

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**JUGLON ALLELOKİMYASALININ SALATALIKTA POLİFENOL OKSİDAZ ENZİM
AKTİVİTELERİ VE GEN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

MERVE YALÇIN

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

**DANIŞMAN
PROF. DR. İSMAİL KOÇAÇALIŞKAN**

İSTANBUL, 2018

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**JUGLON ALLELOKİMYASALININ SALATALIKTA POLİFENOL OKSİDAZ ENZİM
AKTİVİTELERİ VE GEN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Merve YALÇIN tarafından hazırlanan tez çalışması 20.04.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof Dr. Gül Cevahir ÖZ

İstanbul Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Yıldız Teknik Üniversitesi



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

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tezi olarak sunulan bu çalışma, 2014-01-07-KAP01 no'lu Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi olarak desteklenmiş ve Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalındaki yüksek lisans eğitimim süresince bilgisi, deneyimi ve yardımlarıyla beni yönlendiren, zamanını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN'a;

Deneysel çalışmalarımın her aşamasında yardım eden Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi sayın Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT'a ve Yıldız Teknik Üniversitesi Biyokimya Bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU'na, çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yüksek lisans öğrencisi olan değerli arkadaşım Ezgi CİBALI'ye ve her aşamada yanımda olan kıymetli aile fertlerime, desteklerinden dolayı sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Şubat, 2018

Merve YALÇIN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	3
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Allelopati	4
2.1.1 Allelopatinin Tarihi	4
2.1.2 Allelopati üzerine yapılmış çalışmalar	5
2.2 Juglon	6
2.3 Polifenol Oksidaz Enzimi	7
2.4 Juglon'un Polifenol Oksidaz Enzim Akitivitesi ve Gen İfadeleri Üzerine Etkileri ..	10
2.4.1 Juglon'un Polifenol Oksidaz Enzim Akitivitesi Üzerine Etkisi.....	10
2.4.2 Juglon'un Polifenol Oksidaz Enziminin Gen İfadeleri Üzerine Etkileri.....	11

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD	14
3.1 Materyaller	14
3.1.1 Yararlanılan Alet ve Cihazlar	14
3.1.2 Kullanılan Kit, Kimyasallar ve Bitki Materyali	15
3.1.3 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	16
3.1.3.1 Enzim Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözeltiler	16
3.1.3.2 Juglon Çözeltisinin Hazırlanışı	16
3.1.3.3 5X MOPS Tamponunun Hazırlanışı	16
3.1.3.4 Yükleme Tamponunun Hazırlanışı	16
3.2 Metot	17
3.2.1 Tohumların Sterilizasyonu	17
3.2.2 Tohumlara Juglon Uygulanması	17
3.2.3 Çimlenen Tohumların Yaprak ve Köklerinin Ayrılması	17
3.2.4 Yaprak ve Köklerden Polifenol Oksidaz Enzim Ekstraksiyonu	18
3.2.5 Polifenol Oksidaz Enzim Aktivitesinin Tayini	18
3.2.5.1 Katekol Oksidaz Aktivitesi:	18
3.2.5.2 Dopa Oksidaz Aktivitesi:	18
3.2.6 RNA İzolasyonu	18
3.2.7 RNA'nın DNA Kalıntılarından Temizlenmesi	19
3.2.8 RNA Elektroforez Jeli	20
3.2.9 Primer Tasarlama	20
3.2.10 Komplementer DNA sentezi (cDNA)	23
3.2.11 Gerçek Zamanlı PCR	24
3.2.12 DNA Elektroforez Jeli	25
3.2.13. İstatistik Analiz	25

BÖLÜM 4

SONUÇLAR VE TARTIŞMA	26
4.1 Sonuçlar	26
4.1.1 Juglonun Salatalıkta Tohum Çimlenmesi ile Kök ve Gövde Büyümesi Üzerine Etkileri	26

4.1.2 Juglonun Saltalıkta Polifenol Oksidaz Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri	28
4.1.3 Juglonun Salatalıkta Polifenol Oksidaz Gen İfadeleri Üzerine Etkileri	29
4.2. Tartışma	36
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	42



