



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



***ARABİDOPSIS THALIANA*' DA MELATONİNİN
UV STRESİNİ İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Hasan HASKIRLI

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARABİDOPSIS THALIANA' DA MELATONİNİN
UV STRESİNİ İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Hasan HASKIRLI

Danışman: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Yüksek Lisans Programı

İZMİR
2019

Hasan HASKIRLI tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “*Arabidopsis thaliana*’ da melatoninin UV stresini iyileştirici etkisinin araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 03.09.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN



Raportör Üye: Dr. Öğretim Üyesi Barış UZİLDAY



Üye : Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Arabidopsis thaliana’da melatoninin UV stresini iyileştirici etkisinin araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

03 / 09 / 2019

Hasan HASKIRLI



ÖZET**ARABİDOPSİS THALİANA' DA MELATONİNİN UV STRESİNİ İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

HASKIRLI, Hasan

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Eylül 2019, 43 sayfa

Daha önce yapılan araştırmalarda, melatoninin serbest radikalleri etkisiz hale getirmede aktif rol oynaması ve kuvvetli bir antioksidan olarak özellikle savunma sistemini teşvik ettiği ve bunu da stres altında görev yapan ya da aktif hale gelen bazı enzimleri teşvik ederek gerçekleştiğini ortaya konulmuştur.

Moleküler düzeyde Ultraviyole (UV) stresine maruz kalmak, canlılar için ölümcül olabilir. RNA, DNA, lipid, protein ve bitki hormonları gibi UV absorblayan biyolojik bileşenlerle etkileşimleri sebebiyle UV, çok önemli bir abiyotik stres faktörüdür. Aminoasitleri hedef alarak enzim ve protein yapılarını inhibe ettiği ve lipid peroksidasyon ile membran yapısını bozduğu bilinmektedir. Bu etkiler sonucunda membran taşınımı engellenmekte ve sonuç olarak da fotosentetik aktivite olumsuz yönde etkilenmektedir.

Bu tez çalışması; toplamda 21 gün süre içerisinde büyütülen Arabidopsis thaliana bitkisine, çalışmanın 20. gününde melatonin uygulayarak 21. günün sonunda farklı süreler içerisinde (90 dakika Kontrol, 90 dakika UV, 90 dakika 10µM Melatonin ve 90 dakika UV+ 10µM Melatonin) ile (180dk Kontrol, 180 dk UV, 180dk 10µM Melatonin ve 180dk UV+10µM Melatonin) gruplar UV-B stresine maruz bırakarak etkilerini araştırmak için yapılmıştır.

Farklı sürelerde UV-B radyasyonuna maruz bırakılan A. thaliana bitkisinin fotosentetik etkinliğinde farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu uygulama süresince UV-

B stresi bitkinin primer fotokimyanın maksimum quantum etkinliğini (FV/FM) azaltarak toplam fotosentetik indeksini olumsuz etkilemesi nedeniyle UV-B'yi Arabidopsis thaliana bitkisi için önemli bir stres faktörü olduğunu kabul edebiliriz. UV-B radyasyon uygulamalarında savunma mekanizmalarında antioksidan üreten enzimlerde farklı etkiler görülmüştür. CAT (katalaz) aktivitesi artan UV-B süresine bağlı olarak kontrole göre önemli ölçüde artarken, APX (askorbat peroksidaz) aktivitesinde azalma gözlenmiştir. POX (peroksidaz) ve GR (glutasyon redüktaz) aktivitesinin ise UV-B' den önemli ölçüde etkilendiği görülmüştür. Uygulanan UV stres sürelerince H₂O₂ ve MDA seviyelerinin de benzer olarak arttığı bulunmuştur. Elektroforetik analizler sonucunda SOD enzim aktivitesinde artış tespit edilmiş olup, uygulanan UV stresiyle beraber bitkinin enzim aktivitelerinde artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar bitkinin UV stresine karşı gösterdiği savunma mekanizmasında melatoninlerin rol aldığını işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Arabidopsis thaliana, Ultraviyole Stresi, Melatonin, Antioksidant Enzimler, Süperoksit dismutaz, Malondialdehit, Katalaz, Primer Fotokimyanın Maksimum Quantum verimi

ABSTRACT**INVESTIGATION ON THE ALLEVIATIVE EFFECT OF
MELATONIN ON UV STRESS IN *ARABIDOPSIS THALIANA***

HASKIRLI, Hasan

MSc in Biology

Supervisor: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

September 2019, 43 pages

For the previous investigations; melatonin plays an active role for neutralizing free radicals and as a potential antioxidant that especially promoting the defense system or promoting the enzymes that become activation in under stress.

For the alive things can be fatal to be exposed to the ultraviolet stress at the molecular level. UV is an important one of the abiotic stress factors because of its interaction with biological components which is absorbing UV such as RNA, DNA, lipid, protein and plant hormones. It is known that UV inhibits the enzyme and protein structures by lipid peroxidation. As a result of these effects, membrane transport is prevented and photosynthetic activity affected negatively.

In this thesis; *Arabidopsis thaliana*, which was grown for a total 21 days, applied melatonin on the 20th day of the study and at the end of the 21st day, different periods of UV (90 minutes Control, 90 minutes UV, 90 minutes 10 μ M Melatonin and 90 minutes 10 μ M Melatonin and UV) and (180 minutes Control, 180 minutes UV, 180 minutes 10 μ M Melatonin and 180 dk UV + 10 μ M Melatonin) were made to investigate their effects by exposure to UV-B stress.

Typical differences were observed in photosynthetic activity of *Arabidopsis thaliana* which is exposed to UV-B radiation at different times. We can assume that UV-B is an important stress factor for *Arabidopsis thaliana* since UV-B stress negatively affects the total photosynthetic index by reducing the maximum quantum activity (FV/FM) of the primary photochemistry during this application.

Different effects have been observed in antioxidant producing enzymes in defense mechanisms in UV-B radiation applications. CAT (catalase) activity was significantly increased compared to the control due to increased UV-B time, whereas APX (ascorbate peroxidase) activity was significantly affected by UV-B. It was found that H₂O₂ and MDA levels increased similarly in UV stress periods. As a result of electrophoretic analyzes, SOD enzyme activity was found to be increased and the enzyme activity of plant increased with UV stress. These results indicate that melatonin plays a role in the plant's defense mechanism against UV stress.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, Ultraviolet Stress, Melatonin, Antioxidant Enzymes, Succinate Dehydrogenase, Superoxide dismutase, Malondialdehyde, Catalase, Maximum Quantum Activity, Reactive Oxygen Species, H₂O₂.

ÖNSÖZ

Tez konusunun belirlenmesi, kişinin bilim kariyeri ve ülke akademisi için çok önemlidir. Geliştirilebilen bir tezin gelecek nesillere faydalı olabileceğini düşünebiliriz. Bu sürecin içerisinde makalelerdeki emeğin ve çabanın ne anlama geldiğini çok iyi anlamaktayız. Bakış açısına yön veren bu dönem içerisinde çok fazla emek sarf etmek gerektiğini biliyoruz. Bu bağlamda tezli yüksek yapan bireylerde akademik kariyer yolundaki gayretin anlamı çok derindir.

İZMİR

03/09/2019

Hasan HASKIRLI



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TUTANAK.....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	xiii
ÖNSÖZ.....	xvii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> hakkında bilgilendirme	2
1.2. Stres Nedir?	2
1.3. Bitkilere Etki Eden Stres Faktörleri.....	3
1.4. Işık ve Ultraviyole Radyasyon Stresi	4
1.5. Bitkilerde UV-B Stresinin Morfolojik ve Fizyolojik Etkileri	5
1.6. Bitkilerin Strese Karşı Tepkileri.....	5
1.7. Melatonin ve Melatonin Biyosentezi.....	6
1.8. Bitkilerde Melatonin Fonksiyolarının Özeti.....	8
1.9. Melatoninin Bitki Büyümesindeki Rolü.....	9
1.10. Stres Koşullarında Melatonin	9
1.11. Bitkiye Dışarıdan Uygulanan Melatonin	10

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

2. GEREÇ VE YÖNTEM	11
2.1. Tohumların Temini	11
2.2. Tohumların Sterilizasyonu	11
2.3. Tohumların Ekimi	11
2.4. Deneme Deseni ve Bitkilerin Yetiştirilmesi	11
2.5. F_v/F_M Ölçümü	12
2.6. Biyokimyasal Parametreler	12
2.6.1. Lipid Peroksidasyonu	12
2.6.2. Enzim Aktivite Analizleri ve Antioksidan Enzim Ekstraksiyonu	13
2.6.3. Protein Miktarının Tayini	13
2.6.4. Bitki Yapraklarında Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Tayini	13
2.6.5. Bitki Yapraklarında Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	14
2.6.6. Bitki Yapraklarında Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	14
2.6.7. Bitki Yapraklarında Antioksidan Enzimlerin İzoenzim Tayini	14
2.6.8. Bitki Yapraklarında Süperoksit Dismutaz (SOD) İzoenzim Tayini	15
2.6.9. Bitki Yapraklarında Peroksidaz (POX) İzoenzim Tayini	15
2.6.10. Bitki Yapraklarında H_2O_2 Miktarı Tayini	16
3. BULGULAR	18
3.1. Enzim ve İzoenzim Aktiviteleri	18
3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi	18
3.1.2. Peroksidaz (POX) Aktivitesi	19
3.1.3. Katalaz (CAT) Aktivitesi ve İzozim Deseni	20
3.1.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi	21

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.5. H ₂ O ₂ Miktarı.....	22
3.1.6. Lipit Peroksidasyonu	23
3.1.7. Glutasyon Reduktaz (GR) Aktivitesi	23
3.2. F _V /F _M Oranı.....	24
3.3. Gen İfadeleri.....	24
4. TARTIŞMA.....	28
5. SONUÇ	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Arabidopsis thaliana bitkisi.....	2
1.2 Çevresel stres faktörleri (Larcher 1995)	3
1.3 Işık dalga boyları ve özellikleri (Kocaçalışkan 2004)	4
1.4 Molekül formülü $C_{13}H_{16}N_2O_2$ ve molekül ağırlığı 232,28 g/mol (Anonim,2015) olan melatoninin kimyasal yapısının şeklidir.....	7
1.5 Bitkilerde Melatonin Biyosentez Yolağı.....	7
1.6 Bitkilerde melatonin fonksiyonlarının özeti	8
2.1 Deneme deseni grupları	12
2.2 Çalışmada kullanılan primerler.....	17
3.1 Uygulama yapılan gruplardaki SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulanan gruplar: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM),. Her kuyucuk 100 µg protein içermektedir. Std: 1 U bovine karaciğeri SOD standartı.....	18
3.2 Uygulama yapılan gruplardaki toplam POX aktivitesi. Uygulanan gruplar: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), (p<0.05)	19
3.3 Uygulama yapılan gruplardaki toplam CAT aktivitesi. Uygulanan gruplar: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), (p <0.05).	20
3.4 Uygulama yapılan gruplardaki total CAT izozim ve toplam CAT aktiviteleri. Uygulanan gruplar: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), (p<0.05).. Her kuyucuk 20µg/ml protein içermektedir.....	21
3.5 Uygulama yapılan gruplardaki toplam APX aktivitesi. Uygulama grupları: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), (p<0.05)	22

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.6 Uygulama yapılan gruplardaki H ₂ O ₂ içerikleri. Uygulanan gruplar: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM)	22
3.7 Uygulama yapılmış gruplardaki TBARS içerikleri. Uygulama grupları: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), (p<0.05).....	23
3.8 Uygulama yapılan gruplardaki toplam GR aktivitesi. Uygulama grupları: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), (p<0.05).....	24
3.9 F_v/F_M Uygulama grupları: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM) 25	
3.10 Alternatif oksidaz ve plastid oksidaz ilişkili genlerin ifadeleri	26
3.11 Glutasyon peroksidaz ilişkili genlerin ifadeleri	27
3.12 Programlanmış hücre ölümü ile ilişkili genlerin ifadeleri	28
3.13 ROS sinyallemesi ile ilişkili genlerin ifadeleri.....	28



KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CAT	Katalaz
SOD	Süperoksit dismutaz
POX	Peroksidaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
APX	Askorbat peroksidaz
TDC	Triptofan dekarboksilaz
T5H	Triptofan hidroksilaz
SNAT	Serotonin N-asetiltransferaz
ASMT	Asetil serotonin O-metiltransferaz
HIOMT	Hidroksiindol-O-metiltransferaz
UV	Ultraviyole
O_2^-	Süperoksit
MDHA	Monodehidroaskorbik asit
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
ASA	Askorbat
MDA	Malondialdehit
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
RNA	Ribo Nükleik asit
F_V/F_M	Primer fotokimyanın maksimum quantum etkinliği

KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

GR	Glutasyon reduktaz
DHA	Dehidroaskorbik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit



1. GİRİŞ

Güneş ışığı tiplerinden olan UV (Ultraviyole) ışınlarını dalga boylarına göre UV-A (315-400nm) UV-B (280-315 nm) ve UV-C (200-280 nm) olarak üçe ayırabiliriz. Moleküler dozda UV stresine maruz bırakılmak canlılar için ölümlü sonuçlanabilir. DNA, RNA, lipidler, proteinler ve hormonlar gibi ultraviyole absorblayan birçok biyolojik moleküllerle etkileşim halinde olmaları sebebiyle ultraviyole, çok önemli çevresel faktörlerdendir (Caldwell ve ark. 1998). UV-B güneş ışık tipi aminoasitleri hedef alıp enzimlerin ve proteinlerin yapısını ve lipid peroksidasyonu ile membran içeriğini bozmaktadır (Hightower ve ark. 1994). Bu etkiler sonucu membrandaki taşınımı engellemektedir ve fotosentetik aktivite olumsuz etkilenmektedir (Allen ve ark. 1998). UV-B özellikle nükleik asitleri hedef alıp DNA' nın sarmal yapısını bozmaktadır (Bieza ve Lois 2001). UV-B ışınmasının etkileri sonucunda bitkinin büyümesi ve gelişmesi negatif yönde etkilenir (Qaderi ve Reid 2005). Buna karşın bitkiler UV-B'nin etkisini en aza indirmek veya azaltmak için UV-B absorblayan koruyucu bileşenler ile birkaç koruyucu mekanizmayı kullanırlar (Strid vd, 1994; Tevini 1994; Mackerness 2000). Oluşan yanıtlar, bitkinin UV-B stresine duyarlılık seviyelerini belirler (Saile-Mark ve Tevini 1997).

