS	21,85 $\pm$ 0,43b
SA	20,31 $\pm$ 0.15b
UV	21,62 $\pm$ 0.32b
PRO+S	16,45 $\pm$ 0,21de
ABA +S	17,94 $\pm$ 0,25d
ÖS +S	20,84 $\pm$ 0,38b
SA +S	21,18 $\pm$ 0,43b
UV +S	15,61 $\pm$ 0,14e
PRO+ UV +S	17,22 $\pm$ 0,31d
ABA+UV +S	18,37 $\pm$ 0,35cd
ÖS +UV +S	15,69 $\pm$ 0,22e
SA+UV +S	16,64 $\pm$ 0,15d
PRO+ABA+UV +S	16,13 $\pm$ 0,28de
PRO+ ÖS +UV +S	16,58 $\pm$ 0,25d
PRO+SA+UV +S	18,57 $\pm$ 0,14c
ABA+ ÖS +UV+S	19,23 $\pm$ 0,29c
ABA+SA+UV +S	17,81 $\pm$ 0,15d
ÖS +SA+UV +S	22,83 $\pm$ 0,42b
PRO+ABA+ ÖS +UV +S	16,70 $\pm$ 0,22d
PRO+ABA+SA+UV+S	14,36 $\pm$ 0,16f
ABA+ ÖS +SA+UV +S	15,35 $\pm$ 0,28e
PRO+ABA +ÖS +SA+UV+S	18,61 $\pm$ 0,24c

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. * Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. *S= Soğuk uygulaması K= Kontrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit, UV= UV uygulanmış



Şekil 45. Tekli hormon uygulamalarında NiR aktivitesi



Şekil 46. Çoklu hormon uygulamalarında NiR aktivitesi

Soğuk, UV ve Hormon Uygulamalarının Glutamin Sentaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

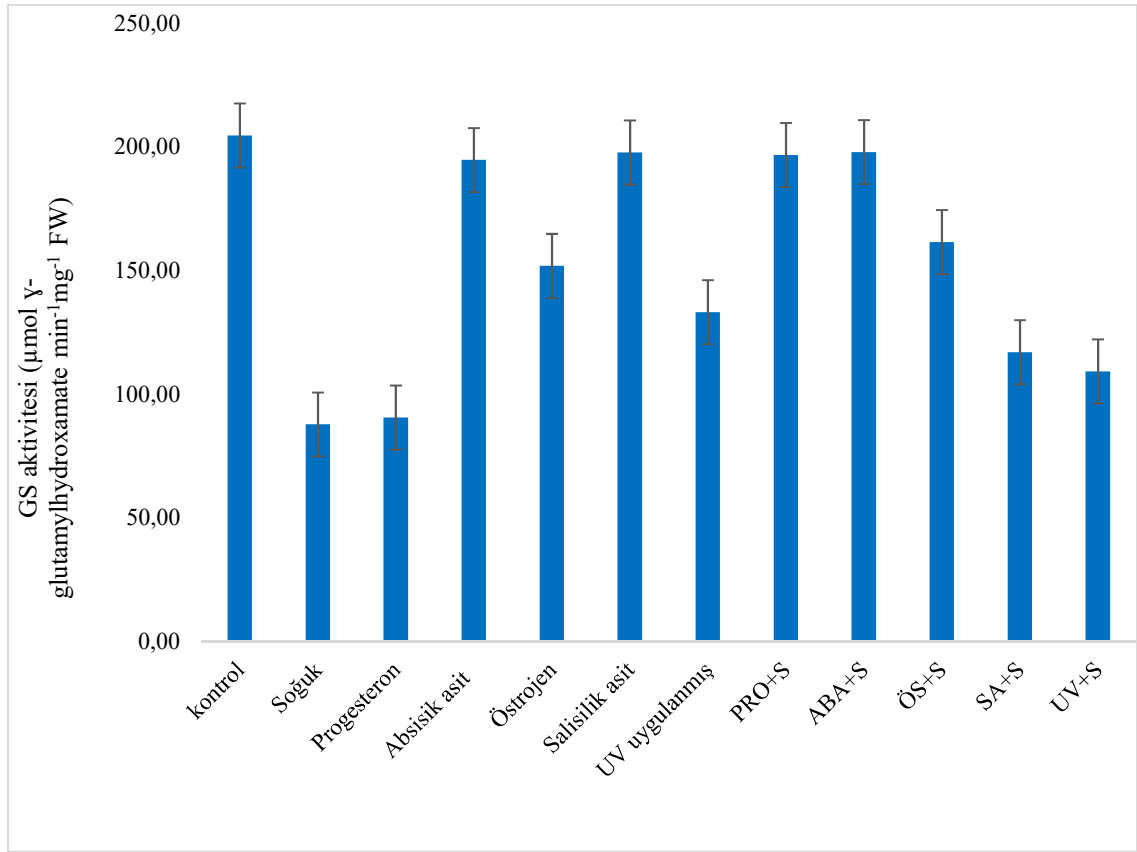
Bitki hücrelerinde glutamin sentetaz (GS), NH_4 'ü ATP harcayarak glutamata aktararak glutamin oluşturur. Çalışmamızda, kontrole göre kıyaslandığında, GS aktivitesi soğuğa maruz kalmış fasulye bitkisinde 204,63 U/gr'dan 107,89 U/gr dokuya düşmüştür. Soğuğun etkisini azaltmak için uygulanan hormonlar genel olarak değerlendirildiğinde soğuk uygulamaya göre GS aktivitesini artırmıştır. UV+soğuk uygulamasında da GS aktivitesinin (109,28 U/gr)

kontrole göre düştüğü belirlenmiştir. UV ve soğukun GS aktivitesini düşürmedeki etkisi uygulanan hormonlar tarafından genelde iyileştirilmiştir. Soğuk uygulamaya göre en yüksek aktivite artışı ABA+S, PRO+S, ABA+ÖS+SA+UV+S uygulamalarında ortaya çıktığı görülmüştür (Tablo 17, Şekil 48 ve 49)

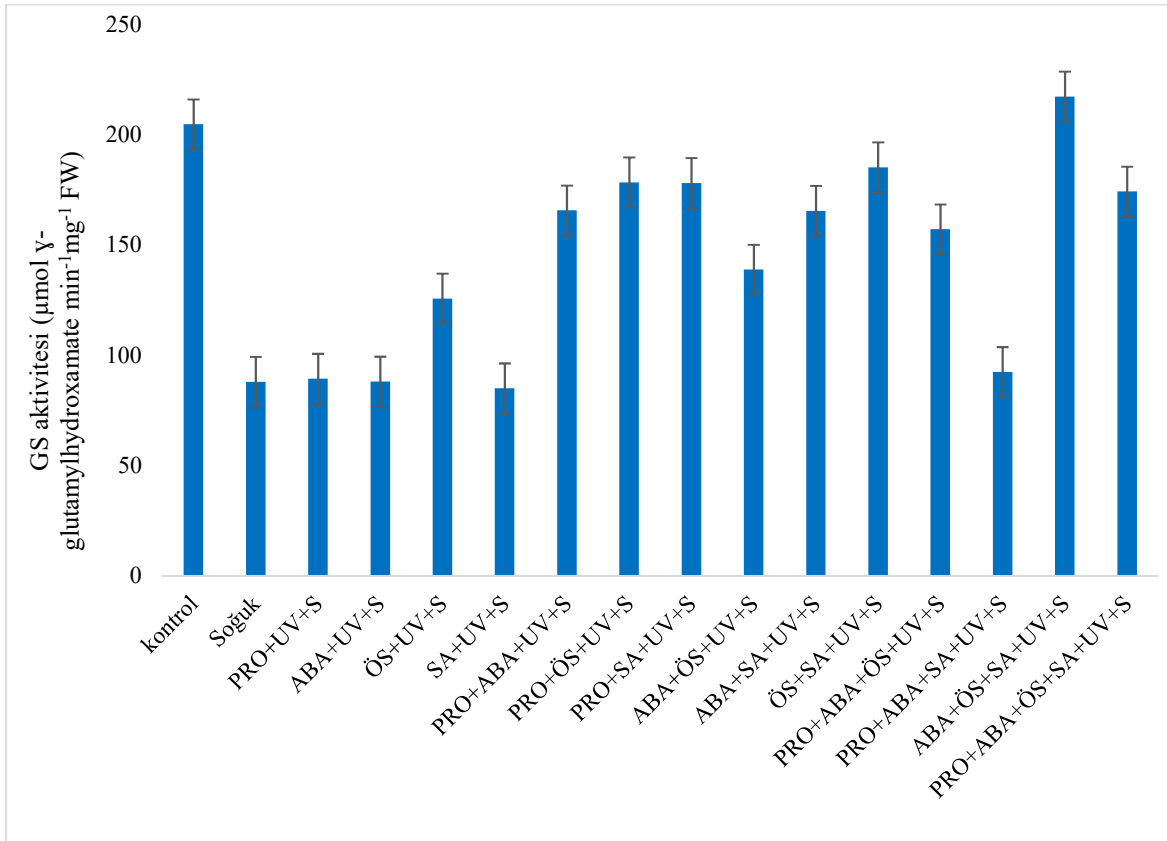
Tablo 17. Soğuk ve yapılan diğer tüm uygulamalarda belirlenen GS aktivitesi