SİMGE LİSTESİ

$C_{10}H_6O_3$	5-Hidroksi 1,4-Naftakinon
$^{\circ}C$	Santigrad derece
μ	Mikro

KISALTMA LİSTESİ

cDNA	Komlementer DNA
DEPC	Di Etil Piro Karbonat
GstI	Glutatyon Transferaz geni
HCl	Hidroklorik Asit
IAS	Uluslararası Allelopati Topluluğu
mM	Milimolar
mL	Mililitre
PFO	Polifenol Oksidaz Enzimi
rpm	Devir/dakika
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1 Juglonun Kimyasal Yapısı.....	7
Şekil 2. 2 Enzimatik Esmerleşme Mekanizması.....	8
Şekil 2. 3 Pirinç köklerinde juglon uygulamasıyla birlikte transkripsiyon faktör ailelerinin değişen ekspresyon seviyeleri.....	12
Şekil 2. 4 Juglon uygulamasından etkilenen mısır fidelerinin koleoptillerinde Gstl geninin nispi gen ekspresyon ifadeleri.....	13
Şekil 2. 5 Juglon uygulamasından etkilenen mısır fidelerinin birincil köklerinde Gstl geninin nispi gen ekspresyon ifadeleri.....	13
Şekil 4. 6 Kontrol (Saf Su) ve 0,01, 0,1, 0,25 ve 0,5 mM Juglon uygulanmış olan tohumların karanlıkta ve 25°C de 10 gün süreyle çimlenmesinin ardından elde edilen sonuçlar.....	27
Şekil 4. 7 Juglonun katekol okside eden PFO aktiviteleri üzerine etkisi.....	28
Şekil 4. 8 Juglonun dopa okside eden PFO aktiviteleri üzerine etkisi.....	29
Şekil 4. 9 Real-time PCR sonrası Polifenol Oksidaz enziminin jel görüntüsü.....	30
Şekil 4. 10 PFO'nun Yaprakta Nisbi Gen İfadeleri.....	32
Şekil 4. 11 PFO'nun Kökte Nisbi Gen İfadeleri.....	35

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	Juglonun sağlam ve kabuğu çıkarılmış hıyar tohumlarında kök, filiz büyümesi ile kotiledonların protein miktarı ve PFO aktiviteleri üzerine etkileri.....11
Çizelge 3. 2	Yükleme için RNA örneklerinin hazırlanması.....20
Çizelge 3. 3	Salatalıkta (<i>Cucumis sativus</i>) Polifenol Oksidaz ve Aktin Genlerine ait Fasta Formatında Sekans Bilgileri.....22
Çizelge 3. 4	Aktin ve Polifenol oksidaz genine ait ileri ve geri primerler.....23
Çizelge 3. 5	cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve hacimleri.....23
Çizelge 3. 6	cDNA reaksiyonunun gerçekleşmesi için Bio-Rad Termal Cyclus cihazında belirlenen sıcaklık değerleri ve bunlara karşılık gelen süreler.....24
Çizelge 3. 7	PCR Reaksiyonları için gerekli hacmi içeren bileşenler.....24
Çizelge 3. 8	Q-PCR Reaksiyonları için gerekli olan sıcaklık değerleri ve süreler.....25
Çizelge 4. 9	Juglon'un kök, gövde uzunluğu ve çimlenme yüzdesine etkileri.....27
Çizelge 4. 10	Yaprakta, kontrol grubu ve Juglon uygulanmış örneklerde Aktin geni için C _T değerleri.....30
Çizelge 4. 11	Yaprakta, kontrol grubu ve Juglon uygulanmış örneklerde PFO geni için C _T değerleri.....30
Çizelge 4. 12	Kökte, kontrol grubu ve Juglon uygulanmış örneklerde Aktin geni için C _T değerleri.....33
Çizelge 4. 13	Kökte, kontrol grubu ve Juglon uygulanmış örneklerde PFO geni için C _T değerleri.....33
Çizelge 4. 14	Juglonun etkileri bakımından salatalıkta büyüme parametreleri, PFO aktiviteleri ve gen ifadeleri arasındaki korelasyonlar.....36

JUGLON ALLELOKİMYASALININ SALATALIKTA POLİFENOL OKSİDAZ ENZİM AKTİVİTELERİ VE GEN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Merve YALÇIN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