Melatonin; canlılarda serbest radikalleri inaktif hale getirmedeki işlevlerinden dolayı bitkiler aleminde de bilinen önemli bir antioksidandır. Melatoninin biyolojik membranlarını (kloroplast, mitokondri ve plazma zarı) dengelemesinde doğrudan etki ettiği için, lipid peroksidasyonu ve zar akışkanlığında da etkin rolü olduğu belirlenmiştir (Catala, 2007; Garcia ve ark, 2014).

Melatonin; stres altındaki bitkilerde O_2^- (Süperoksit) oluşumunu sınırlayarak iç mitokondriyal zardan elektron sızıntısını azalttığını, elektron taşıma zincirini uyardığını (Reiter ve ark., 2001), peroksidaz (POX), glutatyon reduktaz (GR), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimlerinin aktivitelerini teşvik ettiği belirtilmiştir (Cardinali ve Pevet, 1998; Allegra ve ark., 2003; Teixeira ve ark., 2003; Rodriguez ve ark., 2004; Reiter ve ark.; 2007).

1.1. *Arabidopsis thaliana* hakkında bilgilendirme

Bu bölümde tez çalışmasında kullanılan *Arabidopsis thaliana* bitkisi tanıtılacaktır. Brassicacea familyasına ait model bitki *Arabidopsis thaliana* ekonomik olarak önemli olmamasına karşın uzun yıllardır fizyolojik, biyokimyasal, moleküler ve genetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. *A. thaliana* bitkisinin özel iklim şartları gerektirmemesi, hızlı büyümesi, çok tohum oluşturması ve kısa yaşam döngüsü moleküler ve genetik çalışmalar için yaygın olarak kullanılmasının en önemli nedenlerinden birisidir. Bununla birlikte *A. thaliana*'nın genom boyutunun oransal olarak küçük olması, mutant kütüphanelerinin varlığı ve gen aktarım çalışmalarına uygunluğu nedenlerinden ötürü de moleküler çalışmalar için uygun bitkilerdir. Ayrıca *A. thaliana* 2000 yıllarını sonlarına doğru genetik dizilimi tamamlanan ilk bitkidir (AGI, 2000; TAIR, 2011).



Şekil 1.1 *Arabidopsis thaliana* bitkisi

1.2. Stres Nedir?

Bir çevrede devamlı veya zaman zaman oluşan çok sayıdaki olumsuz ama ani şekilde ölümcül olmayan koşullara stres denir. Bir diğer deyişle; bitkilerde büyüme ve gelişmeye ket vurup metabolizmanın düzgün çalışmasını engelleyen

uygunsuz durumların bütününe, stres diyebiliriz. Stres kavramı genel olarak bitki toleransı ile yakın ilişki içerisinde (Gürel ve Avcıoğlu 2001).

Fizyolojik stresin tanımını yapacak olursak yaralanma, hasar görme gibi fizyolojik sonuçlar oluşturan, gidişatı değiştiren koşullar şeklinde ifade edilebilir. Biyolojik stresin en iyi tanımı normal sistem işleyişini engelleyici negatif güç veya etki diyebiliriz. Fakat buradaki kavram, türler ve ekotipler arasında farklılıklar gösterebilir. Çünkü stresli bir çevrede yetişen türün bireyleri bu sayede adaptasyon işleyiş biçimlerini geliştirebilirler.

Çevresel stres incelenirken zaman kavramı çok önemlidir. Çünkü çevresel değişimler ne kadar uzun sürerse fizyolojik strese neden olma olasılıkları o kadar artar. Stres olayı geçici süreyle meydana gelse bile bitki canlılığı için risk başlar veya geri dönüşümü olmayan zararlarla karşılaşabilmektedir (Çakırlar ve Topçuoğlu 1985, Larcher 1995, Lichtenthaler 1996, Taiz ve Zeigler 1998).

1.3. Bitkilere Etki Eden Stres Faktörleri

Bitkiler bulunduğu doğal çevredeki olumsuz çevre koşullarından etkilenirler. Stres faktörlerini abiyotik ve biyotik olarak ikiye ayırılırlar (Levitt 1972). Biyotik faktörler, enfeksiyon oluşturan mikroorganizmalar ile (bakteri, virüs ve fungus), zararlı hayvanlar (böcekler, nematodlar) ve diğer organizmaları sayabiliriz. Abiyotik faktörler de su, kimyasal madde, sıcaklık, ışık şiddeti, mineral eksikliği ya da fazlalığı gibi çevresel faktörlerdir. Abiyotik ve biyotik stresler aşağıdaki şemada özetlenmiştir.

ABİYOTİK	BİYOTİK
Sıcaklık	Bitkiler
Su	Mikroorganizmalar
Mineraller	Hayvanlar
Gazlar	Antropojenik Etkiler
Mekanik Etkiler	
Radyasyon	

Şekil 1.2 Çevresel stres faktörleri (Larcher 1995)

1.4. Işık ve Ultraviyole Radyasyon Stresi

Işık, yeşil bitkilerde klorofil pigmenti sayesinde fotosentez için gerekli temel enerji ihtiyacını karşılar. Bitkilerin büyüme ve gelişmelerinde ışığın rengi ve yoğunluğu, fotoperiyot süresince önemlidir. Bitkilere ulaşan toplam ışığın şiddeti ve süresi bitki dokularının fizyolojik ve morfolojik özelliklerini etkiler. Işık şiddeti olumsuz yönde (az ya da aşırı miktarda) değişirse bitkinin fotosentetik fonksiyonları yavaşlar veya durur.

Fotosentezde etkili olan ve gözümüzle görebildiğimiz ışınlar mor, mavi, yeşil, sarı, turuncu ve kırmızıdır. Dalga boyları farklılık gösteren bu ışıkların bitkiler üzerindeki etkileri de farklıdır. Dünya yüzeyindeki en kısa dalga boylu güneş ışını UV-B ışınlarıdır. Dünyamıza ulaşan UV-B' nin etkisi atmosferdeki ozon miktarına bağlıdır.

Renk	Dalga Boyu Aralığı (nm)	Temsili Dalga Boyu	Frekans (Hz x 10 ⁻¹⁴)	Enerji (eV/foton)
Ultraviyole	<400	254	11,80	4,88
*Mor	400-425	410	7,31	3,02
*Mavi	425-490	460	6,52	2,70
*Yeşil	490-550	520	5,77	2,39
*Sarı	550-585	580	5,17	2,14
*Turuncu	585-640	620	4,84	2,00
*Kırmızı	640-740	680	4,41	1,82
Kızılötesi	740<	1400	2,14	0,88

Şekil 1.3 Işık dalga boyları ve özellikleri (Kocaçalışkan 2004)

1.5. Bitkilerde UV-B Stresinin Morfolojik ve Fizyolojik Etkileri

Yapılan son araştırmalarda, UV-B'ye maruz kalan bitkilerde reaktif oksijen türleri (ROS)'nin miktarının arttığı gözlenmiştir (Arnots ve Murphy 1991). ROS sadece zararlı bir radikal olmayıp, ayrıca birçok genin ifadesini değiştiren sinyal molekülüdür.

DNA, UV ışınlarından en çok zarar gören bir moleküldür. Buna karşılık olarak RNA molekülü ve proteinler UV radyasyonuna karşı daha dayanıklıdırlar. Çünkü UV, nükleik asitlerdeki timin dimerlerinin inhibasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca sitozinin hidrasyona uğramasıyla da DNA çift sarmalındaki şeker-fosfat bağlarını kırmaktadır. Ayrıca UV'ye maruz kalan bitkiler hidrojen peroksit üretimine neden olur.

Bitkilerde UV'ye maruz kalan hücre zar ve diğer organeller, ROS'ların yıkıcı etkilerinden korunmak için oluşturdukları antioksidan defans sistemleri çok önemlidir. (Lee ve Lee, 2000). Savunmada birincil olarak epidermal hücrelerdeki UV-B absorblayan bileşiklerde bir artış olur ve giren UV-B' ye engel oluşturulur. Çevresel stres faktörleri ROS üretiminin artışına sebep olurlar. Zararlı ROS'ların detoksifikasyonu için gerekli antioksidan savunma mekanizmaları tüm bitki doku ve hücrelerinde bulunur (Seppanen ve Fagerstedt, 2000). Bu antioksidan koruyucu mekanizmaları enzimatik ve enzimatik olmayan şekilde ikiye ayırmak mümkündür. (Hernandez-Nistal vd., 2002). Bu enzimatik savunma mekanizmaları, katalaz (CAT), peroksidaz (POX), süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) enzimlerinden oluşurken, enzimatik olmayan savunma sistemleri ise glutatyon, askorbat (AsA), antosiyonin, karatenoid, α -tokofreol ve flavonoidlerden oluşurlar (Choi vd., 2002). Antioksidan koruyucu mekanizmalarının strese vereceği yanıtlar tamamen bitkilerin ve stresin çeşidine ve stresin uygulanacağı süre ile zamanın uzunluğuna bağlıdır.

1.6. Bitkilerin Strese Karşı Tepkileri

Bitkilerde stres faktörlerini, stresden kaçınma ve bunlara karşı tolerans olarak ikiye ayırırız:

Kaçınma: Stres faktörünün bitki hücre ve dokularına girişinin önlenmesi ya da azaltılması diyebiliriz. Stres faktörü yok olunca bitki stresten önceki haline döner (Orcutt ve Nilsen 2000). Bu sistem iki yolla gerçekleşir:

1. Bitkinin çevre ile etkileşim halinde olduğu yüzeylerindeki değişikliklerdir. Bu değişiklikler kimyasal ve morfolojik olarak belirtilir. Yaprak ayasını alanı / yaprak ayası kalınlığı, stoma büyüklüğü / stoma yoğunluğu, kütikula kalınlığı için morfolojik değişiklik, yaprak ve köklerdeki toksik etkinin sahip inhibe edici bileşenlerin oluşumuna ise kimyasal kompozisyonu olarak açıklanabilir. Kaktüs bitkisinin etli fotosentetik gövdesinin kuraklığa karşı yapraklarını diken şeklinde indirgemesi örneğini verebiliriz.
2. Mevsimsel olarak kaçınma (Ontogenetik değişimler): Strese maruz bırakılmadan önce dormant otogenetik faza geçiş sağlanarak bitki üretkenliği kesin hale getirilir.

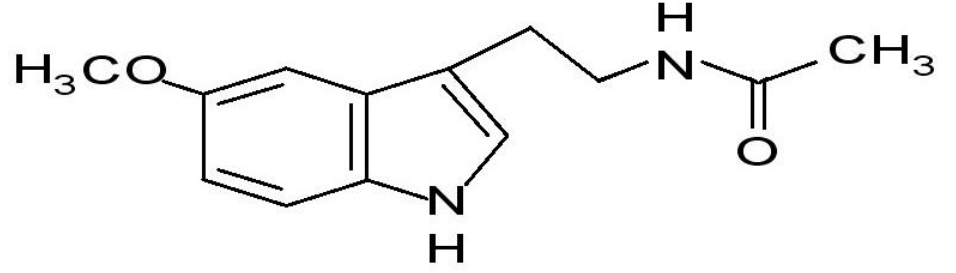
Tolerans: Stres faktörünün etkilerini yok etmeyi indirgeme ya da tamir mekanizmalarını ifade eder. Bu tepki türü, hücre ve doku seviyelerindeki farklılıkları, subselüler seviyedeki farklılıkları, moleküler ve submoleküler seviyedeki farklılıkları kapsar (Gürel ve Avcıoğlu 2001).

1.7. Melatonin ve Melatonin Biyosentezi

Melatonin (N-asetil-5-metotriptamin), ilk 1958 senesinde sığırın epifiz bezi üzerinden izolasyon yöntemiyle sağlanan indol amin molekülüdür (Lerner ve ark., 1958).

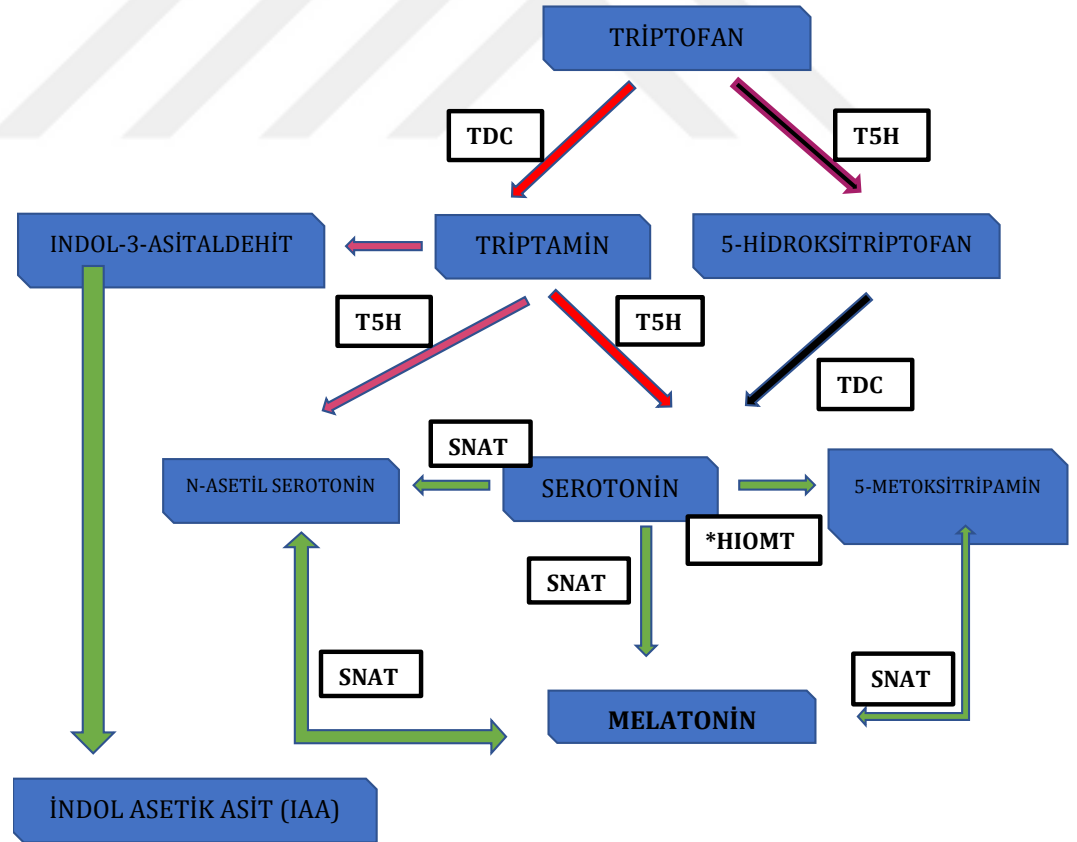
Melatonin, ilk olarak omurgalı hayvanlarda keşfedildiğinden dolayı yıllar boyunca sadece hayvanlara özgün bir düzenleyici olarak biliniyordu. (Reiter,1991).