UYGULAMALAR	GS aktivitesi ($\mu\text{mol } \gamma\text{-glutamylhydroxamate min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ FW}$)
K	204,63 $\pm$ 0,32a
S	107,89 $\pm$ 0,28f
PRO	190,60 $\pm$ 0,26b
ABA	194,72 $\pm$ 0,35b
ÖS	151,90 $\pm$ 0,25d
SA	197,74 $\pm$ 0,35b
UV	133,21 $\pm$ 0,25d
PRO+S	196,74 $\pm$ 0,33b
ABA +S	197,91 $\pm$ 0,36b
ÖS +S	161,52 $\pm$ 0,29c
SA +S	116,99 $\pm$ 0,32e
UV +S	109,28 $\pm$ 0,28e
PRO+ UV +S	109,30 $\pm$ 0,36e
ABA+UV +S	107,19 $\pm$ 0,26f
ÖS +UV +S	125,60 $\pm$ 0,31e
SA+UV +S	104,28 $\pm$ 0,35f
PRO+ABA+UV +S	165,60 $\pm$ 0,29c
PRO+ ÖS +UV +S	178,34 $\pm$ 0,36c
PRO+SA+UV +S	178,01 $\pm$ 0,32c
ABA+ ÖS +UV+S	138,72 $\pm$ 0,19d
ABA+SA+UV +S	165,37 $\pm$ 0,26c
ÖS +SA+UV +S	185,11 $\pm$ 0,36b
PRO+ABA+ ÖS +UV +S	157,03 $\pm$ 0,33d
PRO+ABA+SA+UV+S	112,30 $\pm$ 0,31e
ABA+ ÖS +SA+UV +S	217,22 $\pm$ 0,43a
PRO+ABA +ÖS +SA+UV+S	174,16 $\pm$ 0,29c

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. * Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. *S= Soğuk uygulaması K= Kontrol, PRO= Progesteron, ABA= Absisik asit, ÖS= Östrojen, SA= Salisilik asit, UV= UV uygulanmış



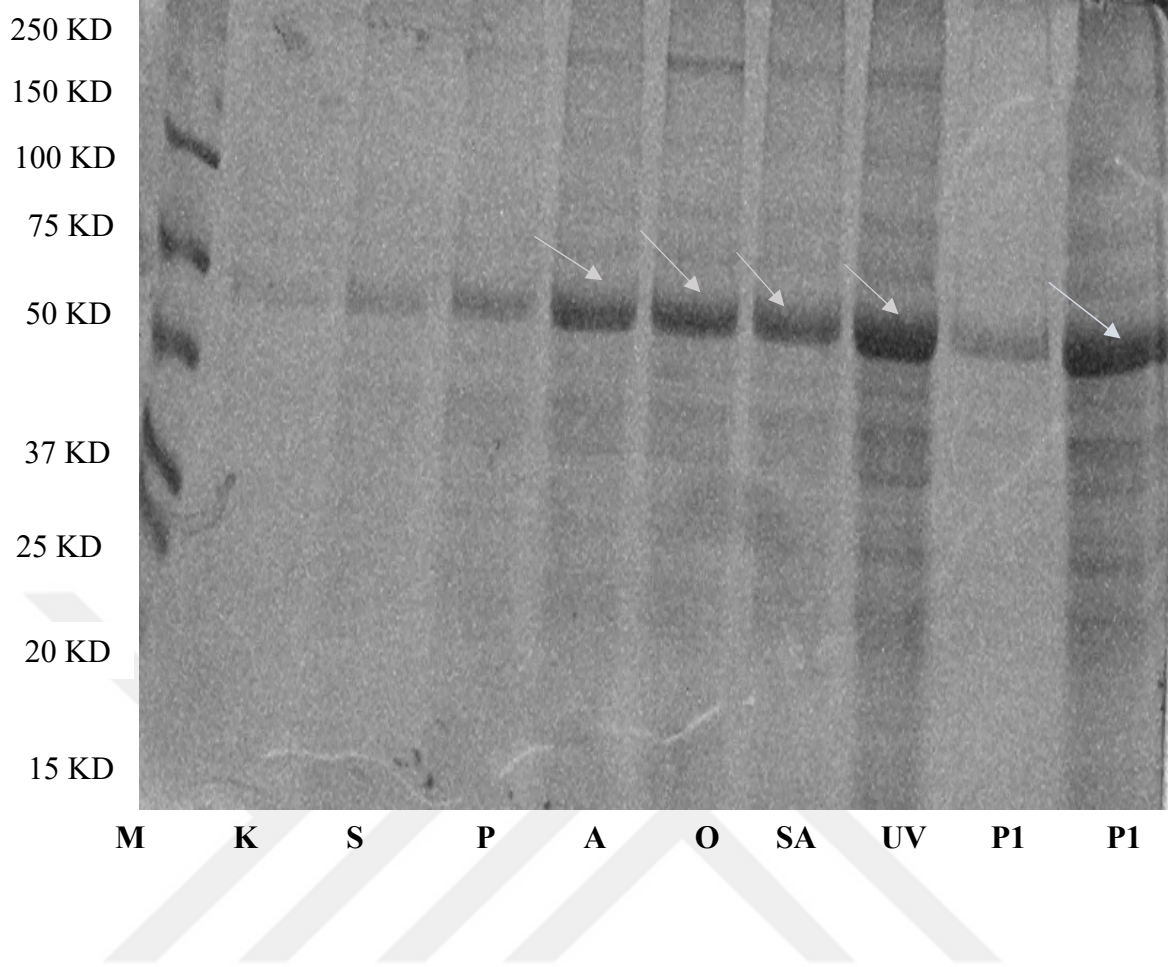
Şekil 47. Tekli hormon uygulamalarında GS aktivitesi



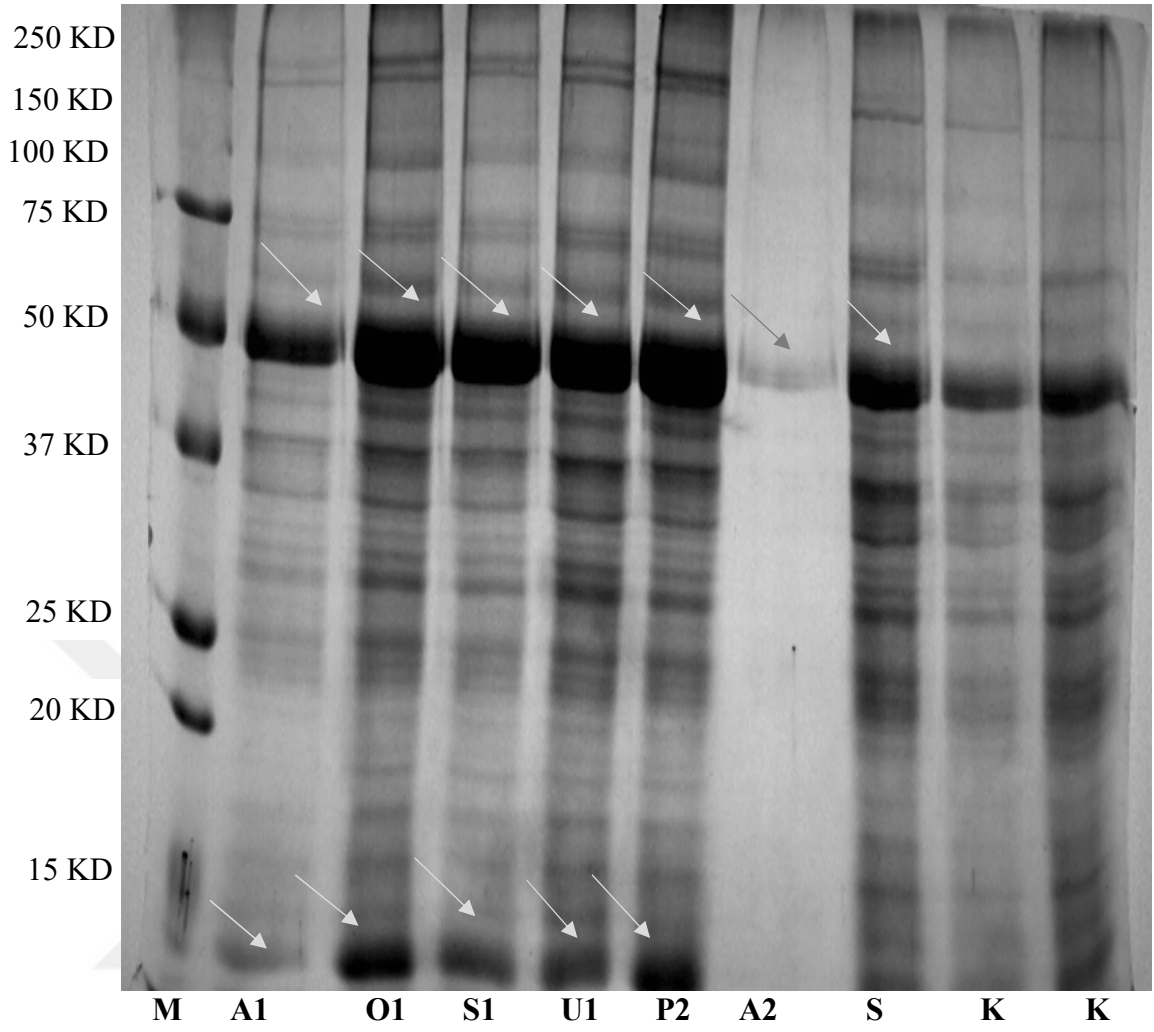
Şekil 48. Çoklu hormon uygulamalarında GS aktivitesi