Allelopati, bir bitkinin ürettiği özgün bir maddeyle, başka bir bitkiyi etkilemesi şeklinde görülen bitkiler arasındaki doğal etkileşimleri ifade eder. Ceviz (Juglandaceae) ailesinin birçok üyesi juglon (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) denilen bir allelokimyasal üretir. Juglon bu bitkilerin birçok kısmında doğal olarak oluşur. Az sayıda bitki türü juglona toleranslı olup ceviz ağaçlarının yakınında büyüyebilse de bazı duyarlı bitkiler ceviz ağaçlarından olumsuz yönde etkilenebilmektedirler. Juglon'un hıyar (*Cucumis sativus L.*) bitkisinin yaprak ve kök dokusunda polifenol oksidaz enzimin aktivite üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca juglonun bu enzimleri kodlayan genlerin ifadeleri üzerindeki etkisine bakılmıştır. Hıyar tohumları 0.01 mM, 0.1mM, 0.25mM ve 0,5mM juglon içeren veya kontrol (saf su) ortamında çimlendirilmiştir. Çimlenen tohumlardan çıkan fidelerin kök ve gövde kısımları ayrılarak bunlardan total protein ve total RNA izolasyonları yapılmıştır. Enzim aktivite analizleri ilgili enzimin spesifik substratı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gen ifadelerindeki değişimlerin analizi için Gerçek Zamanlı PCR kullanılmıştır. Juglon salatalık tohumlarının çimlenmesini fazla etkilemezken, fidelerin kök ve gövde büyümesini engellemiştir. Polifenol oksidaz enzim aktivitesi ve gen anlatımı salatalık fidelerinde juglon tarafından artırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Juglon, Salatalık, Çimlenme, Polifenol Oksidaz, Fide Büyümesi



**ACTIVITY AND GENE EXPRESSION ANALYSIS OF POLYPHENOL OXIDASE
ENZYME IN JUGLONE APPLIED CUCUMBER SEEDLINGS**

Merve YALÇIN

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

Allelopathy refers to the natural interactions between plants that a plant appear to affect another plant by producing a specific chemical. Many members of the walnut (*Juglandaceae*) family produce an allelochemical called juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone). Juglone occurs naturally in many parts of these plants. Although few plant species are tolerant to juglone and can grow near walnut trees, some susceptible plants may be affected negatively from walnut trees. The effects of juglone on the activities of oxidant enzyme polyphenol oxidase have been examined in leaves and root of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Furthermore, the effect of the juglone on the expression of the genes encoding these enzymes has been examined. The cucumber seeds were germinated in the control (distilled water) medium and juglone solutions containing 0.01 mM, 0.1 mM, 0.25 mM and 0.5 mM juglone respectively. Root and stem parts of seedlings emerging from germinated seeds were separated and total protein and total RNA isolations were made. Enzyme activity assays were performed using the specific substrate of the enzyme of interest. Real-time PCR was used to analyze changes in gene expression. Juglone has inhibited growth of cucumber root and shoot without affecting germination. Enzyme activities and gene expression of Polyphenol oxidase were increased by juglone.

Key Words: Juglone, Cucumber, Seedling Growth, Germination, Polyphenol oxidase



1.1 Literatür Özeti

Allelopati bir bitkinin ürettiği biyokimyasal maddenin başka bir bitki ya da organizma üzerindeki pozitif veya negatif etkileri olarak tanımlanır ve bu madde ile canlının çimlenmesi, büyümesi, hayatta kalması ve/veya üremesi etkilenebilir. Bitkinin ürettiği bu biyokimyasallar genel anlamıyla “allelkimyasal” olarak ifade edilir. Allelokimyasallar bir organizma üzerinde dahi bazı yönlerden olumlu etki gösterirken bazı yönlerden olumsuz etki gösterebilir. Örneğin; bir bitki ürettiği allelokimyasallar ile diğer bitkilerin büyüme ve gelişimini azaltabilir, fakat aynı bitkinin mineral, su ve ışığa ulaşımını arttırabilir [1].

Sekonder metabolitler metabolizmada ihtiyaç duyulmayan yan ürünler olarak tanımlanır. Sekonder metabolitler allelokimyasalları da ihtiva ederler. Bu sebeple, her allelokimyasal bir sekonder metabolit olarak ifade edilirken, her sekonder metabolit bir allelokimyasal değildir [2].

Biyotik ve abiyotik faktörler allelokimyasalların üretimini etkileyebilir. Biyotik faktörlere örnek olarak mevcut besin maddeleri; abiyotik faktörlere de örnek olarak sıcaklık ve pH verilebilir. Basit fenilpropanoitler ve benzoik asit türevlerinin allelopatik etki gösterdiği bilinmektedir. Kafeik ve ferulik asitler gibi bileşiklerin laboratuvar yapılan deney sonucunda birçok bitkinin büyüme ve çimlenmesini engellediği gözlemlenmiştir [3].