Bu bakış açısı, 1995 senesindeki birbirlerinden bağımsız iki araştırmacının melatonini bitkilerde bulmasıyla değişmiştir (Dubbels ve ark., 1995; Hattori ve ark., 1995).



Şekil 1.4: Molekül formülü $C_{13}H_{16}N_2O_2$ ve molekül ağırlığı 232,28 g/mol (Anonim,2015) olan melatoninin kimyasal yapısının şeklidir.

Melatonin sentezi bitkiler, hayvanlar, algler ve bakteriler de dahil olmak üzere tüm canlılarda aromatik bir aminoasit olan triptofan (Trp)' dan başlar. Triptofan sadece melatoninin değil, tüm bitki ve hayvanlarda bulunan bir bileşik olan serotoninin (Ser) ve yine bitkisel bir hormon olan indol-3-asetik asetin (IAA) de sentezinin başladığı moleküldür.



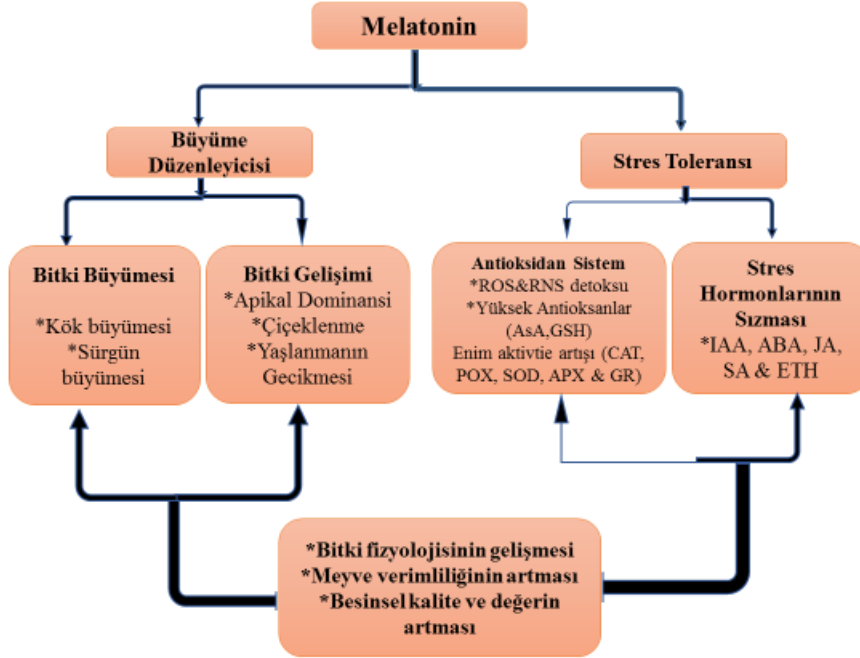
Şekil 1.5: Bitkilerde Melatonin Biyosentez Yolağı

Bitkilerde melatonin sentezi sırasında görev alan enzim sıralaması şu şekildedir:

- Triptofan dekarboksilaz (TDC), * aktivitesindeki artışın, melatonin sentezinde belirleyici rolü vardır (Byeon ve ark., 2014).
- Triptofan hidrosilaz (T5H),
- Serotonin N-asetiltransferaz (SNAT)
- Asetil serotonin O-metiltransferaz (ASMT) ve
- Hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimleridir. (HIOMT) enziminin en önemli özelliği melatonin seviyesini hız sınırlayıcı olarak belirler. (rate-limiting enzyme) (Byeon ve ark.,2014).

1.8. Bitkilerde Melatonin Fonksiyolarının Özeti

Aşağıdaki şekilde bitkilerde melatonin fonksiyonları özetlenmiştir. (Şekil1.6)



Şekil 1.6 Bitkilerde melatonin fonksiyonlarının özeti

1.9. Melatoninin Bitki Büyümesindeki Rolü

En temel rollerinden biri muhtemel bir bitki büyüme düzenleyicisi olarak görev almasıdır ve bu etkisi pek çok monokotil bitkide ortaya konulmuştur. IAA (İndol asetik asit) ve melatonin arasındaki yapısal benzerlikler ve ortak biyosentez yolu, melatoninin bir oksin gibi hareket edebileceği fikrine yol açmıştır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalardan;

- *Arabidopsis thaliana* türlerinde,
- Acı bakla (*Lupinus albus L.*), etiyole olmuş türünde hipokotillerinde aktif büyümeyi uyardığı bilinmekte ancak melatoninin yüksek konsantrasyon uygulamalarında ise engelleyici etkisi olduğunu belirtmişlerdir (Hernandez-Ruiz ve ark.; 2004; Hernandez-Ruiz ve Arnao; 2008). Yine aynı bitkinin farklı melatonin uygulamasında lateral köklerin biyokütlesinin arttığı görülmüştür (Arnao ve Hernandez-Ruiz, 2007).
- Bermuda çimi (*Cynodon dactylon*) gibi pek çok türde dışarıdan yapılan melatonin uygulamalarının kök ve sürgün gelişmesini teşvik ettiği bulunmuştur. (Bajwa ve ark , 2014;Wei ve ark,2015;shi ve ark,2015).

1.10. Stres Koşullarında Melatonin

Stres faktörlerine maruz kalan bitkilerde görülen melatonin seviyesindeki geçici artışlar, özellikle oksidatif stresin neden olduğu zararlı etkilere karşı bitkileri korumaya yönelik olduğu bildirilmiştir.

Örneğin; tuz, çinko, düşük sıcaklık ve kuraklık gibi değişik stres faktörleri altındaki arpa ve acı bakla bitkilerinde içsel melatonin seviyelerinin, stres faktörünün şiddetine ve uygulama zamanına göre ciddi artışlar gösterdiği bildirilmiştir (Arneo ve Hernandez-Ruiz, 2009b ve 2013a).

Yine UV-B stres faktörü, fotosentezin üç temel sürecini inhibe eder. Bu süreçler tilakoid membran fotofosforliasyon tepkimeleri, Calvin döngüsünde yaşanan enzim aktiviteleri ve CO₂ difüzyonundaki stoma sınırlandırılmalarıdır (Allen vd. 1998).

Örneğin; UV-B stres faktörü arpa bitkisine (*Hordeum vulgare*) uygulanmış ve bitkinin PSII'sinin yapı ve fonksiyonlarını ve PSI'e kadar olan elektron taşıma kapasitesini azaltarak fotosentetik aktiviteyi inhibe ettiğini belirtmişlerdir (Çiçek, Çakırlar ve Strasser, 2012).

1.11. Bitkiye Dışarıdan Uygulanan Melatonin

Melatonin içeren bitkiler bu indolamini sentezleyebilirler; ayrıca dışarıdan yetiştirme ortamından alınabilir. Toprakta ya da yaprakta uygulayarak da melatoninin almaları mümkündür. (Reiter ve ark. 2001). Örneğin; yüksek sıcaklık abiyotik stresi altında büyütülen hıyar bitkilerinde dışarıdan melatonin uygulanmıştır. Bunun sonucunda serbest radikallerin miktarında düşüş yaşanmış olup beraberinde doku iletkenliklerinin azaldığını ve buna karşın SOD, CAT, POX gibi enzimatik antioksidanların aktivitelerinde artış gözlemlenmiştir (Xu, 2010).

Melatonin dışarıdan tohum büyütme aşamasında çimlenme sırasında belirli bir oranda ilave edilebilir ya da bitkinin yaprağına püskürtülerek verilebilir veya köklerden sulayarak da bitkinin bünyesine verilebiliriz. Bu uygulamalardan bir tanesini örneklendirecek olursak; kuraklık stresi altında *Malus hupehensis* ve *Malus prunifolia* bitkilerine dışarıdan melatonin veriliyor ve bunun sonucunda stomaların daha uzun süre açık kaldığı belirtilmiştir. Böylece fotosentez hızı ve stoma iletkenliği artmıştır (Li ve ark., 2015).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Tohumların Temini

Çalışmamızda laboratuvarında bulunan *Arabidopsis thaliana* (Col) tohumları kullanılmıştır.

2.2. Tohumların Sterilizasyonu

Bitki tohumları 1 dakika boyunca %70 etanol varlığında yüzey sterilizasyonuna maruz bırakıldı ve sterilize edilen deiyonize su ile 5 defa yıkandı. Daha sonraki aşama da ise % 4 sodyum hipoklorit çözeltisi ile 10 dakika süresince yüzey sterilizasyonuna maruz bırakıldıktan sonra tekrardan 5 defa daha sterilize edilen deiyonize su ile yıkanma aşaması da gerçekleştirilmiştir.

2.3. Tohumların Ekimi

Tohumlar ışık alan sera koşullarında; siyah renkli tankların içinde, hidroponik ortamdaki ½ güçteki Hoagland besin çözeltisinde, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık olmak üzere ortalama 21°C sıcaklıkta yetiştirilmiştir.

2.4. Deneme Deseni ve Bitkilerin Yetiştirilmesi

Denemelerde 3 hafta boyunca hidroponik sistemle Hoagland çözeltisi içinde büyütülen bitkiler kullanılmıştır. UV-B stresi, 90 ve 180 dakika süreyle yapraklara 30 cm uzaklıkta konumlandırılan UV-B floresan lamba ile aydınlatma ile gerçekleştirilmiştir. Melatonin uygulaması için bitkilere UV-B stresinden 1 gün önce büyüme ortamından 10 µM melatonin uygulanmıştır. Alınan numuneler -80°C'de analiz için saklanmıştır.

K90	Kontrol (UV ve Melatonin uygulanmadı)
UV90	UV-B 90 dk
M90	10 μ M Melatonin 90 dk
UVM90	UV-B+Melatonin 90 dk (UV ve Melatonin uygulandı)
K180	Kontrol 180 dk (UV ve Melatonin uygulanmadı)
UV180	UV-B 180 dk
M180	10 μ M Melatonin 180 dk
UVM180	UV-B+Melatonin 180 dk (UV ve Melatonin uygulandı)

Şekil 2.1 Deneme desenindeki gruplar

2.5. F_V/F_M Ölçümü

F_V/F_M oranı hesaplanırken seçilen yapraklar klipslerle tutturulup 30 dakika süresince karanlığa alıştırılmıştır. 30 dakikanın sonunda klipsler proba yerleştirildikten sonra klipsler açılmış ve F_V/F_M okumaları Hansatech cihazında yapılmıştır.

2.6. Biyokimyasal Parametreler

2.6.1. Lipid Peroksidasyonu

Rao ve Sresty (2000)' e göre bitkinin yapraklarındaki lipid peroksidasyonu, tiobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) miktarı ölçülerek belirlenmiştir. İki absorbans değerlerinde (532 nm ve 600 nm) ölçülen sonuçlara göre TBARS konsantrasyonu ölçülmüştür. Gerçek TBARS miktarını, 532 nm'de ve 600 nm'de hesaplanan absorbansın sonuçlarını spesifik olmayan turbiditeden çıkartılarak belirledik. TBARS miktarını hesaplamak için ekstinksiyon katsayısını $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak aldık.

2.6.2. Enzim Aktivite Analizleri ve Antioksidan Enzim Ekstraksiyonu

Proteaz aktivitesinin minimum seviyede olması için bu aşamadaki bütün işlemler 4°C'de uygulanmıştır. Enzim ve protein ekstraktlarının hazır hale getirilmesi için ilk olarak; 0,1 gr yaprak numunesi sıvı azot beraberinde ezilerek toz hale getirilmiştir. Hemen ardından 0,5 ml ekstraksiyon tamponunu, (2 mM ditioeritritiol (DTT), 1 mM fenilmetilsülfonilflorid (PMSF), 0,1 mM etilendiamintetraasetikasit (EDTA), 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 0,2% (v/v) Triton-X100 homojenize edilmiştir. Homojenizasyon tamponunda DTT yerine %2 (w/v) PVPP kullandık ve 5 mM askorbik asit ekledik ve böylece askorbat peroksidaz aktivitesinin analizi yapılmıştır. Homojenizasyondan sonra numuneler, 10000 g içeriğinde 5 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Bu olaylardan sonra da elde ettiğimiz süpernatantlar protein miktarlarının ve enzim aktivitelerinin tayininde kullanılmıştır. Analizleri yapım aşamalarında numunelerin kendilerini yineleyip donarak çözülmesinin önüne geçmek için de elde edilen süpernatantlar ayrı ayrı ependorflara paylaştırılmıştır.

2.6.3. Protein Miktarının Tayini

Protein miktar tayinin Bradford (1976)' a göre belirledik. Hesaplama asidik şartlar altında Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteine bağlandığında renginin kırmızı veya yeşil formundan mavi renge dönüşmesiyle olmaktadır. Kırmızı ya da yeşilden dönüşen mavi rengin oluşumu 595 nm'de hesaplanmıştır. Standart format olarak da Bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır. Standart aralık 0,02 ile 0,2 mg/ml arasında belirlenmiştir. Bitkinin ekstraktlarının protein miktarlarını da bu bulduğumuz standart ile karşılaştırıp hesaplama yapılmıştır.