SDS-PAGE Elektroforezinden Elde Edilen Bulgular

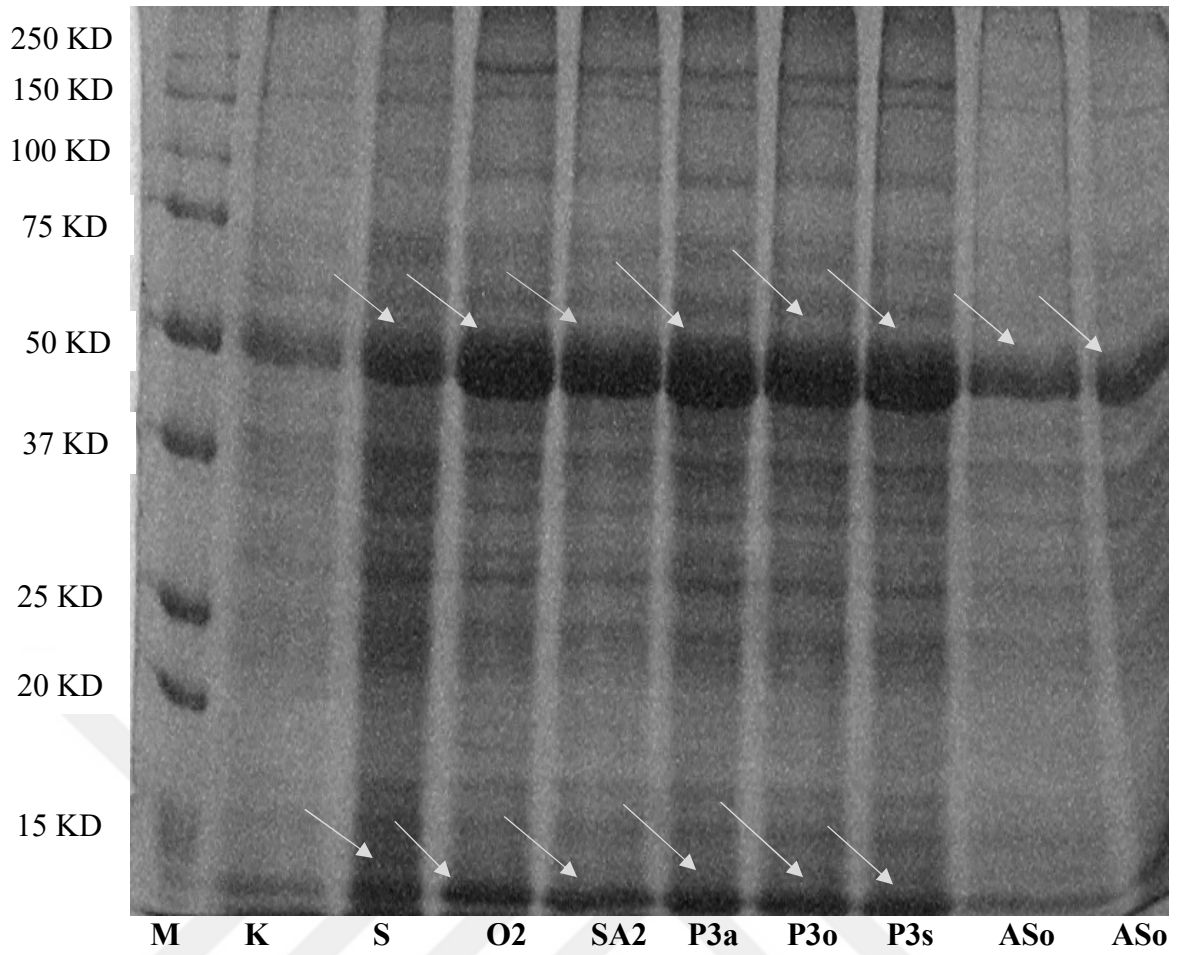
Bu bölümde, fasulye bitkisinin yapraklarından elde edilen hücresel çözünebilir total proteinler SDS-PAGE sisteminde yürütülerek standart proteinlere göre molekül ağırlıkları belirlenmiştir (Şekil 50-53). Çalışmada özellikle miktarı artan veya yeniden sentezlenen proteinler öne çıkarılmaya çalışılmıştır. Bulgularımızda fasulye total proteinlerinin standart proteinlerle kıyaslandığında, 15 ile 150 KDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 37-50 KDa arasındaki proteinlerde önemli farklar göze çarpmaktadır. Bu civarda soğuk uygulamasıyla şiddetin arttığı, hormon uygulamalarında da ekstra bazı bantların oluştuğu dikkat çekmektedir.



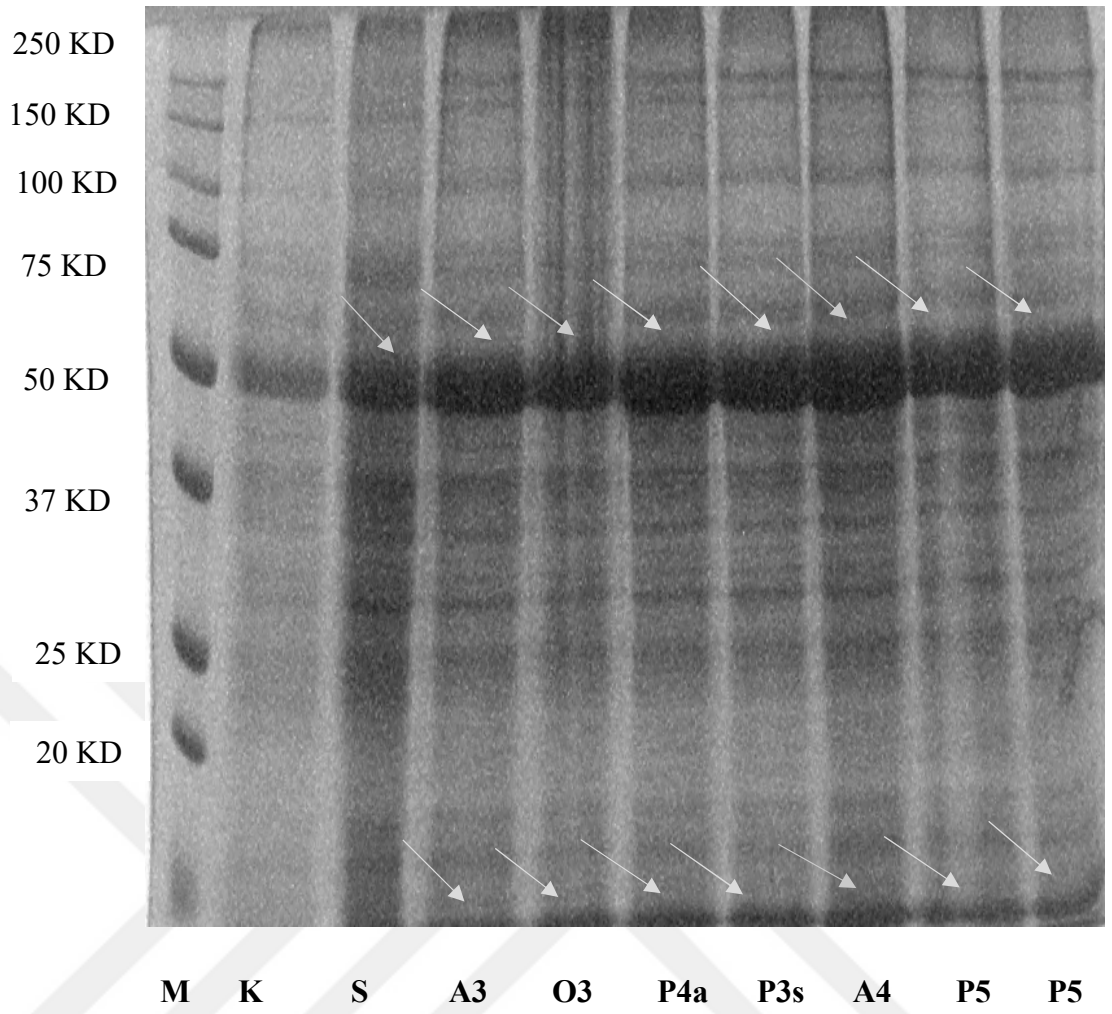
Şekil 49. Fasulye bitkisinin protein jel görüntüsü; M; (Standart proteinler), K; kontrol S;Soğuk, P; progesteron, A; absisik asit, O; estradiol, SA; salisilik asit, UV; Ultraviyole, P1; PRO+S



Şekil 50. Fasulye bitkisinin protein jel görüntüsü; M; (Standart proteinler), K; kontrol, S; Soğuk A1; ABA+S, O1; ÖS+S, S1; SA+S, U1; UV+S, P2; PRO+UV+S, A2; ABA+UV+S