Allelopatinin bazı alg, mercan, bakteri, mantar ve bitkiler için karakteristik olduğu bilinmekle birlikte bitkilerde gözlenen allelopatik etkilerin tür dağılımı ve birey sayısında üzerinde etkiler gösterdiği düşünülmektedir. Özellikle de invazif, aşırı yayılan bitkilerin bu özelliği kazanmasında allelokimyasalların rolü olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlara

kıyasla, allelopatinin doğal ekosistemlerdeki önemi halen tam anlaşılammıştır. Çoğu bilim insanı allelopatinin bitkiler arasındaki ilişkilerde önemli bir unsur olduğuna şüphe ile yaklaşmaktadır. Çünkü bu yaklaşımı destekleyen kanıtlara erişmek kolay değildir. Laboratuvar koşullarında, bir bitkiden elde edilen allelokimyasalların diğer bitkilerin büyümesini ve gelişimini engelleyebileceğini veya olumlu etki göstererek arttırabileceğini göstermek kolaydır. Fakat asıl problem, bitkilerin bu etkiyi doğada sergilediğini tespit etmektir. Bu olguyu destekleyecek yeterli kanıtlar olmamasına karşılık, allelopatinin zirai alanda uygulanabilirlik potansiyeli araştırmacıları bu konuyu çalışmaya itmektedir. Genetik mühendisliği çalışmaları ile yabancı otlara karşı allelopatik özelliğe sahip bitkilerin geliştirilmesi bu bağlamda mümkün hale gelebilecek olduğundan allelopati konusu gelecek için önem arz etmektedir [4].

1.2 Tezin Amacı

Allelopati hakkındaki genel bilgilerde açıklandığı üzere juglon gibi allelokimyasallar diğer bitkilerin çimlenmesi, solunumu, verimi ve enzimlerinin aktivasyonunda olumlu ya da olumsuz etkilere sahiptir. Bu etkiler hakkında moleküler düzeyde yapılan çalışmaların yeterli olmadığı tespit edilmiştir.

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

Tezin amacı, juglon allelokimyasalının salatalıkta polifenol oksidaz enzim aktiviteleri ve bu enzimi kodlayan genlerin anlatımları üzerindeki etkilerinin incelenmesidir. Juglonun salatalıktaki etkileri üzerine çalışmalar yapılmış olsa da polifenol oksidaz enziminin gen ifadeleri üzerine juglonun etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu durum temel alınarak bu tez çalışmasında juglon allelokimyasalının salatalık bitkisi üzerinde polifenol oksidaz enziminin gen anlatımı seviyesindeki etkilerini ortaya çıkarmak buradaki bilinmeyenlere ışık tutmak amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

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



2.1 Allelopati

2.1.1 Allelopatinin Tarihi

Allelopati terimi Latince allelo- ve pati- kelimelerinin birleşiminden meydana gelir ve kelime manası “karşılıklı, birbirine zarar” ya da “acı çekme” olarak karşımıza çıkar. Bu terim ilk kez 1937 yılında Avusturyalı profesör Hans Molisch'in “*Der Einfluss einer Pflanze auf die andere – Allelopathie*” (Bitkilerin birbirlerine etkileri) adlı kitabında bir bitki tarafından üretilen maddenin farklı komşu bitkilerin büyümesini engelleyen biyokimyasal etkileşimleri tanımlamak için kullanılmıştır [8].

1971’de ise allelokimyasallar, Whittaker ve Feeny tarafından organizmalar arasındaki tüm kimyasal etkileşimler olarak tanımlandı ve bu tanımları içeren araştırmalarını Science dergisinde yayınladılar. 1984’te ise bu tanım Elroy Leon Rice tarafından genişletilerek allelopati tanımı; bir bitki tarafından üretilen biyokimyasal maddelerin sadece bitkileri değil aynı zamanda mikroorganizmaları da olumlu veya olumsuz etkilediği ifade edilmiştir [9].

Allelopati tanımını sonraki yıllarda bilim insanları daha da genişletilerek organizmaların birbirleriyle olan kimyasal etkileşimlerini tanımlamak için kullandı. 1996’da Uluslararası Allelopati Topluluğu (IAS) ise allelopatiyi; sekonder metabolitleri de içeren biyokimyasal maddelerin bitkiler, algler, bakteri ve mantarlar tarafından üretilebileceği ve üretilen bu maddelerin tarım ve biyolojik sistemlerde özellikle organizmaların büyüme ve gelişimleri üzerinde etki oluşturabileceği ifade edilmiştir. Zoologlar ise allelopati terimini mercanlar

ve süngerler gibi omurgasızlar arasındaki kimyasal etkileşimleri tanımlamak için kullandılar [9].