2.6.4. Bitki Yapraklarında Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Tayini

Katalaz (CAT (EC 1.11.1.6)) aktivitesi, hidrojen peroksidinin süpürülmesinin 240 nm'de absorbansında yol açtığı indirgenmenin izlenmesi ile Bergmeyer (1970)'in elde ettiği verilerden elde edilmiştir. %3 H₂O₂ ve 0.1 mM EDTA içeren 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponu bize reaksiyon karışımını verir. Bu enzimin, 1 mg toplam protein başına 1 dakikada süpürdüğü µmol H₂O₂ içeriği, 1 U (µmol H₂O₂ mg protein⁻¹ min⁻¹) olarak elde edilmiştir.

2.6.5. Bitki Yapraklarında Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz (POX (EC 1.11.1.7)) aktivitesi, Herzog ve Fahimi (1973) verilerine göre belirlenmiştir. Yöntem hakkında bilgi verecek olursak, reaksiyon karışımındaki 3,3'-diaminobenzidine-tetra hidroklorid dihidrat (DAB)'ın H₂O₂'yi süpürmek için ekstrakttaki peroksidazlar tarafından substrat olarak kullanılması ve bununla beraber renk görülmesinin hesaplanmasına dayanmaktadır. Reaksiyon karışımının içeriği: DAB, %0,6 H₂O₂ ve %0,1 (w/v) jelatin içeren 150 mM sodyum fosfat sitrat tamponundan oluşur (belirlenen pH: 4,4). 465 nanometredeki absorbans ölçümü 3 dakika boyunca gözlemlenmiştir. Enzimin, 1 mg toplam protein başına 1 dakikada oksitlediği DAB miktarını, 1 U ($\mu\text{mol DAB mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$) olarak ölçülmüştür.

2.6.6. Bitki Yapraklarında Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APX (EC 1.11.1.11)) aktivitesi Nakano and Asada (1981) verilerine göre belirlenmiştir. Ölçümün ana teması, 290 nanometredeki absorbansın askorbat peroksidazın oksitlenmesine bağlı olarak azalmasının gözlemlenmesine dayanır. 0,1 mM H₂O₂, 0,1 mM EDTA ve 0,5 mM askorbat içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu reaksiyonundan elde ettiğimiz karışımdır (pH 7,0). Ekstinksiyon katsayısı 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ kullanılarak oksitlenen askorbat miktarı elde edilmiştir. Enzimin 29. dakikanın sonundaki 1 mg toplam protein başına oksitlediği askorbat miktarını, 1 U ($\mu\text{mol askorbat mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$) olarak elde edilmiştir.

2.6.7. Bitki Yapraklarında Antioksidant Enzimlerin İzoenzim Tayini

Numunelerden elde ettiğimiz protein ekstraktları denaturasyona neden olmayan şartlarda (SDS içermeyen) poliakrilamid jel elektroforezinde (Native-PAGE) ayrılmış ve boyama işlemi de enzimlere özel boyama solüsyonuyla yapılmıştır. Numunelerin hazırlanma aşamasında aktivite analizlerinde kullanılan ekstraksiyon prosedürü esas alınmıştır. Bu prosedür, Laemmli (1970)'nin verilerine göre Native-PAGE SDS kullanılmadan elde edilmiştir. Örnekler, Jeller

Vilbert Lourmat jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve sonrasında Bio-Capt yazılımı kullanılarak bant yoğunlukları da analiz edilmiştir.

2.6.8. Bitki Yapraklarında Süperoksit Dismutaz (SOD) İzoenzim

Tayini

Numuneler ve %4' lük hizalama (stacking) jeli içerisinde ve %12.5' lik ayırma (separating) jelinde elektroforetik ayırma maruz bırakılmıştır. Kuyucukların herbirine çimlenen ve çimlenmeyen embriyolar için sırasıyla 20 µg ve 40 µg protein yüklemesi yapılmıştır. Beauchamp ve Fridovich'in (1971) bulgularına göre SOD boyaması, nitrobluetetrazolium (NBT) ve riboflavin boyasıyla tayin edilmiştir. Bu boyalardan riboflavin, ışıkla birlikte süperoksit anyonu (O_2^-) üretme özelliğine sahip olduğu ve bu üretilen O_2^- , NBT'yi oksitleyerek mavi-mor renge formazan oluşumuna neden olmaktadır. Boyamanın prensibinde, jel üzerindeki SOD'un lokalize olmuş bölgelerde NBT oksitlenmesinin yıkımı sonucunda beyaz bantların belirginleşmesiyle olur. Jeller 60 dk. karanlık alanda ve boya karışımına bırakıldıktan belirli bir süre ışık altında çalkalanarak bantların oluşması beklenmiştir.

Vitória *et al.* (2001)' in verilerinden yola çıkarak, SOD'un izoenzim tipleri boya solüsyonlarına inhibitörler eklenerek elde edilmiştir. Cu/ZnSOD inhibisyonu için Cu/ZnSOD, 2 mM KCN ve FeSOD inhibisyonu içinde 3 mM H_2O_2 kullanıldı. MnSOD aktivitesinde her iki inhibitörden de etkilenme gerçekleşmemiştir.

2.6.9. Bitki Yapraklarında Peroksidaz (POX) İzoenzim Tayini

Proteinlerin ayrımı için %4' lük hizalama ve %10' luk ayırma jelinden yararlanılmıştır. Her kuyucuğa 20 µg protein yüklemesi yapılmıştır. Seevers *et al.* (1971)' in verilerine göre POX izoenzimlerinin boyanması yapılmıştır. %3 H_2O_2 ve 1.3 mM DAB içeren 200 mM sodyum asetat tampon (pH 5.0), boya solüsyonunu oluşturur. Boyama işlemi, DAB'ın oksitlenmesi ve kahverengi bantlarında oluşmasıyla peroksidaz enzimlerinin bulunduğu bölgelerde gerçekleşmektedir. Verilerden elde edilen jeller %7' lik asetik asitte kalıcı hale getirilmiştir.

2.6.10. Bitki Yapraklarında H₂O₂ Miktarı Tayini

H₂O₂ miktarı bazı değişiklikler yapılarak Cheeseman (2006)'nın yöntemine göre saptanmıştır. Standart H₂O₂ analizinde 25 mM H₂SO₄ (Sülfirik asit) içinde; 250 µM ferrous amonyum sülfat (Amonyum demir(II) sulfat heksahidrat), 100 µM D-Sorbitol, ve 100 µM xyleneol orange çözüldüğünü bilmekteyiz. Bu yöntemde içinde ferrous amonium sulphate/xyleneol orange bulunan eFOX tamponuna %1 etil alkol (EtOH) katılmıştır. Analizde kullanılacak numuneler analize kadar sıvı azot içerisindeki kaplarda korunmuştur. Eğer numuneler, -20 °C veya -80 °C derecede saklanırsa H₂O₂ içeriğinde kısa sürede hemen hemen %60 seviyelerinde kayıplar görülebilmektedir (Cheeseman, 2006). 0,1 g yaprak numunesi sıvı azot ile toz haline getirilip sonra soğuk asetonla (-20 °C) hazırlanan 25 mM H₂SO₄ ile de homojenizasyonu sağlanmıştır. Homojenatlar 4000 g' de 4 °C' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde ettiğimiz süpernatanttan 50 µl alınıp, üstüne 1 ml ölçüsünde eFOX tamponu koyulmuştur. Elde edilen karışımı en az 15 dakika bekletip; 550 ve 800 nm dalga boylarındaki absorbansları ölçülmüştür. Sonuçları ise absorbansların farkı alınarak hesaplanmıştır.

2.6.11.Gen İfadesinin Belirlenmesi

0,1 gr örnekten RNA izolasyonu, QIAGEN RNAasy kit ile üreticinin talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi Applied Biosystems RNA-to-cDNA kit kullanılarak talimatlara uygun olarak yapılmıştır. PCR karışımı (20 µl), eşit miktarda cDNA ile SYBR Green Master Mix kullanılarak hazırlanmıştır. Kullanılan primerlerin tablosu Şekil 2.2'de verilmiştir. Kantitatif PCR ise 95 °C 10 dk., 45 döngü (95 °C 15 sn., 60 °C 15 sn, 72 °C 30 sn), 72 °C 10 dk. olarak gerçekleştirilmiştir.

AtAOX1a F: CTG GAC CAC GTT TGT TC
AtAOX1a R: ACA CCC CAA TAG CTC G
AtAOX1b F: GAT GAT GAG TCG TCG CT
AtAOX1b R: CCA CCG CTA GAT CCT T
AtAOX1c F: CAC TAC ATT ACT CCG TCG
AtAOX1c R: CTT CAC GCC CCA ATA ACT A
AtAOX1d F: TAC CGC ACT CTT CGA C
AtAOX1d R: GGC TGG TTA TTC CCA CT
AtPTOX F: CCA GTG GAG AGG AGT TGA AGA
AtPTOX R: AGA TTT TCT ATT ACT GGT CTT CGA G
AtGPX1 F: GTC TCC GGT AAC CAA AAA TG
AtGPX1 R: GAC GAG AAA GGT TGC TGA GG
AtGPX2 F: AAA CTG CGT TGG GAC AGG
AtGPX2 R: CCC ATG AAA AGA CAT CGA ATA C
AtGPX3 F: GGG TCA ATC AGC GAG CTA C
AtGPX3 R: CGA TGG CGA AGA AGG GTA TC
AtGPX4 F: GGG AAA GTC CTC CTC ATC GTC
AtGPX4 R: GTG CCG GGC TCC TGG TAT A
AtGPX5 F: CAA AAC GCT GCA CCA GTC
AtGPX5 R: GAC CAT CTT TGC CGA CCA AG
AtGPX6 F: GCT CTT TGG AGA CGG CAT TA
AtGPX6 R: AGG TGA GGT AGT TGG TGC GA
AtGPX7 F: TCG GCC CAT CAT TGA GAT TC
AtGPX7R: CTG CAG CCC TTG CAT AGA C
AtGPX8 F: GAA AGG CAA ATG GGG AAT C
AtGPX8 R: CAG CTT GAC CGT TTT TGT C
AtBI F: GGA CTG CTT TCA TCT GGC TTG T
AtBI R: GAT AGA TGC AGA GCC ACC AAA GA
AtNAC089 F: ACT GGG AAA GAG CGT GAT GT
AtNAC089 R: TGG TGC CTT CTG ACT TGT AC
AtRBOHD F: ATT ACA AGC ACC AAA CCA G
AtRBOHD R: TTC TCC GAC CAT CTC ACT A
AtRBOHF F: TCA CAA ATC AAC GAC GAG AGT T
AtRBOHF R: CCC ATC TTC ATT CTT GTC CA
AtACT8 F: TCAGCACTTTCCAGCAGATG
AtACT8 R: ATGCCTGGACCTGCTTCAT

Şekil 2.2 Çalışmada kullanılan primerler

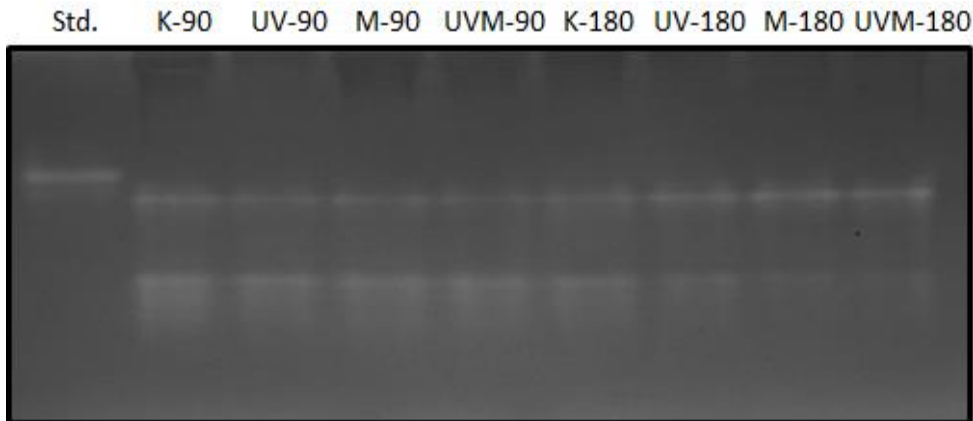
3. BULGULAR

3.1. Enzim ve İzoenzim Aktiviteleri

3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

UV ve UV+melatonin uygulanan bitkilerde kontrol grubuna kıyasla hem 90. hem de 180. dakikada düşüşler gözlenmiştir. Uygulamanın 90. dakikasında alınan örneklerden yapılan analizler sonucunda; UV90 grubunda K90 grubuna oranla %7,5 azalma gözlenmektedir. Sadece melatonin uygulanan M90 grubunda ise, kontrole göre %17,4'lük bir azalma gözlenmiştir. Hem UV hem de melatonin uygulanan UVM90 grubunda ise kontrole oranla %10'luk bir azalma görülmüştür.