Şekil 51. Fasulye bitkisinin protein jel görüntüsü; M; (Standart proteinler), K; Kontrol, S; Soğuk O₂; ÖS+UV+S, SA₂; SA+UV+S, P_{3a}; PRO+ABA+UV+S, P_{3o}; PRO+ÖS+UV+S, P_{3s}; PRO+SA+UV+S, A_{3o}; ABA+ÖS+UV+S



Şekil 52. Fasulye bitkisinin protein jel görüntüsü; M; (Standart proteinler), K; Kontrol, S; Soğuk A3s; ABA+SA+UV+S, O3s; ÖS+SA+UV+S,P4a; PRO+ABA+ÖS+UV+S,P3s; PRO+ABA+SA+UV+S, A4; ABA+ÖS+SA+UV+S, P5; PRO+ABA+ÖS+SA+UV+S

TARTIŞMA VE SONUÇ

Tartışma

Soğuk stresinde bitkilerde meydana gelen çeşitli morfolojik ve fizyolojik bozulmaların iyileştirilmesi amacıyla çeşitli araştırmalar yapılmış ve soğuk stresini az da olsa tolere etmek amaçlanmıştır (Baxter *et al.* 2013). Bu amaçla çeşitli kimyevi maddeler, bitki büyüme düzenleyicileri ve fiziksel faktörler kullanılmıştır (Battal *et al.* 2008; Kumar *et al.* 2008; Cheng *et al.* 2016).

Bu çalışmada kullanılan bitki türü olan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L., cv. Lunatus) en çok üretilen ve tarımı yapılan baklagil çeşididir. Soğuk ve UV radyasyonu etkisini azaltmak için kullanılan bitki hormonları (salisilik asit, absisik asit) ve memeli cinsiyet hormonları (östrojen, progesteron) ve UV radyasyonu kullanılmış ve elde edilen veriler çeşitli araştırma bulgularıyla tartışılmıştır.

Soğuk stresine en hızlı tepki olarak bilinen kök uzaması ve gövde büyümesi bitkilerin strese karşı toleransını belirlemek için kullanılmaktadır. Soğuğa maruz kalan bitkilerin kök yapısında ve gövde boyunda kısaltmalar gözlemlenmiştir. Örneğin; Liu vd. (2010)'nin yaptıkları çalışmada buğday bitkisinde soğukta kök ve gövde uzunluklarında azalma belirlemişlerdir. Benzer bir soğuğa maruz kalan çalışmada Dumlupınar (2000) fasulye bitkisinde kök ve gövde uzunluklarında azalma belirlenmiştir. Düşük sıcaklığın etkisiyle su alınımlı, karbon asimilasyonu azalır ve bu nedenle kök, gövde uzaması ve kuru ağırlık miktarında kontrole göre düşüşler gözlemlenmektedir (Feng 1995; Liu *et al.* 2010). Correia vd. (2005) yüksek seviyede UV radyasyonuna maruz kalan *Triticum aestivum*'un biyokütlesinde azalma saptamışlardır. Yaptığımız çalışmada da literatürde olduğu gibi kök gövde uzunluğu ve kuru madde miktarlarında azalma belirlenmiştir (Tablo 1. ve Tablo 2). Çeşitli streslere maruz kalan bitkilerde iyileştirme için kullanılan SA ve ABA uygulamalarında kök gövde uzunluğu ve kuru madde de artışlar ölçülmüştür (Mutlu 2009;2013). Bu kapsamda kullanılan diğer bir uygulama olan memeli cinsiyet hormonları ise yapılan çalışmalarda bu faktörleri artırdığı belirlenmiştir (Tossi *et al.* 2009; Erdal 2010). Bu araştırmada da soğuk ve Soğuk + UV stresinin etkilerini azaltmak için kullanılan bitki hormonlarının kök gövde uzunluğunu artırdığını ve ilave olarak ABA'nın gövde uzunluğunu, SA'nın ise kök uzunluğunu artırdığını tespit ettik. Memeli cinsiyet hormonları uygulamalarında ise progesteronun gövde uzunluğunu, östrojenin ise kök uzunluğunu daha fazla artırdığını gözlemledik. Çoklu hormon uygulamaları da genel olarak kök ve gövde uzunluklarını artırmıştır (Tablo 1). Kuru madde ağırlıklarında ise; bitki

hormonlarında ABA'nın etkisi fazla iken cinsiyet hormonlarında progesteronun daha iyi olduğu bulunmuştur (Tablo 2.).

Çözünebilir protein ve şeker içerikleri, bitki metabolizmasındaki dönüşümlü ve dönüşümsüz değişikliklerin belirlenmesinde çok önemli göstergelerdir. Bitkilerdeki dışsal farklılaşma, genellikle dokulardaki protein ve karbohidratların değişimleriyle yorumlanır. Bu yüzden protein ve şeker içerikleri, bitki büyüme ve gelişmesinin indikatörleri olarak düşünülmektedir (Dogra and Kaur 1994).

Mevcut çalışmada soğuk uygulanan bitkilerde protein miktarında artış görülmüştür. UV + Soğuk uygulanan bitkilerde ise protein miktarında ciddi azalış olduğu tespit edilmiştir. Stres şartlarının etkisini azaltmak için kullanılan iyileştiricilerde protein miktarında soğuk uygulamasında azalış, UV+ Soğuk'a göre ise artış tespit edilmiştir. Çoklu uygulamalarda ise; genel olarak artış gözlemlenmiştir (Tablo 3, Şekil 20 ve 21). Protein miktarındaki azalış, stres proteinlerinin azalmasına, artışlar ise bitki büyümesine paralel olarak yapı proteinlerinde ve antioksidan enzimleri içeren protein miktarlarının artışına bağlanabilir (Yacoob and Filion 1987).

Bu çalışmada soğuk uygulanan bitkide şeker miktarında artış belirlenmiştir. Bu durum soğuk uygulamasıyla bozulan hücre içi osmotik dengenin, bitki bünyesinde şeker gibi osmolit miktarlarının artırılması yoluyla regüle edilmesi çabasına atfedilebilir (Sharma et al. 2019).

UV + Soğuk uygulanan bitkilerde ise şeker miktarında da azalış kayıt edilmiştir. Bu düşüş ise soğuk koşullardaki osmolit regülasyonun UV uygulaması ile sekteye uğramasına bağlanabilir. UV ve Soğuk etkisini azaltmak için kullanılan iyileştiricilerde şeker miktarında soğuk kontrole uygulamasında azalış tespit edilmiştir. Çoklu uygulamalarda ise genel olarak artış gözlemlenmiştir (Tablo 9, Şekil 32 ve 4.18). Stres koşullarını hafifletmek için kullanılan söz konusu iyileştiricilerin soğuk koşulların etkisini farklı mekanizmalarla hafiflettiğine ve böylece içsel osmolit artışına ihtiyacın azaldığı şeklinde yorumlanabilir.

Soğuk stresinde klorofil miktarında düşüş olduğu çeşitli araştırmalarda belirlenmiştir. Aynı zamanda UV stresinde klorofil miktarında artış belirlenmiştir (Berli *et al.* 2010). Literatür çalışmalarıyla benzerlik gösteren çalışmamızda soğukta toplam klorofil miktarında düşüş kaydedilmiş, UV uygulamasında ise soğuğa göre artış kaydedilmiştir (Tablo 4). Bitki hormon uygulamalarında klorofil miktarındaki artış, cinsiyet hormonları uygulamalarında da toplam klorofil miktarında artış olduğu araştırmalarda belirtilmiştir (Mutlu 2009; Erdal 2010, Berli *et al.* 2010; Mutlu 2013). Soğuk ve soğuk + UV stresinin olumsuz etkilerini düşürmek için kullanılan bitki hormonlarından en fazla SA klorofil içeriğini artırırken cinsiyet hormonların da ise en fazla artış progesteron uygulaması ile elde edilmiştir (Tablo 4 Şekil 22). Çoklu hormon

uygulamalarında ise her farklı kombinasyonda toplam klorofil miktarında artış tespit edilmiştir (Tablo 4 ve Şekil 23). Bu durum soğuk uygulaması ile sekteye uğrayan klorofil sentezinin, bitki hormonlarının ve memeli cinsiyet hormonlarının sinyal görevi görerek artırmasına atfedilebilir. Bazı çalışmalarda memeli cinsiyet hormonlarının metabolik yollarda uyarıcı etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (Speranza 2010; Janeczko and Skoczowski 2005).

Stres koşullarına bırakılan tüm bitkilerde bilinen ROT miktarlarında önemli derecelerde çoğalmalar olmakta, artış olan ROT seviyesine paralel olarak metabolik ve anatomik deformasyonların yükseltiği de artmaktadır. Stres durumlarında bitkilerde hasar meydana gelir ki bu hasrın büyüklüğü ve bitkilere etkili olan stresin büyüklüğünü göstermek için genelde lipid peroksidasyon seviyesi (MDA olarak) iyi bir indikatör olarak kabul edilmektedir (Nayyar *et al.* 2005).