Allelopati terimi kullanılmadan çok önceleri de insanlar bitkilerin birbirleri üzerinde olumsuz etkiler oluşturabildiğini gözlemlemiştir. M.Ö. 300 yıllarında yaşayan Theophrastus domuz yeminin yonca bitkisi üzerinde negatif etkileri olduğunu gözlemlemiştir. M.S. 1. Yüzyılda Çin’de Shennong Ben Cao Jing’in yazarı, allelopatik etkiler gösterenleri de içine alacak şekilde böcek öldürme yeteneğine sahip olan bitkileri tanımladı ve bunların 267 tane olduğunu ifade etmiştir [9].

Allelopatiyle ilgili yapılan ilk deneysel çalışma 1928’de Amerika’da doğal olarak yayılım gösteren kara ceviz ağaçlarıyla yapılmıştır. Bu çalışmada yağmur sonrasında kara ceviz ağacının dibindeki yonca otlarının kısa süre içinde öldükleri tespit edilmiş, yapraklarından damlayan suyun ise toplanarak domates fidelerine uygulanmasıyla tüm domates fidelerinin öldüğü rapor edilmiştir. Daha sonra ceviz bitkisinin ürettiği bu madde kök ve yaprak özütlerinden izole edilmiş ve bu maddenin 5-Hidroksi-Naftakinon olduğu tespit edilmiş ve cevizin Latince isminden yola çıkılarak “Juglon” adı verilmiştir [9].

2.1.2 Allelopati üzerine yapılmış çalışmalar

Allelopati bir bitkinin ürettiği biyokimyasal maddenin başka bir bitki ya da organizma üzerindeki pozitif veya negatif etkileri olarak tanımlanır ve bu madde ile canlının çimlenmesi, büyümesi, hayatta kalması ve/veya üremesi etkilenebilir. Bitkinin ürettiği bu biyokimyasallar genel anlamıyla “allelkimyasal” olarak ifade edilir. Allelokimyasallar bir organizma üzerinde dahi bazı yönlerden olumlu etki gösterirken bazı yönlerden olumsuz etki gösterebilir. Örneğin; bir bitki ürettiği allelokimyasallar ile diğer bitkilerin büyüme ve gelişimini azaltabilir, fakat aynı bitkinin mineral, su ve ışığa ulaşımını arttırabilir [10].

Sekonder metabolitler metabolizmada ihtiyaç duyulmayan yan ürünler olarak tanımlanır. Sekonder metabolitler allelokimyasalları da ihtiva ederler. Bu sebeple, her allelokimyasal bir sekonder metabolit olarak ifade edilirken, her sekonder metabolit bir allelokimyasal değildir [11].

Biyotik ve abiyotik faktörler allelokimyasalların üretimini etkileyebilir. Biyotik faktörlere

örnek olarak mevcut besin maddeleri; abiyotik faktörlere de örnek olarak sıcaklık ve pH verilebilir. Basit fenilpropanoitler ve benzoik asit türevlerinin allelopatik etki gösterdiği bilinmektedir. Kafeik ve ferulik asitler gibi bileşiklerin laboratuvar yapılan deney sonucunda birçok bitkinin büyüme ve çimlenmesini engellediği gözlemlenmiştir [3].

Allelopatinin bazı alg, mercan, bakteri, mantar ve bitkiler için karakteristik olduğu bilinmekle birlikte bitkilerde gözlenen allelopatik etkilerin tür dağılımı ve birey sayısında üzerinde etkiler gösterdiği düşünülmektedir. Özellikle de invazif, aşırı yayılan bitkilerin bu özelliği kazanmasında allelokimyasalların rolü olduğu düşünülmektedir.

Bu sonuçlara kıyasla, allelopatinin doğal ekosistemlerdeki önemi halen tam anlaşılammıştır. Çoğu bilim insanı allelopatinin bitkiler arasındaki ilişkilerde önemli bir unsur olduğuna şüphe ile yaklaşmaktadır. Çünkü bu yaklaşımı destekleyen kanıtlara erişmek kolay değildir. Laboratuvar koşullarında, bir bitkiden elde edilen allelokimyasalların diğer bitkilerin büyümesini ve gelişimini engelleyebileceğini veya olumlu etki göstererek arttırabileceğini göstermek kolaydır. Fakat asıl problem, bitkilerin bu etkiyi doğada sergilediğini tespit etmektir.