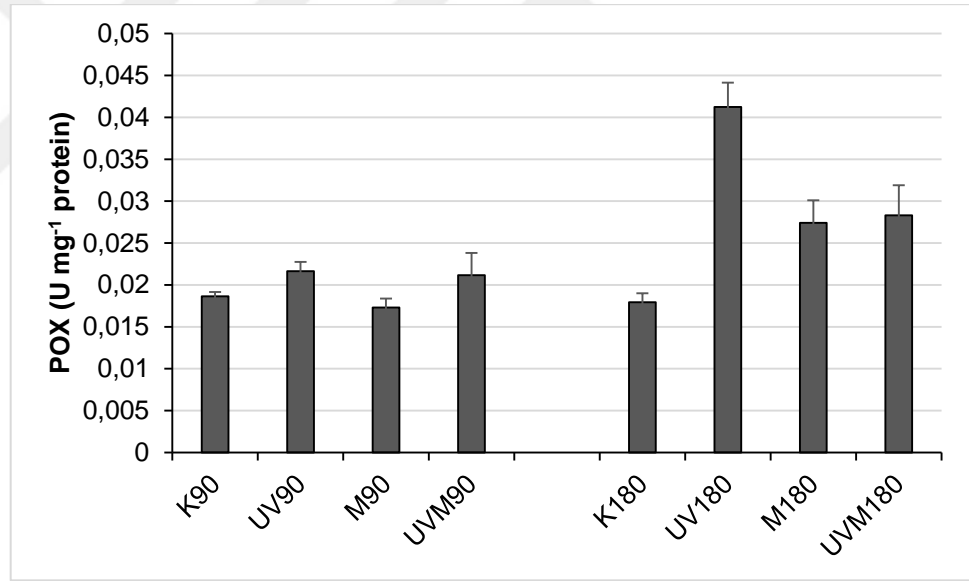
180.dakikada alınan örneklerden yapılan analiz sonucunda, UV180 grubunda K180 grubuna göre %11,4'lük bir azalma gözlenmektedir. Sadece melatonin uygulanan M180 grubunda ise, kontrole göre %13'lük bir azalma gözlenmiştir. Hem UV hem de melatonin uygulamasının 180. dakikasında ise UVM180 grubunda kontrole kıyasla gerçekleşen azalma istatistiksel olarak önemli değildir. (Şekil 3.1)



Şekil 3.1 Uygulama yapılan gruplardaki SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM),. Her kuyucuk 100 µg/ µl protein içermektedir. Std: 1 U bovine karaciğeri SOD standartı.

3.1.2. Peroksidaz (POX) Aktivitesi

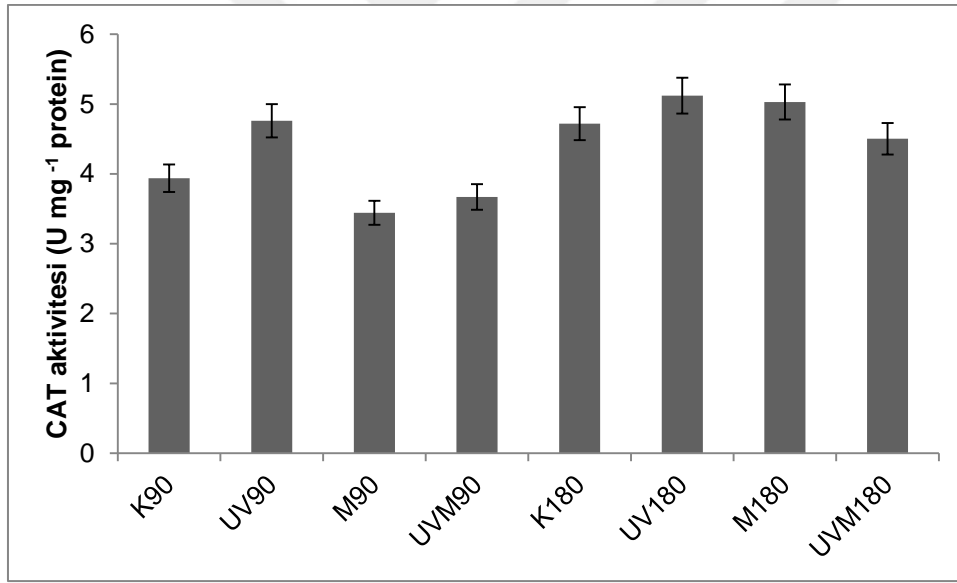
90 dakikalık ve 180 dakikalık Kontrol, Ultraviyole, Melatonin ve Ultraviyole + Melatonin gruplarında POX aktivitesinde kontrol grubuna istatistiksel olarak birbirlerine kıyasla farklı değişimler olmuştur. Her iki Kontrol gruplarının kendi aralarındaki kıyaslamaya göre sadece 90 dakika ultraviyole uygulanan UV90 grubunda %11,1'lik bir artış gösterirken bu oran 180 dakika ultraviyole uygulanan UV180 grubunda ise %135'lik bir artış olarak hesaplanmıştır. Sadece melatonin uygulanan M90 grubunda ise K90 grubuna göre %7'lik bir azalma gösterirken, sadece melatonin uygulanan M180 grubunun K180 grubuna oranlar %52,7'lik bir artış yaptığı gözlenmektedir. Sadece ultraviyole uygulanan grupları kendi uygulama süreleri arasındaki kontrol gruplarına yapılan kıyaslamada UVM90 ve UVM180 grupları K90 ve K180 gruplarına oranla sırasıyla %16,1'lik ve %57,8'lik bir artış kaydedilmiştir. (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Uygulama yapılan gruplardaki toplam POX aktivitesi. Uygulama grupları: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), ($p < 0.05$).

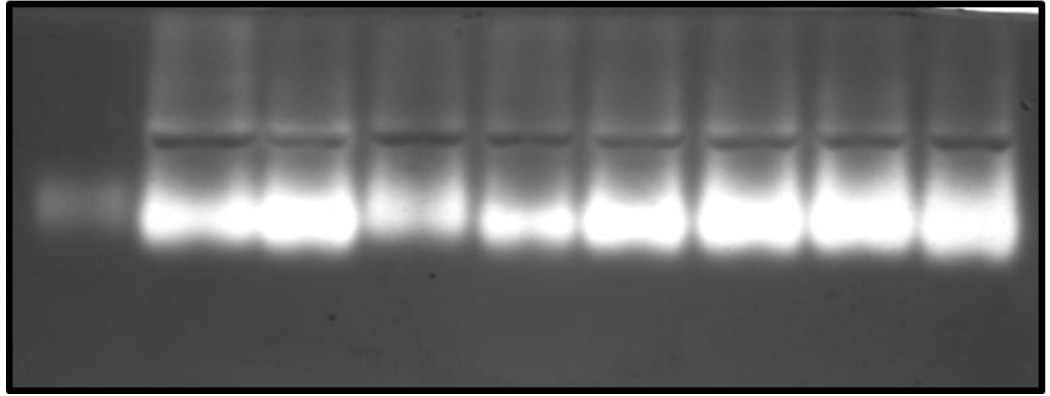
3.1.3. Katalaz (CAT) Aktivitesi ve İzozim Deseni

CAT aktivitesi, UV stresi sırasında, 90 dakikalık ve 180 dakikalık uygulamaların her ikisinde de kontrol gruplarına kıyasla artış göstermiştir. Buna karşın 90 dakikalık sadece melatonin uygulanan M90 ve melatonin + ultraviyolenin birlikte uygulandığı UVM 90 gruplarında ise K90 grubuna oranla sırasıyla %12,4' lük ve %6,8'lik bir azalma olduğu hesaplanmıştır. Ancak en belirgin artış %20,9'luk artış ile UV90 grubuna aittir. Buna karşın 180 dakika uygulanan gruplara baktığımızda ise, sadece melatonin uygulanan M180 grubu kontrole oranla %6,3'lük artış gösterirken, melatonin + ultraviyolenin birlikte uygulandığı UVM180 grubunun kontrole oranla %4,66'lık bir azalma görülmüştür. (Şekil 3.2).



Şekil 3.3 Uygulama yapılan gruplardaki total CAT aktivitesi. Uygulama grupları: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), (p<0.05).

Std. K-90 UV-90 M-90 UVM-90 K-180 UV-180 M-180 UVM-180

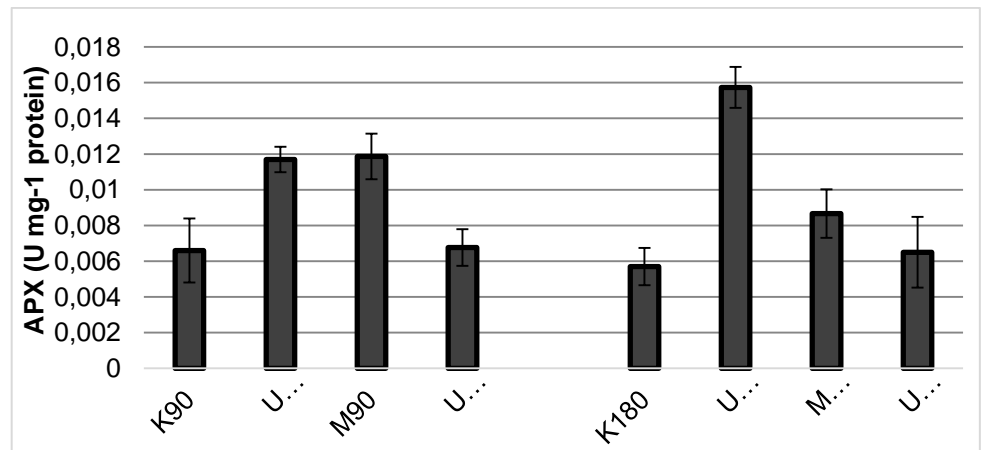


Şekil 3.4 Uygulama yapılan gruplardaki total CAT izozim ve total CAT aktiviteleri. Uygulama grupları: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), ($p < 0.05$).. Her kuyucuk $20\mu\text{g/ml}$ protein içermektedir. ($p < 0.05$).

3.1.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi

APX aktivitesi, sadece ultraviyole uygulanan UV90 ve sadece melatonin birlikte uygulandığı M90 gruplarında 90 dakikalık kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %77,2'lik ve %79,8'lik ciddi artışın olduğu buna karşın ultraviyole + melatonin uygulanan UVM90 a göre de %2,53'lik artış hesaplanırsa da bu değer istatistiki anlamda anlamsızdır.

Benzer biçimde 180 dakikalık uygulamalardaki tüm grupların kontrol grubuna kıyasla ciddi anlamda artışlar görülmüştür. Bu oranlar sırasıyla UV180 grubunda %175,9'luk, M180 grubunda %52'lik ve UVM180 grubunda ise %14,3 lük artış olarak hesaplanmıştır. (Şekil 3.5)

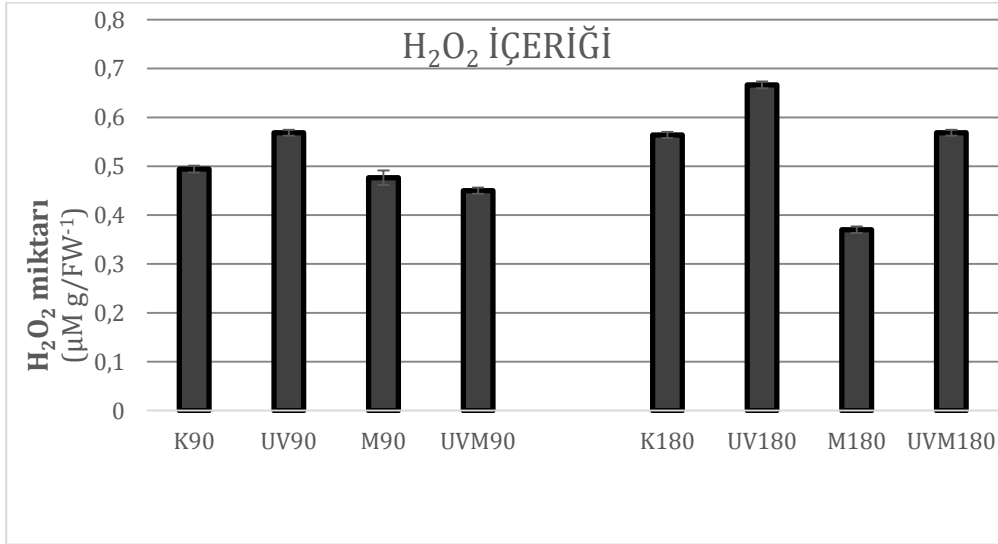


Şekil 3.5 Uygulama yapılan gruplardaki total APX aktivitesi. Uygulama grupları: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), ($p < 0.05$).

3.1.5. H₂O₂ Miktarı

H₂O₂ içeriğini incelediğimizde, sadece UV uygulanan bitkilerde kontrol grubuna kıyasla hem 90. hem de 180.dakikada artışlar gözlenmiştir. Uygulamanın 90.dakikasında alınan örneklerden yapılan analizle; UV90 grubunda K90 grubuna göre %19,3'lük artış gözlenmektedir. Sadece melatonin uygulanan M90 grubunda ise, kontrole göre yine %3,7'lik bir artış gözlenmiştir. Hem UV hemde melatonin uygulanan UVM90 grubunda ise kontrole göre %5,9'luk bir azalma görülmüştür.

180.dakikada alınan örneklerden yapılan analiz sonucunda, UV180 grubunda K180 grubuna göre %73,5'lik bir artış gözlenmektedir. Benzer şekilde hem UV hemde melatonin uygulamasının 180.dakikasında ise UVM180 grubunda K180 grubuna oranla % 46,9'luk bir artış gözlenmiştir. Buna karşın sadece melatonin uygulanan M180 grubunda ise, kontrole göre %3,1'lik gerçekleşen azalma istatistiksel olarak önemli değildir. (Şekil 3.6)

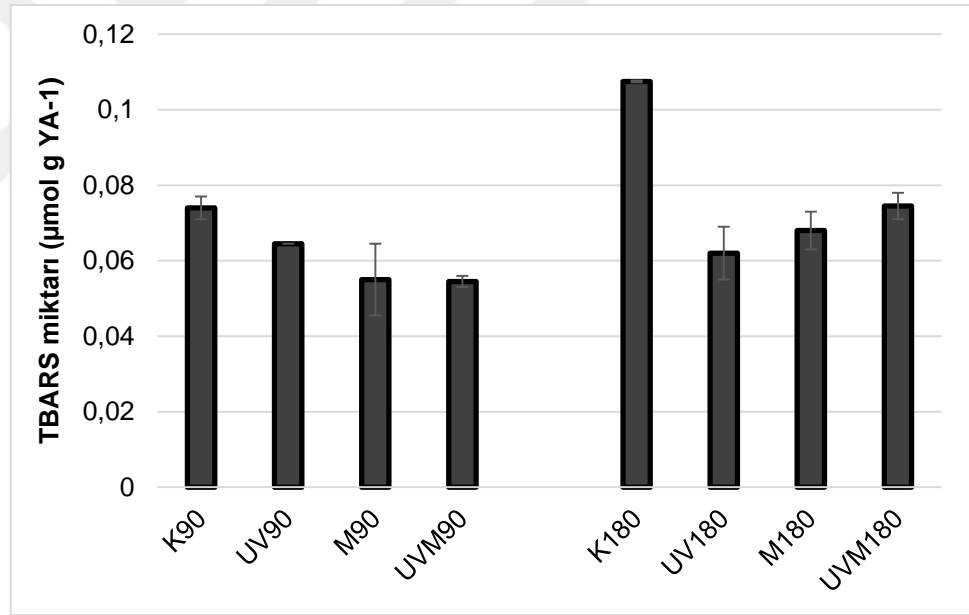


Şekil 3.6 Uygulama yapılan gruplardaki H₂O₂ içerikleri. Uygulama grupları: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM).