ROT'lar en başta hücre zarlarında poliansature yağ asitlere saldırarak, strese neden olabildiği gibi gösterdiği, artan ROT seviyesi organellerin membranlarında da hasar miktarı artışına neden olur. Örneğin, soğuk stresi ile ilgili bir çalışmada, Li vd. (2011) hıyar bitkisinin yapraklarında MDA, O_2^- , H_2O_2 miktarlarında artış olduğunu belirlemiştir. Diğer benzer bir çalışmada Esim vd. (2011) mısırdaki soğuk uygulamasıyla H_2O_2 ile O_2^- miktarının ve MDA seviyesinin arttığını belirlemiştir. Soğuk stresi buğdayda MDA, H_2O_2 ve O_2^- seviyelerini artırdığı da rapor edilmiştir (Esim *et al.* 2012). UV stresine maruz kalan bitkilerde örneğin mısır bitkisinde H_2O_2 miktarında artış belirlenmiştir (Tossi *et al.* 2009). UV stresini azaltmak için kullanılan ABA H_2O_2 miktarında belirgin şekilde düşüşe sebep olmuştur (tossi *et al.* 2009; Chen *et al.* 2010). Diğer bitki hormonu olan SA ise çeşitli stres şartlarında oluşan H_2O_2 miktarında düşüş sağlamıştır (Saruhan *et al.* 2012; Mutlu *et al.* 2013). Farklı stres şartlarına maruz kalmış bitkilere uygulanan cinsiyet hormonları da H_2O_2 miktarında azalmaya neden olmuştur (Erdal 2010; Erdal *et al.* 2010).

Bu çalışmada bulduğumuz veriler literatür bilgileri ile örtüşmektedir. Soğuk ve Soğuk +UV uygulamalarında H_2O_2 miktarları genel kontrole göre önemli değerlerde artış göstermiştir. Stres faktörlerinin etkisini azaltan bitki ve hormon uygulamalarında hem soğuk hemde UV + soğuğa göre azalış kaydedilmiştir (Tablo 6, Şekil 26 ve 4.12). Stresin en belirgin göstergesi olan MDA içeriği, soğuk ve soğuk + UV uygulamalarında ciddi derecede artış göstermiştir. Bu durum soğukla birlikte artış gösteren ROT'lara bağlanabilir. ROT soğukla birlikte artarak hücredeki lipitlere zarar vermiş olabilir (Das and Roychoudhury 2014).

MDA içeriği, soğuk kontrole göre hormon uygulamalarında önemli oranlarda düşüş göstermiştir. Bu düşüş uygulanan moleküllerin kendilerinin antioksidan etkilerine veya

antioksidan madde veya enzim sistemlerinin aktivasyonunda sinyal rolü üstlenmelerine bağlanabilir (Tablo 7, Şekil 28 ve 4.14) (Janeczko and Skoczowski 2005).

Bitkiler kötü ortam şartlarından kaçamadıklarından stres faktörüne karşı kendilerini koruyabilmek için güçlü savunma sistemlerine sahiptirler. Bu durumda enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmalarından yararlanırlar. Enzimatik olan mekanizmalar, $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, ve $^{\cdot}\text{OH}$ gibi radikaller ve radikal olmayan H_2O_2 gibi bileşikleri detoksifiye eden enzimleri kapsamaktadır. Bunlardan başlıca olarak süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerdir (Gill and Tuteja 2010; Sharma *et al.* 2012). Soğuk stresinin çeşitli bitkilerde antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığı bildirilmiştir (Gill and Tuteja 2010; Esim *et al.* 2012). UV stresine maruz kalan bitkilerde CAT, POD, SOD, GR, APX gibi antioksidan enzimlerinin miktarlarında artışlar saptanmıştır (Young 1991; Ort 2001; Karabal, *et al.* 2003; Berli *et al.* 2010). Keles ve Oncel (2002) soğuğa bırakılmış buğday bitkisinin iki farklı kültivarında CAT ve GR aktivitelerinde artış olduğu bildirmiştir. Birbirinden farklı stres şartlarının etkisini azaltmak için kullanılan SA ve ABA uygulamalarında antioksidan miktarlarında azalma kaydedilmiştir (Mutlu 2009; Tossi *et al.* 2009; Berli *et al.* 2010; Erdal and Dumlupınar (2010). Aynı amaçla kullanılan memeli cinsiyet hormonları da bitki hormonlarıyla benzer özellik gösterip antioksidan enzim miktarını azaltmıştır (Janeczko and Skoczowski, 2005; Erdal 2010).

Mevcut çalışmada ise soğuk ve Soğuk + UV stresi fasulye bitkisinde SOD aktivitesini artırmıştır. Tekli ve çoklu hormon uygulamaları ise SOD aktivitesini soğuk ve Soğuk+UV uygulamasına göre azaltmıştır (Tablo 10 Şekil 34 ve 4.20). Bu azalış normalde antioksidan sistemin söz konusu hormon uygulamalarıyla sekteye uğradığını düşündürse de bu durum bitki büyüme parametreleri ile değerlendirilmeli daha yerinde olacaktır. Çünkü soğuk ve UV koşullarında SOD aktivitesinde hormon uygulamaları ile düşüş görülürken kök gövde uzunluğu gibi büyüme parametrelerinde artışlar olması, uygulanan söz konusu iyileştiricilerin ya kendilerinin antioksidan özellik gösterdiğini veya osmolit sentezini artırıcı etki göstererek (Sharma *et al.* 2019) soğuk ve UV nin olumsuz etkilerini, SOD aktivitesine ihtiyaç kalmayacak şekilde bertaraf etmede aktif olmaları ile açıklanabilir.

Tek başına soğuk uygulaması CAT aktivitesini önemli düzeyde artırmıştır. Soğuk + UV uygulaması ise genel kontrole göre %80'lik bir artışla CAT aktivitesini yükseltmiştir. Soğuk ve UV etkisini azaltmak için kullanılan hormonlar ise CAT aktivitesini düşürmüştür (Tablo 11 Şekil 36 ve 37). Bu durumda SOD aktivitesinde açıklandığı şekilde hormon uygulamalarının

antioksidan enzimlerin teşvik edilmeden farklı mekanizmalarla olumsuz etkileri bertaraf edilmesine katkı sağlaması ile açıklanabilir

Tablo 12 ve Şekil 38 ve 39’da görüldüğü üzere genel kontrole göre soğuk stresinde POD aktivitesi önemli derecede yükselmiş, Soğuk + UV uygulamasında da POD aktivitesi artırmıştır. Bitki hormonu ve memeli cinsiyet hormon uygulamaları ise POD aktivitesini soğuk ve UV + Soğuk uygulamalarına göre azaltmıştır. Soğuğa maruz kalmış fasulye bitkisinde APX enzim aktivitesi önemli derecede yükselmiştir. Soğuğun etkisini azaltmak için uygulanan hormonlar ise stres koşullarına göre APX aktivitesini azaltmıştır. (Tablo 10. ve Şekil 29). Diğer antioksidan enzimler de olduğu gibi GR aktivitesinde soğuk ve soğuk + UV de artış göstermiş uygulanan hormonlar ile bu artış azalmıştır (Tablo 11 ve Şekil 30). Antioksidan enzimlerde stres koşullarında bir artış görülmesi stres koşulları ile mücadele için enzimatik yolun kullanılmasına diğer taraftan uygulanan hormonlar ile stres koşullarına göre daha düşük antioksidan aktivitesi tespit edilirken bitki büyümesinde artış kaydedilmesi bitkide bu hormonların antioksidatif yolak dışında farklı mekanizmaları aktive ederek strese karşı bitki direncinin artırılmasına atfedilebilir. Bu durumu açıklayabilmek için çalışmada protein sentezinin kilit enzimlerindeki aktiviler de belirlenmiştir.

Araştırmacılar stres şartları altında olan bitkilerde, azot metabolizma enzimlerinin aktivite azaltıldığını ve hatta inhibe olduğunu rapor etmişler (Gouia *et al.* 2000; Wang *et al.* 2008). Soğuk uygulaması fasulye bitkisinin yapraklarında (NR) aktivitesini azaltmıştır. Soğuk +UV grubunda da NR miktarı azalış göstermiştir. Uygulanan hormonlar UV ve soğuğun NR üzerindeki etkisini belirli şekilde hafifletmiştir (Tablo 15 ve Şekil 44 ve 4,30). Buna benzer (NİR) aktivitesi soğuğa bırakılan bitkide ve Soğuk + UV grubunda ise %54 oranda azalış göstermiştir. Hormon uygulamaları ise yalnız stres koşullarına göre NİR aktivitesini genel anlamda artırmıştır (Tablo 16. ve Şekil 46 ve 47).

Mevcut çalışmada soğuk uygulamasıyla fasulye bitkisinin yapraklarında (GS) aktivitesi kontrol bitkisine göre soğuğa bırakılan bitkide ve Soğuk + UV grubunda önemli seviyelerde azaltmıştır. Hormon uygulamaları ise stres koşullarında tespit edilen azalmaları belli dereceye kadar tersine çevirebilmiştir (Tablo 17 ve Şekil 48 ve 49). NR, NİR ve GS aktivitelerinde değişimler uygulanan hormonların sinyal görevi üstlenerek stres koşullarında sekteye uğrayan protein sentez reaksiyonlarını, iyileştirdiği ve yapısal malzeme olan proteinlerin sentezinin artırılabilirdiği ve bitki büyümesinin bu şekilde stimüle edildiği şeklinde yorumlanabilir (Janeczko and Skoczowski 2005; Lindemann 2015).