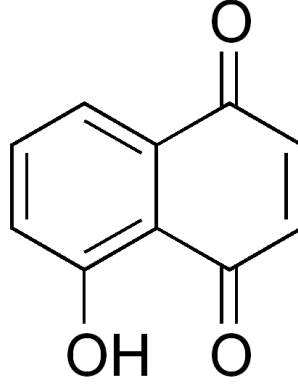
Bu olguyu destekleyecek yeterli kanıtlar olmamasına karşılık, allelopatinin zirai alanda uygulanabilirlik potansiyeli araştırmacıları bu konuyu çalışmaya itmektedir. Genetik mühendisliği çalışmaları ile yabancı otlara karşı allelopatik özelliğe sahip bitkilerin geliştirilmesi bu bağlamda mümkün hale gelebilecek olduğundan allelopati konusu gelecek için önem arz etmektedir [10].

2.2 Juglon

Juglon: *Juglans regia*, *Juglans cinerea* ve *Juglans nigra* türlerinde bulunan allelokimyasal bir moleküldür. Bu türlerin kök, gövde, sekonder ksilem ve yapraklarında bulunur. Juglona verilen tepkiler bitkiler arasında farklılık göstermektedir. Juglon allelokimyasalı, domates, yonca, elma, tere, kızıl çam bitkileri üzerinde olumsuz etki gösterirken; kavun, düğün çiçeği, zambak, üzüm, meşe gibi bitkiler üzerinde ise olumlu etkileri tespit edilmiştir [12],[13],[14].

Juglon sadece allelokimyasal özellik değil aynı zamanda bazı böceklere karşı da toksik etki gösterir [15]. Juglon bitkilerin köklerinde sentezlenir ve ksilem aracılığıyla yapraklara

taşınır. Bitkide oksitlenmeden önce hidrojuglon olarak bulunurken oksitlendikten sonra juglona (5-Hidroksi-1,4- Naftakinon) dönüşür [16].



Şekil 2. 1 Juglon'un kimyasal yapısı

Bunlara ek olarak, juglon doğal bir boya olarak yün ve kumaşların boyanmasında kullanılmıştır. Kozmetik sektöründe ise kahverengi ve koyu turuncu rengini oluşturması sebebiyle saç boyamasında renklendirme maddesi olarak kullanılmaktadır.

Juglonun son yıllarda kullanıldığı bir diğer alan ise antikanser çalışmalarıdır [17]. Juglon, semiquinon radikalini oluşturması ve bu radikalın de apoptozu tetikleyen süperoksit anyonlarına dönüşebilmesi sebebiyle antikanser çalışmalarında kullanılması mümkündür [18]. Juglonun semiquinon'a dönüşmesi hücrede sitozol ve mitokondride gerçekleşmektedir [19].

2.3 Polifenol Oksidaz Enzimi

Polifenol Oksidaz Enzimleri (PFO) meyve ve sebzelerin hasat, depolama ve işleme kalitesi ve ekonomisi üzerinde rol oynayan önemli enzimlerdir. Hasat, depolama ve işleme sırasındaki zedelenme, kesilme ve diğer mekanik zararların meyve ve sebzelerde oksijen geçişine sebep olur. Bu durum ise melanin oluşumuna sebebiyet vererek esmerleşme reaksiyonlarına neden olur. Esmerleşme reaksiyonları sebebiyle meyve ve sebzelerin özellikle kalitesi ve ekonomisi üzerinde önemli kayıplar görülmektedir. Birçok meyve veya sebze istenmeyen esmerleşme reaksiyonları görülmektedir bunlar; muz, şeftali, kayısı, elma, üzüm, çilek ve bazı tropik meyveler ve suları, ayrıca, patates, marul ve diğer yapraklı sebzeler olarak karşımıza çıkmaktadır. İstenen esmerleşme reaksiyonlarının görüldüğü bitkiler de vardır, bunlar ise çay, kahve, kakao, siyah üzüm ve

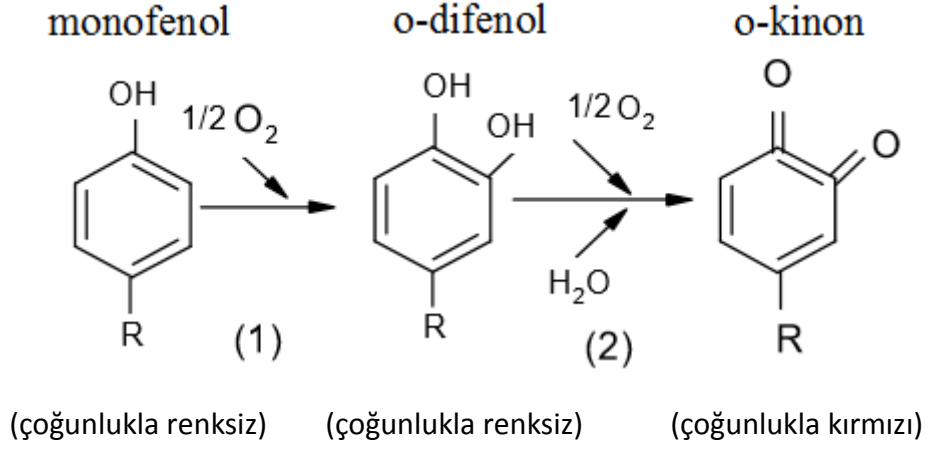
siyah incir olarak karşımıza çıkar. Çünkü PFO enzimi vasıtasıyla bu ürünler beklenen son ürün karakteristiklerine ulaşırlar [20].