3.1.6. Lipit Peroksidasyonu

Lipid Peroksidasyon analizinde; 90 dakikalık örnekler incelendiğinde tüm gruplardaki bitkilerin, kontrol grubuna kıyasla ciddi düşüşler gözlenmiştir. Bu analiz incelendiğinde; UV90 grubunda K90 grubuna göre %12,8'lik, sadece melatonin uygulanan M90 grubunda K90 grubuna göre %25,6'lık ve hem UV hemde melatonin uygulanan UVM90 grubunda ise kontrole oranla %26,3'lük artış görülmüştür.

180.dakikada alınan örneklerden yapılan analiz sonucunda da, tüm grupların istatistiksel olarak düşüşte olduğunu gözlemlenmiştir. Bu bağlamda sırasıyla ultraviyole uygunan UV180 grubda, melatonin uygulanan M180 grubunda ve hem ultraviyole hem de melatonin uygulanan UVM180 grubunda K180 grubuna göre sırasıyla %42,3, %36,7 ve %30,7'lik ciddi düşüşler gözlenmektedir. (Şekil 3.7).



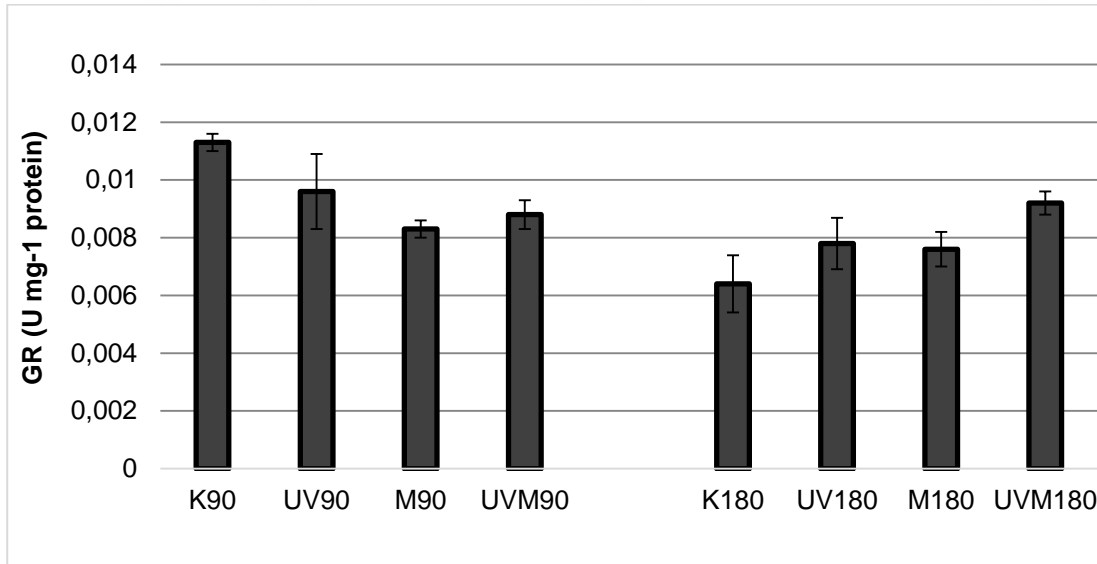
Şekil 3.7 Uygulama yapılmış gruplardaki TBARS içerikleri. Uygulama grupları: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), ($p < 0.05$).

3.1.7. Glutasyon Reduktaz (GR) Aktivitesi

Glutasyon reduktaz analizinde; 90 dakikalık örnekler incelendiğinde tüm gruplardaki bitkilerin, kontrol grubuna kıyasla azalmalar gözlenmiştir. Bu analiz

incelendiğinde; UV90 grubunda K90 grubuna göre %15,9'luk, sadece melatonin uygulanan M90 grubunda K90 grubuna göre %26,5'lik ve hem UV hem de melatonin uygulanan UVM90 grubunda ise kontrole oranla %23'lük azalmalar görülmüştür.

Buna karşın 180 dakikalık örnekler incelendiğinde ise tüm gruptaki bitkilerin, kontrol grubuna kıyasla artışlar gözlenmiştir. Bu analiz incelendiğinde; UV180 grubunda K180 grubuna göre %20,3'lük, sadece melatonin uygulanan M180 grubunda K180 grubuna göre %18,7'lik ve hem UV hem de melatonin uygulanan UVM180 grubunda ise kontrole oranla %43,7'lik artışlar görülmüştür. (Şekil 3.8)



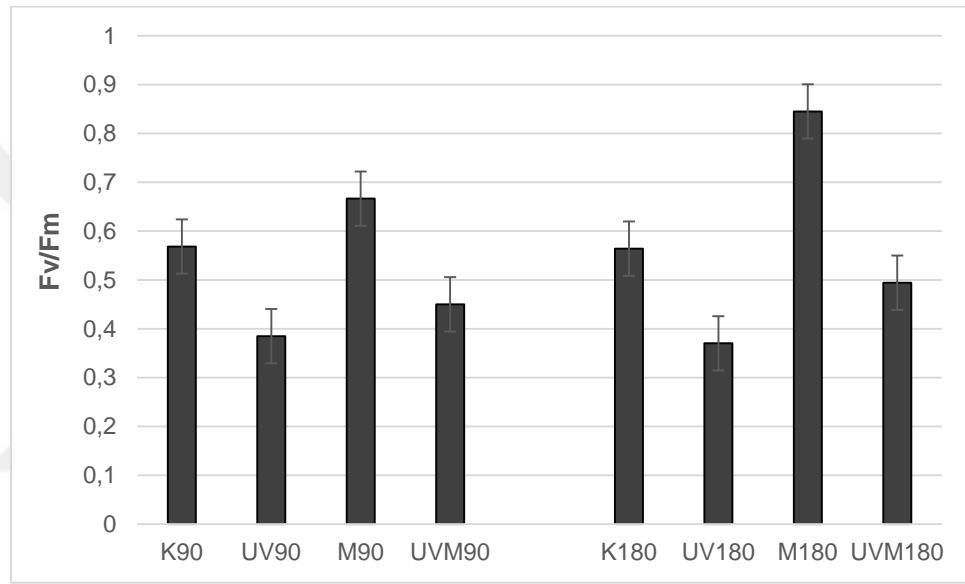
Şekil 3.8 Uygulama yapılan gruptaki total GR aktivitesi. Uygulama grupları: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), ($p < 0.05$).

3.2. F_v/F_M Oranı

F_v/F_M oranlarını incelediğimizde sadece ultraviyole uygulanan gruplar ve ultraviyole + melatonin uygulanan her iki grup bitkilerde de kontrol gruplarına kıyasla hem 90. hem de 180.dakikada ciddi düşüşler gözlenmiştir. Uygulamanın 90.dakikasında alınan örneklerden yapılan analizler sonucunda; UV90 grubunda K90 grubuna göre %32,3'lik azalma ve UVM90 grubunda yine K90 grubuna oranla %24,7'lik azalış gözlenmektedir. Sadece melatonin uygulanan M90 grubunda ise K90 grubuna oranla %17,2'lik bir artış söz konusudur.

180.dakikada alınan örneklerden yapılan analiz sonucunda da yine benzer grafik ortaya çıkmıştır. UV180 grubunda K180 grubuna göre %34,1'lik azalma ve UVM180 grubunda yine K180 grubuna oranla %19,80'lik azalış gözlenmektedir. Sadece melatonin uygulanan M180 grubunda ise, yine kontrole oranla %49,8'lik bir artış gözlemlenmiştir.

Buradan yola çıkarak UV stres ortamında yapraklardaki fotosentez oranının azaldığını ve melatonin ortamında ise fotosentetik aktiviteyi arttırdığını söyleyebiliriz. (Şekil 3.9)

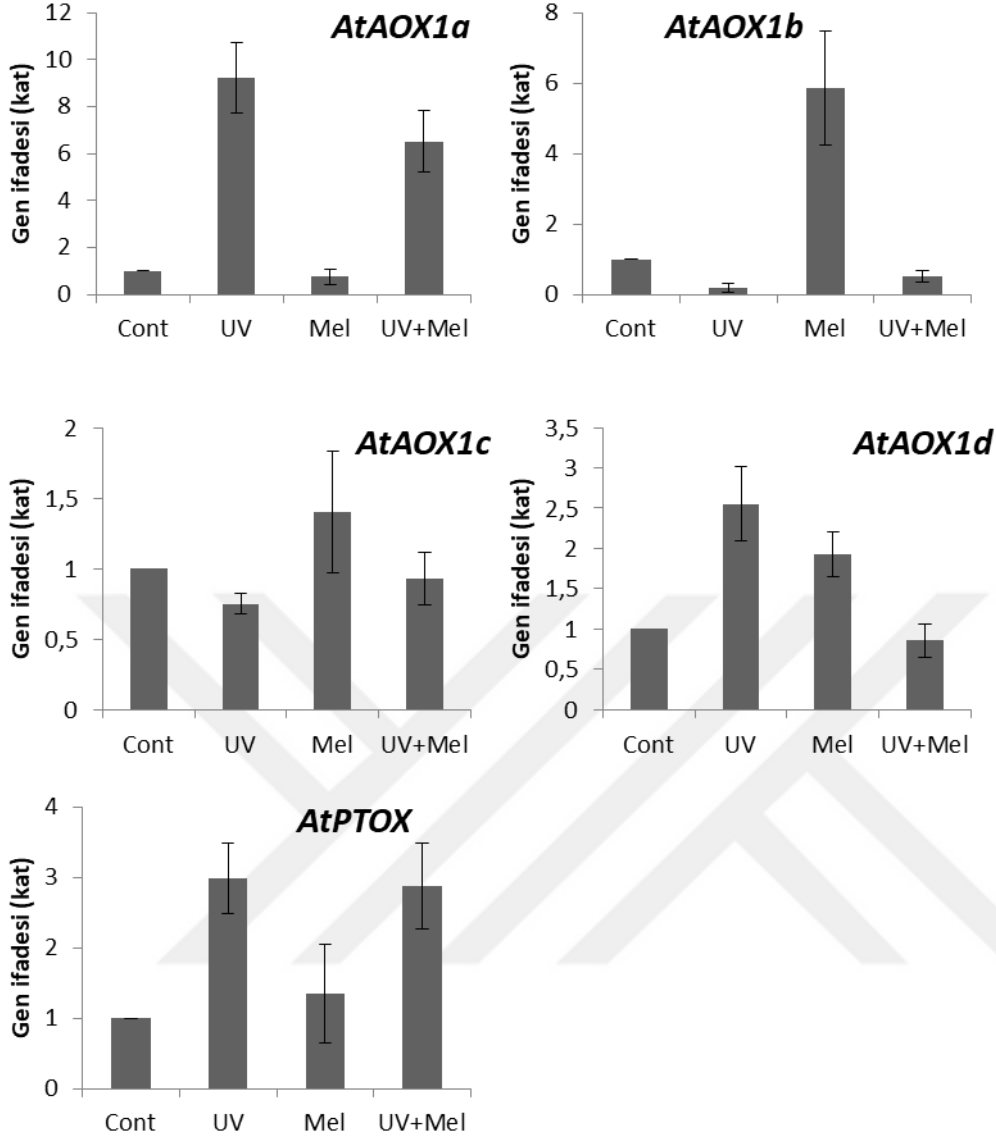


Şekil 3.9 F_v/F_m Uygulama grupları: 90 dk Kontrol (K), 90dk Ultraviyole (UV), 90 dk Melatonin (M), 90dk Ultraviyole + Melatonin (UVM), 180dk Kontrol (K), 180dk Ultraviyole (UV), 180 dk Melatonin (M), 180dk Ultraviyole + Melatonin (UVM).