Bunu doğrular şekilde protein içeriklerinin ve protein profilinde uygulanan hormonlarla yeni protein bantları gözlenmiştir.

Sonuç ve neriler

Yapılan bu çalışmada; fasulye bitkisi hem soğuk stresi hemde soğuk +UV stresine maruz bırakılmış ve bu stres şartlarının etkilediği bitkiyi iyileştirmek için hem bitki hormonları hem de memeli cinsiyet hormonları tek tek ve kombinasyonlu olarak uygulanmıştır. Deneyler sonucunda çeşitli parametreler ölçülmüş (kök, gövde uzunluğu, kuru madde miktarı, H₂O₂ oranı, MDA, protein, klorofil, şeker, fenolik madde miktarı SOD, POD, CAT, APX, GR, NR, NiR, GS) ve bu uygulamaların etkisi değerlendirilmiştir.

Çalışma sonucunda her iki stres etkisine maruz kalan fasulye bitkisinde anatomik ve fizyolojik olarak olumsuzluklar olduğu tespit edilmiş, bu olumsuzlukların bitki ve memeli cinsiyet hormonlarıyla belirgin şekilde hafifletildiği tespit edilmiştir. Ayrıca oklu kombinasyon uygulamalarının da bitkide stres şartlarının olumsuz etkilerini hafiflettiği belirlenmiştir. Araştırmamız sonucunda řu nerileri sunmak mümkündür;

- Memeli cinsiyet hormonları, fasulye bitkisinde düşük konsantrasyonlarda bile bitki büyümesini arttırmaktadır. Bu anlamda, söz konusu hormonlar zirai aktivitelerde kullanılabilir. Ancak diğer büyüme düzenleyicileri için de şiddetle tavsiye edildiği gibi, memeli cinsiyet hormonlarının da zirai kullanımında, bu maddelerin bitkilerde metabolize edilme sürelerine dikkat edilmeli, yani bitkilerin hangi büyüme aşamalarında iken bu düzenleyicilerin kullanılması gerektiği noktasında bilinçli olunmalı, bunun içinde bu düzenleyicilerin bitkideki normal metabolize edilme süreleri tespit edilmelidir.
- Türden tre değişen optimum hormon seviyeleri belirlenmeli.
- Cinsiyet hormonlarının direnç artırıcı özelliği ve kullanılabilirliği teşvik edilmeli.
- Bitki hormonlarının soğuk ve UV stresi dışında uygulanabilirliği ve etkisi belirlenmelidir.
- Birlikte kullanılan bitki ve cinsiyet hormonlarının farklı bitkilerdeki etkisi araştırılmalıdır.

Bu bağlamda mevcut araştırmanın bu konudaki araştırmalara faydalı veriler sunacak bir çalışma olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Acar, O., 1999. Kuraklığa dayanıklı bazı arpa (*Hordeum* spp.) çeşitlerinde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin araştırılması. Doktora Tezi, Ege Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye.
- Agarwal, S. and Pandey, V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 48(4), 555-560.
- Akkus, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya
- Alaçık, Ö., 2014. Ultraviyole (UV-B) stresinin bazı sarıçam (*Pinus Sylvestris* L.) soylarına etkilerinin araştırılması.
- Allen, D.J., Ort, D. R. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science*. 6(1):36-41
- Alscher, R.G., Donahue, J.L. and Cramer, C.L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants relationship in green cells. *Physiol. Plant.*, 100, 224-233.
- Amaya, I., Botella, MA., Calle, M., Medina, M.I., Heredia, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quesada, MA., Valpuesta, V., 1999. Improved germination under osmotic stress or tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett*, (457), 80- 84
- Ananieva, E.A., Christov K.N. and Popova L.P., 2004. Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. *Journal of Plant Physiology*, (161), 319-328
- Anlarsal, E., 2005. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla bitkileri bölümü yemeklik tane baklagiller ders notları.
- Apel, K. and Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 55, 373-99.
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxidescavenging enzyme in plants. *Physiol Plant*, (85), 235-241.
- Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141:391-396
- Bakardjieva, N., and Christov K., 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from moses (*Mnium* sp.) and ferns (*Polydium vulgare*) to high temperature. *Can. J. Bot.*, 74, 1665-1670.
- Baktır, İ., Erdemir, S., Göktaş, Ö., 1994. Süs bitkilerinde hormon kullanımı. Lisans Semineri. Akdeniz Üniv. Zr. Fak. 15s. Antalya.
- Banci, L., 1997. Structural properties of peroxidase. *J. Biotech.*, (53), 253-263.
- Battal, P., Erez, M. E., Turker, M., Berber, I., 2008. Molecular and physiological changes in maize (*Zea mays*) induced by exogenous NAA, ABA and MeJa during cold stress. In *Annales Botanici Fennici* (Vol. 45, No. 3, pp. 173-185). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.
- Bergmeyer, J., and Grabl, M., 1983. *Methods of enzymatic analysis* (Third Edition), 190-302, Germany.
- Berli, FJ., Moreno, D., Piccoli, P., Hespanhol-Viana, L., Silva, MF., Sith, RB., J. Cavagnaro, B., Bottini, R. 2010. Abscissic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing

- compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant, Cell and Environment*. 33, 1–10.
- Bertamini, M., Zulini, L., Muthuchelian, K., Nedunchezian, N. 2007. Low night temperature effects on photosynthetic performance on two grapevine genotypes. *Biologia Plantarum*. 51, 381-385.
- Bertamini, M., Muthuchelian, K., Rubinigg, M., Zorer, R., Velasco, R., and Nedunchezian, N. 2006. Low-night temperature increased the photoinhibition of photosynthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling) leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 57, 25-31.
- Blaustein, R., 2001. Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410 (6829):681-4
- Bowler, C., Montagu, M.V. ve Inze, D., 1992, Superoxide dismutase and stress tolerance, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43, 83–116.
- Bowler, C., Slooten, I., Tsang, W.T., Vancamp, W., Vanmontagu, M., Inze, D., 1991. Oxidative stress in plants. *Nato advanced science institutes series, series a, life sciences*, (212), 695-705.
- Bozcuk, S., 1978. Domates (*Lycopersicum esculentum* Mill.), Arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) bitkilerinin büyüme ve gelişmesinde tuz-kinetin etkileşimi üzerinde araştırmalar (Doçentlik Tezi). H.U. Fen Fak. Bot. Böl., Ankara.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., 2000, Responses to abiotic stresses, biochemistry and molecular biology of plants, W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones (eds), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 158-1249
- Cadenas, S.E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 791-10.
- Chaudiere, J. and Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem. Toxicol.*, (37), 949-962.
- Cheng, Z., Jin, R., Cao, M., Liu, X., Chan, Z., 2016. Exogenous application of ABA mimic 1(AM1) improves cold stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125(2), 231-240.
- Correia, C., 2005. Ultraviolet-B radiation and nitrogen affect the photosynthesis of maize: A Mediterranean field study. *European Journal of Agronomy*. 22(3):337-347
- Çil, E. E., 2006. Uv-C ışın S-stresinin sera şartlarında yetiştirilen fasulye (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Atlanta) üzerinde bazı morfolojik ve fizyolojik etkilerinin araştırılması.
- Das, K. and Roychoudhury, A., 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 53.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C., 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci.*, 98, 13454-13459
- Desikan, R., Hancock, J.T., Bright, J., Harrison, J., Weir, I., Hooley, R., Neill, S.J., 2005. A role for ETR1 in hydrogen peroxide signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.*, 137, 831–83.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K., Hailiu, R., 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3010–3014.

- Dische, Z., 1962. Color reactions of carbohydrates. Methods in carbohydrates chemistry. 1, 475-415.
- Dogra, R. and Thukral, A., 1991. Effect of steroid and plant hormones on some germination aspects of *Triticum aestivum* L. In: New trends in plant physiology (Eds. K. K. Dhir, I. S. Dua and K. S. Chark), Today and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi, 65-70.
- Dogra, R., Thukral, A.K., 1994. Proteins, Nucleic acids and some enzyme activities in maize plants as affected by pre sowing seed treatment with steroids. Indian Journal of Plant Physiology, (37), 164-168.
- Doğan, N. 2006. Su stresi altındaki fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisinin iyon alım mekanizmasının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Dumlupinar, R., 2000. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L. cv Terzi Baba) bitkisinin soğuğa dayanıklılığı üzerine bazı büyüme düzenleyicilerinin ve besin elementlerinin etkisi. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Dumlupinar, R., Demir, F., Budak, G., Karabulut, A., Kadi, N., Karakurt, H., Erdal, S., 2007. Determination of replacement of some inorganic elements in pulvinus of bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Gina 2004) at chilling temperature by the WDXRF spectroscopic technique. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. (103), 331-339.
- Durmuş, N., 2003. Büyümeyi düzenleyici maddelerin oksidatif stres üzerine etkileri. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü., Trabzon.
- Erdal, S. and Dumlupinar, R., 2010. Progesterone and β -estradiol stimulate the seed germination in chickpea by causing important changes in biochemical parameters. Z. Naturforsch., (65), 239 – 244.
- Erdal, S., 2009. Effects of mammalian sex hormones on antioxidant enzyme activities, H_2O_2 content and lipid peroxidation in germinating bean seeds. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 40 (2), 79-85.
- Erdal, S., Dumlupinar, R., Cakmak, T., Genisel, M., 2010a. Mammalian sex hormones influence germination velocity and enzyme activities in germinating maize seeds. Fresenius Environmental Bulletin, 19 (8), 1458-1465.
- Erdal, S., Dumlupinar, R., Cakmak, T., Taskin, M., 2010b. Determination of some inorganic element concentration changes in germinating chickpea seeds exposed to progesterone and β -estradiol by using wdxrf spectroscopic technique. Fresenius Environmental Bulletin., 19 (3), 507-515.
- Erdal, S., 2012. Exogenous mammalian sex hormones mitigate inhibition in growth by enhancing antioxidant activity and synthesis reactions in germinating maize seeds under salt stress. Journal of the Science of Food and Agriculture, 92(4), 839-843.
- Eyidogan, F.D., Öktem H.A., Yücel, M., 2003. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. Acta Physiologia Plantarum, (25), 263-269.
- Farooq, M., Aziz T., Basra S. M. A., Cheema M. A. and Rehman H., 2008. Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. J. Agronomy and Crop Science, (194), 161–168.
- Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu MS. 2011. Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi, 2011, 11 (1): 52 – 67.