Yenilebilir bitkilerdeki PFO'nun varlığı ve miktarı ile ilgili araştırmalar, birçok araştırmacı tarafından yapılmış olup PFO aktivitesine sahip birçok gıda ürününün olduğu tespit edilmiştir. Bunlar; buğday unu, makarna, enginar, biber, Trabzon hurması, baklagil, kakao çekirdeği, soya, hıyar, yabani pirinç, çilek, mantar, karidesler, istakoz, yengeçtir. Bitkilerdeki PFO miktarı birçok faktör tarafından etkilenmektedir; bitkinin çeşidi, geçirdiği kültürel işlemler, bitkinin olgunluk ve yaşı bu faktörler arasındadır. Örneğin, şekerpancarında, PFO kloroplastta ve çeşitli dokusal yapılarda bulunur. Bu yapılarda PFO, aromatik olmayan aminoasitlere peptid bağlarıyla bağlıdır. Ancak dokunun parçalanması ile PFO'nun serbest kalması mümkündür. Yapılan çalışmalarda en yüksek PFO aktivitesi üzüm kabuklarında, bazı elma kültürlerinde, hıyarda ve diğer bazı meyvelerde görülmüş olmakla birlikte mantarın sap ve epidermis kısımlarında da yüksek enzim aktivitesi gözlenmiştir. Istakozda ise PFO aktivitesi en fazla epidermis veya kütikül tabakasındadır [20].

PFO, Uluslararası Biyokimya Birliğinin sınıflandırmasında monofenol monooksijenaz (EC 1.14.18.1) ve kateşol oksidaz (EC 1.10.3.1) olarak yer almıştır. Monofenol oksidaza tirozinaz, fenolaz, monofenol oksidaz ve kresolaz gibi geleneksel isimler verilmiştir. Kateşol oksidaz ise difenol oksidaz, o-difenolaz, fenolaz ve polifenol oksidaz olarak adlandırılmıştır. PFO pek çok reaksiyon katalizleyebilir. Bir monofenol olan p-kresolü, difenol 4-metil kateşol okside ederlerken, bir o-difenol olan kateşolü ise o-benzokinone parçalarlar [20].

Bakır içeren bir enzim olan PFO iki farklı reaksiyon katalizler:

- i) monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu
- ii) o-difenollerin o-kinonlara dehidrojenasyonu monofenol



Şekil 2. 2 Enzimatik Esmerleşme Mekanizması

Bu aktivitelerden ilki monofenolaz (hidroksilaz veya kresolaz) ve ikincisi ise difenolaz (kateşolaz veya oksidaz) aktivitesi olarak adlandırıldığı bu iki reaksiyonda yardımcı substrat oksijendir. Enzimatik olmayan reaksiyonlar aracılığıyla o-kinonlar kahverengi-siyah renkteki melanin pigmentlerine dönüşür. Bitki ve funguslardan elde edilen PFO'lar monofenollerle birlikte (p-kresol, tirozin gibi) difenolleri de (kateşol ve o-dihidroksifenilalanin gibi) oksitleyebilirler. Ancak, meyve ve sebzelerde PFO'nun substrat spesifikliğı elde edildiğı organizmaya göre farklılık gösterdiğinden, PFO tarafından fenolik bileşiklerin hepsi değıil sadece bir kısmını substrat olarak kullanılabilir [20].

PFO, bitki ve hayvan dokularında farklı kısımlarda yaygın olarak görülebilir. Bitkilerde tüm kısımlarda yaygın olarak görülürken gelişmiş hayvanlarda gözlendiğı kısımlar daha çok deri, saç, tüy ve göz olarak karşımıza çıkar. Bitkisel dokularda öncelikle latent (inaktif) durumda sentezlenmektedir. Zamanla bir takım etkenlerden dolayı aktif hale gelebilmektedirler. Bu etkenlere örnek olarak dokuda doğal olarak bulunan proteazlar veya etilen gibi solunum metabolitleri verilebilir [20].