3.3. Gen İfadesinin Belirlenmesi

3.3.1. Alternatif oksidaz ve Plastid terminal oksidaz ilişkili genlerin ifadeleri

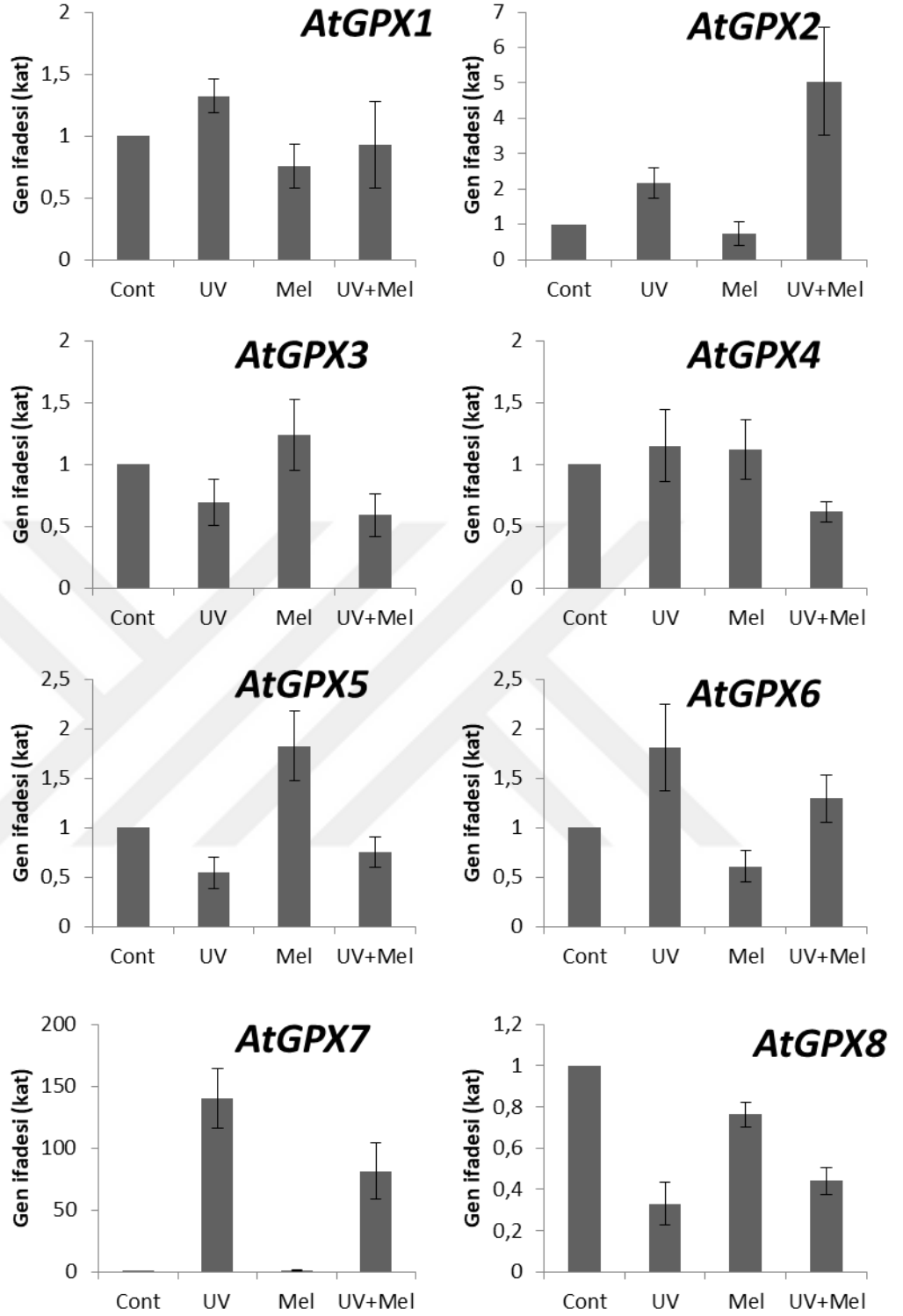
UV uygulaması ile *AtAOX1a* gen ifadesi 9 kat artmıştır. UV+Mel uygulaması ile bu artış 6.5 kat olarak belirlenmiştir. *AtAOX1b* gen ifadesi Mel uygulaması ile 6 kat artmıştır. *AtAOX1d* gen ifadesi UV uygulaması ile 2.5 kat artmış, UV+Mel uygulaması ile kontrol seviyesine düşmüştür. *AtPTOX* gen ifadesi UV uygulaması ile 3 kat artmıştır. UV+Mel uygulaması ile de 2.8 kat artış belirlenmiştir.



Şekil 3.10 Alternatif oksidaz ve plastid terminal oksidaz ilişkili genlerin ifadeleri.

3.3.2. Glutasyon peroksidaz ilişkili genlerin ifadeleri

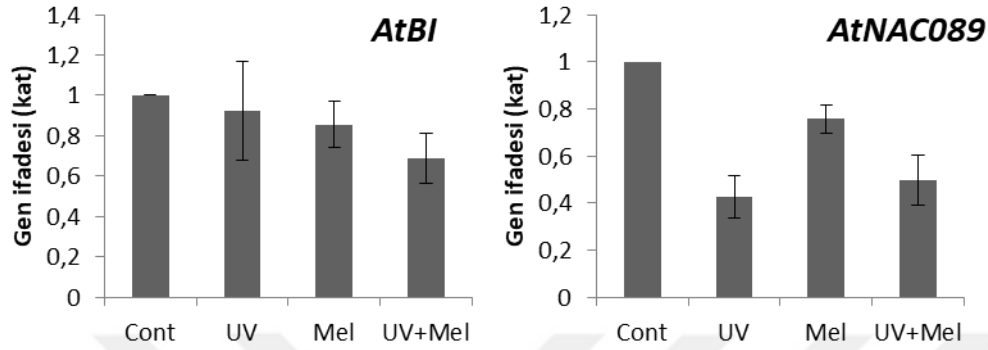
AtGPX2 gen ifadesi UV+Mel uygulaması ile 5 kat artmıştır. *AtGPX7* gen ifadesi UV uygulaması ile 140 kat artmıştır. UV+Mel uygulaması ile de 81 kat artmıştır. Mel uygulaması bu genin UV stresi altındaki ifadesini azaltmıştır. *AtGPX1*, 3, 4, 5, 6, 8 gen ifadeleri uygulamalar sonrasında anlamlı bir değişikliğe uğramamışlardır.



Şekil 3.11 Glutasyon peroksidaz ilişkili genlerin ifadeleri.

3.3.3. Programlanmış hücre ölümü ile ilişkili genlerin ifadeleri

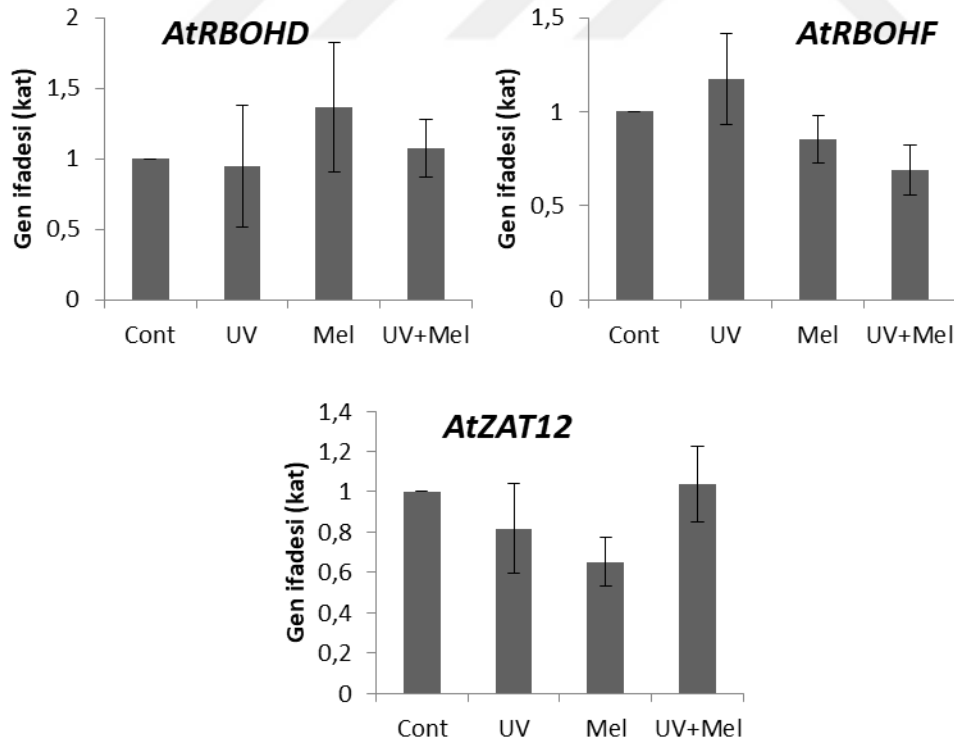
AtBI gen ifadesi anlamlı bir değişikliğe uğramamıştır. *AtNAC089* gen ifadesi UV uygulaması ile yarı yarıya düşmüştür.



Şekil 3.12 Programlanmış hücre ölümü ilişkili genlerin ifadeleri.

3.3.4. ROS sinyalleme ile ilişkili bazı genlerin ifadeleri

AtRBOHD, *AtRBOHF* ve *AtZAT12* genlerinin ifadeleri anlamlı bir değişikliğe uğramamıştır.



Şekil 3.13 ROS sinyalleme ile ilişkili genlerin ifadeleri.

4. TARTIŞMA

Ultraviyole absorbalayan protein, lipid nükleik asit ve bitkisel hormonları gibi bileşenlerle etkileşimi sebebiyle UV-B diğer abiyotik stresler gibi önemli çevresel bir faktördür (Tevini, 2004). UV-B, DNA molekülündeki nükleik asitlerin yapılarını inhibe eder (Bieza ve Lois 2001). Aminoasitleri hedef aldığı için enzim ve proteinlerin yapısını da bozar. Ayrıca lipid peroksidasyonu ile membranların da yapısını bozar (Hightower vd. 1994). Membranların yapısı bozulur ise taşınım engellenir ve bitki hormon yapıları da çalışamaz hale gelir (Ros ve Tevini 1995). Ultraviyole absorblayan bileşenlerin akımsal aktivitelerinden dolayı fotosentez olumsuz etkilenir (Allen vd. 1998) ve bu olayların sonucunda büyüme ve gelişme negatif biçimde etkilenir. (Qaderi ve Reid 2005).

Bu karşılık olarak korucu bileşenler tamir mekanizmalarını harekete geçirerek hücrel UV-B etkisini en aza indirmek için çalışırlar. Melatonin de uzun yıllardan beri düzenleyici olarak bilinen en iyi antioksidan bileşenlerdendir. Örneğin; Akdeniz' in yüksek bölgelerinde yüksek UV şiddeti altındaki bitkilerin melatonin içeriği daha düşük rakımdaki bitkilere oranla melatonin içeriğinin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (Tettamanti ve ark.; 2012).

Abiyotik stres koşullarında yaşayan bitkilerde normal koşullarda yaşayan bitkilere oranla içsel melatonin oranı daha yüksektir. Ancak yeterli içsel melatonin üretemeyen bitkilere ise dışarıdan melatonin verilme fikri atılmıştır. Örneğin; tuz stresine maruz bırakılan *Malus hupehensis* bitkisine dışarıdan 0,1 μ M melatonin verilmiş ve bitkideki POX antioksidan enzim aktivitesinin arttığını ve bu etki sonucunda hücre zarındaki hasarın azaldığı ve bu nedenle tuza karşı toleransın arttığı belirtilmiştir (Li ve ark., 2012).

Başka bir abiyotik stres olan yüksek sıcaklık stresi altında büyütülen hıyar bitkilerinde dışarıdan melatonin uygulamaları sonucunda serbest radikallerin miktarında düşüş yaşanması olup beraberinde doku elektrik iletkenliği de azaldığını ve buna karşın SOD, CAT, POX gibi enzimatik antioksidanların aktivitelerinde artış gözlemlenmiştir (Xu, 2010). Stres faktörlerinden kuraklığı

tuzululuk ve düşük sıcaklığa maruz bırakılan bermuda çimi (*Cynodon dactylon*) bitkisinde düşük miktarlarda ROS oluştuğu ve daha az hücre yıkımının gerçekleştiğini söyleyebiliriz. Ancak buna karşın bu bitkinin ağırlığında, nükleik asit, aminoasit ve şeker miktarlarının arttığı bilinmektedir (Shi ve ark., 2015).

Benzer başka bir örnekte bir hafta sıvı azot içerisinde bekletilen ve 0,1 μ M melatonin uygulanan *Rhodiola crenulata* bitkisinin kalluslarının (bitkinin yaralanan kısımlarından oluşan organize olmamış hücre topluluğu) canlı kalma ihtimallerinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu söylenmektedir (Zhao ve ark. 2011).

Başka bir çalışmada UV-B stresine maruz bırakılan *Vigna radiata*'nın (Maş fasulyesi) yapraklarındaki ölçümler sonucunda ROS türlerinin neden olduğu MDA miktarını azalttığı belirtilmiştir (Wang ve ark., 2009). Benzer bir çalışmada düşük sıcaklıkta çimlenen biber fidelerine 50 μ M melatonin uygulanmış ve bu bitkinin fidelerindeki MDA birikimi ciddi şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Posmyk ve ark., 2009).

Melatoninin hormon özelliğinin yanında ROS ve azot türlerini ortam uzaklaştırması nedeniyle kuvvetli bir antioksidan olduğu bilinmektedir (Reiter ve ark., 2001; Tan ve ark., 2007b). Bununla beraber melatonin enzim aktivitelerini abiyotik stres faktörleri durumunda düzenler (Arnao ve Hernandez-Ruiz, 2015; Reiter ve ark., (2015); Zang ve ark., (2015). Örnek verecek olursak kuraklık stresi altında domatesin köklerine 0,1 μ M melatonin uygulaması sonucunda CAT, SOD ve POX enzim aktiviteleri ve enzimatik olmayan askorbik asit seviyeleri artmıştır. Bunun nedeninin ise membranlardaki zararın indirgenmesi ve dolayısıyla kuraklığa karşı toleransın artması olarak tanımlamışlardır (Zhao ve ark., 2011).

SOD enzimi oksidatif stres süresi boyunca bitkilerin antioksidan savunma mekanizmasında rol oynayıp strese yanıt olarak bitkilerde de bu enzimin aktivitesinin arttırdığını belirtmektedir (Jacoby et al., 2011; Özgür et al., 2014; Yang and Guo, 2017). Örnek verecek olursak; *Arabidopsis*'te yapılan bir çalışmada da tuz stresinin ardından SOD aktivitesinin de arttığı gözlemlenmektedir (Özgür et al., 2014).

Bu çalışmamızda ise *Arabidopsis thaliana* model bitkimize dışarıdan 10 μM melatoninin uyguladık ve 1 gün beklelettikten sonra 90 dakika ve 180 dakikalıklık periyotlar halinde UV stresine maruz bıraktık ve etkilerini inceledik. Bu bağlamda;

H_2O_2 'nin önemli bir bölümünün süpürülmesinden POX kloroplastlar ve sitozolde sorumlu olmuştur. Bu bahsettiğimiz görevlerin dışında, büyüme, gelişme, lignifikasyon ve süberizasyon gibi süreçlerde de önemli bir yere sahiptir diyebiliriz (Asada and Takahasi, 1987). Enzimin aktivitesi ile ilgili olarak; çeltik bitkisinde tuz stresi altında olduğunda bu durumun arttığının gözlemlendiği bilinmektedir (Özfidan-Konakçı et al., 2014).