- Foyer, C.H., and Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133,21-25.
- Foyer, C.H., and Noctor G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, 28, 1056–1071.
- Foyer, C.H., and Noctor, G. 2003. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Plant Physiology* 119, 355–364
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M., 1997. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.*, (100), 241-254.
- Foyer, CH., Trebst, A. and Noctor, G. 2005. Signaling and integration of defense functions of tocopherol, ascorbate, and glutathione. In *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment* (eds B. Demmig-Adams & W. W. Adams), pp. 00–00. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, in press.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev.Biochem.*, (64), 97-112.
- Gechev, T., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inze', D., Dukiandjiev, S., Toneva, V., Minkov, I. 2002. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 708–714.
- Gong, Y., Toivonen, P.M.A., Lau, O.L., Wiersma, P.A., 2001. Antioxidant system level in 'Braeburn' apple in related to its browning disorder. *Botanical bulletin of Academia Sinica*, (42), 259-264
- Genişel, M., 2010. Kemik tozu solüsyonu, CaCl₂ ve IAA uygulamalarının tuz stresi altındaki Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin fizyolojik parametreleri üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü., Erzurum.
- Griffith, M., Ala P., Yang D.S.C., Hon W.C., Moffatt B.A., 1992. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiology*, (100), 593–596.
- Güler, NS., 2008. *Ctenanthe setosa*'da yaprak kıvrılması sırasında apoplastik ve simplastik alanlarda antioksidan sistemde meydana gelen değişimler. Doktora Tezi, Fen, Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Gouia, H., Ghorbal, M, H., Meyer, C., 2000, Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 629-638.
- Hagar, H., Udea, N., Shah, S.V., 1996, Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK1 cells, *Am. J. Physiol.*, 271, F209-F215.
- Hale, M.G., Orcutt D.M., 1987. *The physiology of plants under stress*, John Wiley and Sons, 206p.New York.
- Halliwell, B., 1984. Toxic effects of oxygen on plant tissues, in chloroplast metabolism, *The structure and function of chloroplasts in green leaf cells*. Oxford Press, Oxford, 180-206.
- Hayat S., Ahmad A., 2007. *Salicylic acid: A plant hormone*. Springer, Dordrecht, pp. 1- 371.
- Heidarvand, L., Maali-Amiri Reza. 2013. Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *Journal of Plant Physiology* 170, 459– 469.

- Hon, W-C., Griffith M., Mlynarz A., Kwok Y.K., Yang D.S.C., 1995. Antifreeze proteins in winter rye leaves are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.*, (109), 879-889
- Hu, C., Van Huystee, R.B., 1989. Immunochemical relatedness of two peanut peroxidase isozymes from peanut cell culture. *Biochem. Cell Biol.*, (37), 371- 376.
- Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q., Xiong, L. 2006 Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 35, 12987– 12999
- Jaleel, C.A., Sankar, B., Sridharan, R., Panneerselvam, R., 2008. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turk. J. Biol.*, (32), 79–83.
- Janda, T., Szalai G., Rios-Gonzales K., Veisa O. and Paldi E., 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science*, (164), 301- 306.
- Janeczko, A. and Skoczowski, A., 2005. Mammalian sex hormones in plants. *Folia Histochem Cytobiologica*, 43(2), 71-79.
- Janeczko, A., Filek, W., Skoczowski, A., 2002. Influence of human sex hormones on the growth response of winter wheat immature embryos and callus (in Polish). *Zesz Probl Post Nauk Roln.*, (488), 667-673.
- Kaya, E., 2011. Erkaen bitki gelişme aşamasında kuraklık ve tuzluluk streslerine tolerans bakımından fasulye genotiplerinin taraması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe bitkileri Anabilim dalı, Adana.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2000. Biyokimya. Safak Yayınları, Erzurum, 107-115.
- Kim, K.Y., Kwon, S.Y., Lee, H.S., Hur, Y., Bang, C.W., Choi, K.S., Kwak, S.S., 2000. Differential expression of four sweet potato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethephon. *Phytochemistry*, (54), 19-22.
- Kocaçalışkan, İ., 2008. Bitki fizyolojisi. Kütahya
- Kumar, R.R., Goswami, S., Kumar, N., Pandey, S.K. Pandey, V.C., Sharma, S.K., Path, H H., Rai, R.D., 2011. Expression of novel ascorbate peroxidase isoenzymes of wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to heat stress. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 3(11), 188-194
- Kumar, S., Kaur, G., & Nayyar, H. 2008. Exogenous application of abscisic acid improves cold tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(6), 449-456
- Kuru, H.İ., 2007. Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Láposi, R., 2009. Responses of leaf traits of European beech (*Fagus sylvatica* L.) saplings to supplemental UV-B exclusion. *Agricultural and Forest Meteorology*. 149(5):745-755
- Lindemann, P. (2015). Steroidogenesis in plants—biosynthesis and conversions of progesterone and other pregnane derivatives. *Steroids*, 103, 145-152.
- Liu, Q., Yao, H., 2007. Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chemistry*. 102(3):732-737

- Lyons, J. M., 1973. Chilling injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 24, 445- 466.
- Mann, T. and Kleilin, D., 1938. Homocuprein and heptacuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. *Proc. R. Soc. London B.*, (126), 303- 315.
- Maestrini P, Cavallini A, Rizzo M, Giordani T, Bernardi R, Durante M, Natali L. 2009. Isolation and expression analysis of low temperature-induced genes in white poplar (*Populus alba*). *J Plant Physiol.*, 166, 1544-1556.
- Mahajan, S., Tuteja, N., 2005, Cold, salinity and drought stresses: An overview, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, 139-158.
- Martínez-Honduvilla, C.J., Gimenez-Solves, A., and Santos-Ruiz, A., 1976. Biochemical changes in *Pinus pinea* seeds. III. The effect of growth substances and steroidal hormones on nucleic acids. *Rev Esp Fisiol.*, (32), 169-174.
- McCord, J.M. and Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocuprein. *J. Biol. Chem.*, (244), 6049-6055.
- Megadoff, F., Weil, RR. 2004. *Soil Organic matter in sustainable agriculture*. CRC Press. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton London Washington DC.
- Minibaeva, FV., and Gordon, LK., 2003. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russ. Journal Plant Physiology*, 50, 411–416.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Sci.*, 7, 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F., 2004, Reactive oxygen gene network of plants, *Trends Plant Sci.*, 9, 490-498.
- Moller, I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 561–591.
- Morsy, MR., Jouve, L., Hausman, JF., Hoffman, L., Steawart, j. 2007. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. *Journal of Plant Physiology*. 164, 157-167.
- Mutlu, S. 2005. Salisilik asitin arpada (*Hordeum vulgare* L.) soğuk toleransını sağlama ve apoplastik ve simplastik proteinler üzerine etkileri'nin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Nakano, Y. and Asada, Y., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiol.*, (22), 867-880.
- Nayyar, H., Chander, K., Kumar, S., & Bains, T. 2005. Glycine betaine mitigates cold stress damage in chickpea. *Agronomy for sustainable development*, 25(3), 381-388.
- Nejad Sadeghi, L., Amiri, AR., Zeinali, H., Ramezanpour, S., Sadeghzadeh, B. 2014. Comparative analysis of physio-biochemical responses to cold stress in tetraploid and hexaploid wheat. *Cell Biochemistry Biophysics*, 70 (1), 399-408.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 55: 49-57
- Novak, O., Hauserova, E., Amakorova, P., Dolezal, K., Strnad, M., 2008. Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography– electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, (69), 2214–2224.