CAT enzimi de UV stresıyla beraber hücrede birikmeye başlayan H_2O_2 'nin peroksizomlarda süpürülmesinde önemli bir yeri vardır. Yapılan çalışmalarda her iki gruba da bakacak olursak; UV stresıyla birlikte CAT aktivitesinin kontrol gruplarına oranla daha fazla arttığı belirtilmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştıracak olursak, CAT aktivitesinin en yüksek düzeye 90 dakikalık UV stresi sonrasında ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu durum fotosentez hızının artmasıyla beraber, peroksizomda artan fotorespirasyonla da ilgili olabilir. Tüm bu durumlara karşın her iki ultraviyole + melatonin gruplarında da kaplardaki kontrol gruplarına oranla düşüş gözlemlenmiştir.

APX enzimini açıklayacak olursak; azaltıcı kuvvet olarak askorbik asitini kullanan ve H_2O_2 'nin H_2O 'ya indirgenmesini sağlayan bir enzimdir tanımını yapabiliriz. Askorbat-glutatyon döngüsü ise hücrede mitokondri, kloroplast ve peroksizom gibi organellerde ROS'ların süpürülmesinde fazlaca önemli yer eden bir yolaktır (Noctor and Foyer, 1999; Miller et al., 2010). Çeltik bitkisinde yapılan bir gözlemlerde, tuz stresıyla beraber kontrol bitkilerine göre APX aktivitesinde belirgin artışlar gözlemlenmiştir (Özfidan-Konakçı et al., 2014). Başka bir gözlemlerde ise, halofitik uzun yıllık bir bitki olan *Puccinellia tenuiflora* bitkisinin APX geni *Arabidopsis* bitkisinde fazla derecede ifade ettirildiğinde, bitkinin yüksek tuz oranlarına bile katlanabildiği açıkça ortaya konmuştur (Sofa et al., 2015). Bizim gözlemlerimizde ise, 90 dakikalık ve 180

dakikalık UV uygulamalarındaki APX miktarı kontrol gruplarına oranla ciddi artış görülmüştür.

TBARS içeriğini incelediğimizde ise, UV uygulanan gruptaki içerik artmıştır. Melatonin uygulanan grupları incelediğimizde ise kontrol gruplarına oranla benzer şekilde artış göstermiştir. Ancak 90 dakikalık UV+melatonin uygulamasında TBARS içeriği istatistiksel olarak anlamsız kalırken, 180 dakikalık UVM uygulamasında ise kontrol grubuna göre artış göstermektedir.



5. SONUÇ

Çalışmamızın sonuçlarını incelediğimizde dışarıdan uygulanan 10 µM melatoninin UV stresine maruz bıraktığımız Arabidopsis thailana bitkisinde strese karşı tolerans kazandığını ve daha az zarar gördüğünü söyleyebiliriz.

GR, POX ve CAT gibi enzim aktivitelerindeki artış ile birlikte ROS düzenlenmesi görülmektedir. UV' nin hücrede önemli bir ROS kaynağı olması nedeniyle, UV stresi altındaki Arabidopsis bitkisinin melatonin varlığında bitkiyi iyileştirici etkisini gösterdiğini söyleyebiliriz.

Bu mevcut veriler ve gözlemlere dayanarak;

- 1- Bir antioksidan olarak melatoninin ultraviyole ışınlarına karşı bitkilerin toleransını artırdığı;
- 2- Melatoninin UV stresi sırasında antioksidan savunma enzimlerinin etkinliğini düzenlediği,
- 3- Melatonin uygulamalarının oksidatif strese karşı fotosentetik mekanizmayı koruduğu bulunmuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Albert, K.R., Mikkelsen, T.N. and Ro-Poulsen, H.** (2008). Ambient UVB radiation decreases photosynthesis in high arctic *Vaccinium uliginosum*. *Physiologia Plantarum* 133, 199-210.
- Albert, K.R., Mikkelsen, T.N., Ro-Poulsen, H., Arndal, M.F. and Michelsen, A.** (2010). Ambient UVB radiation reduces PSII performance and net photosynthesis in high Arctic *Salix arctica*. *Environmental and Experimental Botany*, (in press), doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.07.001
- Albert, K.r., Mikkelsen, T.N., Ro-Poulsen, H., Michelsen,A., Arndal, M.F., Bredahl, L., Hakansson, K.B., Boesgaard, K. and Schmidt, N.M.** (2010b). Improved UVB screening capacity does not prevent negative effects of ambient UV irradiance on PSII performance in High Arctic plants. Results from six year UV exclusion study. *Journal of Plant Physiology* 167, 1542-1549.
- Allen, D.J. ve Ort, D.R.** (2001). Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm climate plants. *Trends Plant Sci.* 6, 36-42.
- Arnao, M.B.** 2014. Phyto-melatonin: Discovery, Content, and Role in Plants. *Advances in Botany*, e815769. doi:10.1155/2014/815769.
- Arnao, M.B., Hernandez-Ruiz, J.** 2015. *Functions of Melatonin in Plants: A*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Arnots, T. & Murphy, T.M.** (1991) A comparison of the effects of fungal elicitor and ultraviolet radiation on ion transport and hydrogen peroxide in rose cells. *Environmentaş and Experimental Botany*, p209-216.
- Asada, K. and Takahashi, M.**, 1987, Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, D.J. (Ed.), PHOTOINHIBITION, Elsevier, Amsterdam/North Holland , 227–287p.
- Bieza, K. and Lois, R.** (2001). An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiology* p126, 1105-1115.
- Cardinali DP, Pevet P** 1998. Basic Aspects of Melatonin to Counteract Action. *Sleep Medicine Reviews*, 2: 175-190.
- Catala A** 2007. The Ability of Melatonin to Counteract Lipid Peroxidation in Biological Membranes. *Current Molecular Medicine*, 7(7): 638-49.
- Choi, S.M., Jeong. S.W.,Jeong, W.J., Kwon, S.Y, Chow, W.S. ve Park, Y.** (2002) Chloroplast Cu/Zn-superoxide dismutase is a highly sensitive site in cucumber leaves chilled in the light. *Planta* p216,315-324.
- Çakırlar, H., Topçuoglu, S. F.** (1985) Stres Terminolojisi. *Çölleşen Dünya Örneği Sempozyum* 7, 13-17 Mayıs, Erzurum.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Çakırlar, H., Topçuoglu, S. F. (1990) Tuz Stresinde Büyüyen Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Gövdesinde Tuz Konsantrasyonuna ve Yasa Bağlı Olarak Absisik Asit (ABA) Miktarının Değişimi, Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi 10. *Ulusal Biyoloji Kongresi Botanik Bildirileri*, 18-20 Temmuz 1990, Erzurum.

Dubbels, R., Reiter, R.J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C. 1995. Melatonin in Edible Plants Identified by Radioimmunoassay and by High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Journal of Pineal Research*, 18: 28-31.

Greenberg, B.m., Wilson, M.I., Gerhardt, K.E. and Wilson, K.E. (1996). Morphological and physiological responses of *Brassica napus* to ultraviolet-B radiation: photomodification of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and potential acclimation processes. *Journal of Plant Physiology*. 148, 18-85.

Gürel, A., Avcıoğlu, R. (2001) Bitki Biyoteknolojisi-I, *Selçuk Üniversitesi Basımevi*, Konya, s288-326.

Hernandez-Nistal, J., Dopico, B. ve Labrador, E. (2002). Cold and salt stress regulates the expression and activity of a chickpea cytosolic Cu/z-Zn superoxide dismutase. *Plant Sci*. 163, 507-514.

Hightower, K.R., McCready, J.P. and Borchman, D. (1994). Membrane damage in UV-irradiated lenses. *Photochemistry*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jacoby, R.P., Millar, A.H. and Taylor, N.L.**, 2010, Wheat mitochondrial proteomes provide new links between antioxidant defense and plant salinity, *Journal of Proteome Research*, 9,6595–6604p.
- Kılınç, M., Kutbay, H. G.** (2004) Bitki Ekolojisi, *Palme Yayıncılık*, Ankara, s333-372.
- Kocaçalışkan, Kadioğlu, A.** (1990) Bitki Fizyolojisi Laboratuvar Kılavuzu, *Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayını*, s22-23
- Kocaçalışkan** (2002) Bitki Kùltürleri (Organ, Doku ve Hücre), *DPÜ Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü*, ISBN-975-8201-47-6, Kütahya, s37
- Kocaçalışkan** (2004) Bitki Fizyolojisi, *DPÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü*, Kütahya, s280-399.
- Larcher, W.** (1995) Physiological Plant Ecology, *Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*, Springer-Verlag, Berlin, 385s
- Lee, D.H. ve Lee, C.B.** (2000) Chilig stress induces changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* 159, 75-85.
- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y.** 1958. Isolation of Melatonin, a Pineal Factor That Lightness Melanocytes. *Journal of American Chemical Society*, 80: 2587-2591

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Li, C., Wang, P., Wei, Z., Liang, D., Liu, C., Yin, L., Jia, D., Fu, M., Ma, F. .2012. The Mitigation Effects of Exogenous Melatonin on Salinity-Induced Stress in *Malus hupehensis*. *Journal of Pineal Research*, 53: 298-306.

Lichtenthaler, H. K. (1996) Vegetation stres: An introduction to the stress concepts in plants, *J. Plant Physiology*, s148.

Leon, G., Holuigue, L. and Jordana, X., 2007, Mitochondrial complex II is essential for gametophyte development in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 143,1534-1546p.

Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A. and Robinson, J. P., 2003, Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptozis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production, *The Journal of Biological Chemistry*, 278,8516-8525p.

Orcutt, D.M., Nilsen, E.T. (2000) The Physiology of Plants Under Stress-Soil and Biotic Factors, Virginia Polytechnic Institute and State University, John Wiley & Sons, Inc., s4-15.

Özfidan-Konakçı, C., Yıldıztuğay, E. and Küçükoduk, M., 2014, Protective roles of exogenously applied gallic acid in *Oryza sativa* subjected to salt and osmotic stress: effects on the total antioxidant capacity, *Plant Growth and Regulation*, 75,219-234p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Özgür, R., Türkan, İ., Uzilday, B. and Sekmen, A.H.**, 2014, Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes redox state and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1377-1390p.
- Qaderi, M.M. and Reid, D.M.** (2005). Growth and physiological responses of canola (*Brassica napus*) to UV-B and CO₂ under controlled environmental conditions. *Physiologia Plantarum* 125, 247-259.
- Posmyk, M.M., Janas, K. M.** 2009. Melatonin In Plants. *Acta Physiologia Plantarum*, 31 : 1-11.
- Reiter, R.J.** 1991. Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Physiological Interactions. *Endocrine Reviews*, 12: 151-181.
- Reiter, R.J. , Tan, D.X., Burkhardt, S., Manchester, L.C.**, 2001. Melatonin in Plants. *Nutrition Reviews*, 59: 286-290.
- Saile-Mark, M. and Tevini, M.** (1997). Effects of solar UV-B radiation on growth, flowering and yield of central and southern European bush bean cultivars (*Phaseolus vulgaris L.*). *Plant Ecology* 128, 115-125.
- Seppanen, M.M. ve Faerstedt, K.** (2000) The role of superoxide dismutase activity in response to cold acclimation in potato. *Physiol. Plantarum* 108, 279-285.
- Shi, H., Jiang C., Ye, T., Tan, D.X., Reiter, R.J., Zhang, H., Liu, R., Chan, Z.** 2015. Comparative Physiological, Metabolomic, and Transcriptomic Analyses Reveal Mechanisms of Improved Abiotic Stress Resistance in Bermudagrass *Cynodon dactylon L.* Pers. by Exogenous Melatonin. *Journal of Experimental Botany*, 66: 681-694.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M. and Vitti, A., 2015 Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected drought and salinity stresses, *International Journal of Molecular Sciences*, 16,13561-13578p.

Teramura, A.H. and Sullivan, J.H. (1994). Effect of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynthesis Research* 39, 463-473.

Tevini, M., Braun, J. and Fieser, G. (1991). The protective function of epidermal layer of rice seedlings against ultraviolet-B radiation. *Photochemistry and Photobiology* 53, 329-333.

Tevini, M. (1994). UV-B effects on terrestrial plants and aquatic organisms. *Progress in Botany* 55, 174-190.

Tevini, M. (2004). Plant responses to ultraviolet radiation stress. In: Papageorgiou G, Govindjee (Eds) Chlorophyll a Fluorescence -a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration. *Springer, The Netherlands* 19, 605-621.

Xu, Y.N., Wang, Z.N. Jiang, G.X., Li, L.B. ve Kuang, T.Y. (2003). Effect of various temperatures on phosphatidylglycerol biosynthesis in thylakoid membranes. *Physiol. Plantarum* 118, 57-63.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Xu, X. D. 2010. effects of Exogenous Melatonin on Physiological Response of Cucumber Seedlings under High Temperature Stress. *Thesis of Master's Degree, Northwest A&F University, Yangling Shanxi, China.*

Zhao, Y., Qi L.W., Wang, W.M., Saxena, P.K., Liu, C.Z. 2011. Melatonin Improves the Survival of Cryopreserved Callus of *Rhodiola crenulata*. *Journal of Pineal Research*, 50: 83-8.



TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim boyunca ve tez sürecimde engin bilgisini, deneyimini ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail TÜRKAN' a, tez dönemimde bilgisi, laboratuvar deneyimini, ve paylaşımcı tavrıyla her daim desteğini hissettiğim arkadaşım Sayın Dr. Barış UZİLDAY ve eşi Araş. Gör. Dr. Rengin ÖZGÜR UZİLDAY'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ders aşaması dönemlerinde engin bilgilerinden yararlandığım hocalarım Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR, Sayın Prof. Dr. Melike BOR ve Sayın Doç. Dr. Hediye SEKMEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmam süresince beni yalnız bırakmayan ve her daim destek olan doktora öğrencisi arkadaşım Oğuzhan YILMAZ' a da canıgönülden teşekkür ederim.

Öğrenim yaşamım boyunca beni her yönden destekleyen, verdiğim tüm kararların arkasında olan babam Mehmet Ali HASKIRLI ve annem Selma HASKIRLI' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

Hasan HASKIRLI, 11.08.1984'de İzmir'de doğmuştur. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ekoloji Opsiyonundan 2008 yılında mezun olmuştur. 2015 yılında lisansüstü eğitimine, Prof. Dr. İsmail Türkan danışmanlığında, Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji A.B.D.'de başlamıştır.