- Öktem, H.A., Eyidogan F., Demirba D., Bayrac A.T., Oz M.T., Ozgur E., Selcuk, F., Yucel, M., 2008. Antioxidant responses of lentil to cold and drought stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 17(1), 15-21.
- Patykowski, J. and Urbanek, H., 2003. Activity of enzymes related to H₂O₂ generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, (151), 153–161
- Pitcher, L.H., Brennan, E., Hurley, A., Dunsmuir, P., Tepperman, J.M., Zilinskas, B.A. 1991. Overproduction of petunia chloroplastic copper / zinc superoxide dismutase does not confer ozone tolerance in transgenic tobacco. *Plant Physiol.*, (97), 452-455.
- Posmyk, M. M., Bałabusta, M., Wieczorek, M., Sliwiska, E., and Janas, K. M. 2009. Melatonin applied to cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds improves germination during chilling stress. *Journal of Pineal Research* 46, 214–223.
- Raskin, I., 1992 b. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol.*, (99), 799-803.
- Raskin, I., 1992a. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (43), 439-463.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P., 2000. In vitro rooting of *Psoralea corylifolia* Linn: Peroxidase activity as a marker, *Plant Growth Regul.*, 305, 215–219.
- Sakhabutdinova, A.R., Fatkhutdinova D.R. and Shakirova F.M., 2004. Effect of salicylic acid on the activity of antioxidant enzymes in wheat under conditions of salination. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40 (5), 501-505.
- Salisbury, F.B. and Ross C.W., 1992. *Plant Physiol.* Wadsworth Publishing Company. California, pp.682, USA.
- Saltveit, M. E. 2001. Chilling injury is reduced in cucumber and rice seedlings and in tomato pericarp discs by heat-shocks applied after chilling. *Postharvest Bio. Techn.* 21: 169-177.
- Sairam, R.K. and Srivastava, G.C., 2000. Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 43(3), 381-386.
- Saruyama H. and Tanida M. 1995. Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and -tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.*, (109), 105–113.
- Sarwat, M., Scandalios, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.*, (101), 7-12.
- Shahryar, N. and Maali-Amiri, R. 2016. Metabolic acclimation of tetraploid and hexaploid wheats by cold stress-induced carbohydrate accumulation. *Journal Plant Physiology*, 1,204, 44-53.
- Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S. K., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S. Zheng, B. (2019). Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules*, 9(7), 285.
- Siddiqui M.H., Al-Whaibi M.H., Basalah M.O., 2010. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma*, 248(3):447-55.
- Simersky, R., Novák, O., Morris, D.A., Pouzar, V., Strnad, M., 2009. Identification and quantification of several mammalian steroid hormones in plants by UPLCMS/MS. *J Plant Growth Regul*, (28), 125-136.

- Sing, B. and Usha K., 2003. Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation*, (39), 137-141.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., Miszalski, Z., 2007. The Role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochim. Pol.*, 54, 39-50.
- Spiteller, G., 2001. Peroxidation of lineoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, (122), 617-657
- Speranza, A. (2010). Into the world of steroids: A biochemical “keep in touch” in plants and animals. *Plant Signaling and Behavior*, 5(8), 940-943
- Streb, P., Michael-Knauf, A., Feierabend, J., 1993. Preferential photoinactivation of catalase and photoinhibition of photosystem II are common early symptoms under various osmotic and chemical stress conditions. *Physiol. Plant.*, (88), 590-598
- Sun, XC., Hu, CX., Tan, QL. 2006. Effects of molybdenum on antioxidative defense system and membrane lipid peroxidation in winter wheat under low temperature stress. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao*. 32,175–182.
- Suzuki, N. and Mittler, R., 2006, Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signalling and destruction, *Physiol. Plantarum*, 126, 45-51.
- Taiz, L. and Zeiger, E., Çeviri., Türkan, I., 2008. Bitki fizyolojisi. 236 s., İzmir.
- Taşgın E., Atıcı Ö., Nalbantoğlu B. Popova LP. 2006. 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*, (67), 710-715
- Taşgın, E., 2004. Düşük sıcaklık ve salisilik asidin kışlık buğday yapraklarındaki donma toleransı, oksidatif enzim aktiviteleri ve apoplastik proteinler üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Taşgın, E., Atıcı Ö. and Nalbantoğlu B., 2003. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation*, (41), 231- 236
- Tossi, V., Lamattina, L., Cassia, R. 2009. An increase in the concentration of abscisic acid is critical for nitric oxide-mediated plant adaptive responses to UV-B irradiation. *New Phytologist*. 181: 871–879.
- Turan, Ö., 2007. Nohut (*Cicer arietinum* L.) çeşit ve hatlarının soğuk tresine karşı toleransını fizyolojik ve biyokimyasal parametreler ile belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Uemura, M., Joseph, R.A. and Steponkus P.L., 1995. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. Effect of plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions, *Plant Physiology*, (109), 15-30.
- Uemura, M., Tominaga, Y., Nakagawara, C., Shigematsu, S., Minami, A., Kawamura, Y., 2006, Responses of the plasma membrane to low temperatures, *Physiol. Plantarum*, 126, 81-89.
- Uluocak, N., 1984. Toprak koruması ve yem niteliği bakımından Türkiye’nin önemli otlak bilgileri. 4. Orman Fakültesi, İstanbul, Türkiye 117
- Urrutia, M., Duman J., Knight C., 1992. Plant thermal hysteresis proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1121-199.
- Van Camp, W., Van Montagu, M., Inze, D., 1994. Superoxide dismutases. In: C. H. Foyer and P. M. Mullineaux (eds). *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. CRC Press Inc. Boca Raton., 317-341.

- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151, 59–66.
- Vernieri P, Lenzi A, Figaro M, Tognoni F, Pardossi A. 2001. How roots contribute to the ability of *Phaseolus vulgaris* L. to cope with chilling-induced water stress. *Journal of Experimental Botany* 52, 2199–2206.
- Wang, C. Y., 1982. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. *Hort. Science*, 17 (2), 173-185.
- Wang, C.Y., 1990. Chilling injury of horticultural crops, Boca Raton, FL: CRC, 313 pp.
- Wang, L.I., Zhou, Q., Ding, L., Sun, Y., 2008. Effect of cadmium toxicity on nitrogen metabolism in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newlyfound cadmium hyperaccumulator. *Journal of Hazardous Materials*, 154, 818-825.
- Whetten, R.W., MacKay, J.J., Sederoff, R.R., 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 49, 585-609.
- Witham, F.H. Blaydes, B.F., Devlin, R.M. 1971. Experiments in plant physiology, Van Nostrand Reinhold, New York, USA, 167-200.
- Yacoob, R. K., Filion, W. G. 1987. The effects of cold-temperature stress on gene expression in maize. *Biochemistry and Cell Biology*, 65(2), 112-119.
- Yağmur, Y. 2008. Farklı Asma (*Vitis vinifera* L.) Çeşitlerinin Kuraklık Stresine Karşı Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Tolerans Parametrelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir.
- Yamaguchi, K., Mori, H., Nishimura, M., 1995. A novel isozyme of ascorbat peroxidase
- Yang, S.J., Hosokawa M., Mizuta Y., Yun, J.G., Mano J., Yazawa S., 2001. Antioxidant capacity is correlated with susceptibility to leaf spot caused by a rapid temperature drop in *Saintpaulia (African violet)*. *Sci. Hort.*, 88, 59-69.
- Yaşar, F. Ellialtıoğlu, S. and Yildiz. K. 2008. Effect of salt stress on antioxidant defense systems, lipid peroxidation, and chlorophyll content in green bean. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(6), 782–786.
- Yee, Y., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., Lu, C.Y., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguiera gymnorhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environmental and Experimental Botany*, 1-13.
- Yılmaz, S., ve Ozan, T. S., 2003. Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişki. *Türk Biyokimya Dergisi*, 28(4),252-256.
- Yingli, Y., Shijian, X., Lizhe, A, Nianlai, C., 2007. NADPH oxidase-dependent hydrogen peroxide production, induced by salinity stress, may be involved in the regulation of total calcium in roots of wheat. *Journal of Plant Physiology*, 164,1429-1435.
- Yordanova, R.Y., Christov K.N. and Popova L.P., 2004. Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environ. Exp. Botany*, (51), 93-101.
- Yordanova, R.Y., Christov, K.N., Popova L.P., 2004. Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, 51, 93-101.
- Yu L.J., Lan W.Z., Qin W.M., and Xu H.B., 2001. Effects of salicylic acid on fungal elicitor-induced membrane-lipid peroxidation and taxol production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Process Biochemistry*, (37), 477–482.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı: Doğum tarihi: Doğum Yeri: Uyruğu: Adres: Tel: E-mail:	Bagher SHEIKHI DIDANI
Eğitim	
Lise: Lisans: Yüksek lisans: Doktora:	Deneysel Bilim OROUMIEH 1986 Bioloji-Botanik TABRİZ Üniversitesi 1991 Bioloji-Botanik OROUMIEH Üniversitesi 2005 Bioloji-Botanik ERZURUM Atatürk Üniversitesi 2022
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce: Almanca: Rusça: Diğer	İyi(Yökdl)
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Türk Biyokimya Derneği Türk Farmasötik ve Medisinal Kimya Derneği	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
1.ZEMDIRBYSTE-AGRICULTURE dergisi vol 109, No, 1(2022), p. 43-48 DOI 10.13080/z-a 2022.109.006 2. Eastern Anatolian Journal of Science V, Issue II, 2019, 10-15	