Sağlıklı meyve ve sebze dokularında enzim ve substratlarının hücrenin farklı kısımlarında bulunmasından dolayı, PFO enzimlerinin, substratları olan fenolik bileşiklerle teması yok denecek kadar azdır. Nitekim PFO enzimleri, sitoplazmada serbest halde, hücrenin tilakoid ve kloroplastlarında ve membrana bağılı olarak bulunmakta iken fenolik bileşiklerin tamamına yakını vakuollerde bulunmaktadır. Fakat gerek hücredeki pektinazların faaliyetiyle gerek hasat, taşıma ve işleme sırasındaki etkiler sebebiyle hücre ve buna bağılı olarak doku bütünlüğü bozulmaktadır. Bu sebeple, PFO enzimlerinin kendi substratlarıyla ve oksijen ile bir araya gelmesi mümkün olmaktadır [20].

Isıl işlem uygulaması özellikle meyve sularında PFO enzim aktivitesinin inaktive edilmesi için yapılan bir uygulamadır. askorbik asit, tiyol bileşikleri ve sülfidler gibi bazı bileşikler zarar görmüş meyve ve sebzelerde esmerleşme reaksiyonlarını önlemek için kullanılabilir. Oksijenin uzaklaştırılması, asitlendirme, siklodekstrin ve polivinilpirolidon gibi kompleks oluşturucu maddelerle fenollerin uzaklaştırılması ile de PFO aktivitesinin önüne geçilmesi mümkündür. Meyve ve sebzelerin dış yüzeylerinin örten kabuk sağlam olduğu sürece oksijenin hücre ile etkileşmesi mümkün olmayacağı için esmerleşme reaksiyonunun da önüne geçilmiş olacaktır. Gıdanın işlenmesi ve paketlenmesi sürecinde kaplama ve filmlerin kullanılması da oksijen geçişine izin vermeyeceğinden esmerleşme reaksiyonu engellenmiş olacaktır. PFO enzimlerinin neden olduğu esmerleşmeler bitkinin fiziksel özelliklerinin yanında duyuşal özelliklerini de etkilemektedir. PFO enziminin nitelikleri, meyve ve sebzelerin yetiştirme koşulları ve olgunluk aşaması gibi durumlara göre farklılık göstermektedir [20].

2.4 Juglon'un Polifenol Oksidaz Enzim Aktivitesi ve Gen İfadeleri Üzerine Etkileri

2.4.1 Juglon'un Polifenol Oksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Tohum kabuğunun, sağlam ve kabuğu çıkarılmış hıyar tohumlarında juglonun tohum içine girmesini sınırlamak için bir bariyer olup olmadığını test etmek için yapılan çalışmada, hıyar fidelerin uzunluğunun, taze ve kuru ağırlığının ve bununla birlikte hıyar fidelerinin kotiledonlarındaki protein miktarının juglon uygulaması sonucu azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte, bu çalışmada, her iki fidede polifenol oksidaz enziminin katekol ve dopa oksitleyici aktiviteleri juglon ile arttırılmıştır. Bu enzimin aktivitesindeki artış, juglon tarafından üretilen allelokimyasal strese karşı bir reaksiyona atfedildi. Juglon, kök ve filizlerin taze ve kuru ağırlıklarını, kontrole göre kotiledonların azalan protein içeriğiyle azaltır [21].

Polifenol oksidaz aktiviteleri protein içeriği ve fide gelişiminin aksine juglon ile arttırılmıştır (Çizelge 2. 1). Polifenol oksidaz esas olarak difenolik substratları oksitlemektedir. Enzimlerin ana substratları bitkilerde katekol ve dopa ve bu substratları oksitleyen enzime sırasıyla katekolaz ve dopa oksidaz denir. Polifenol oksidaz aktivitesinin, hıyarda juglon uygulamasının bir sonucu olarak arttığı gösterilmiştir. Bu aktivite artışı juglonun allelokimyasal stresinin ürettiği oksidatif savunma

mekanizmasının bir sonucu olabilir. Böylece, juglonun çimlenme sırasında oksidatif stres oluşturduğu bulundu [21].

Çizelge 2. 1 Juglonun sağlam ve kabuğu çıkarılmış hıyar tohumlarında kök, filiz büyümesi ile kotiledonların protein miktarı ve PFO aktiviteleri üzerine etkileri

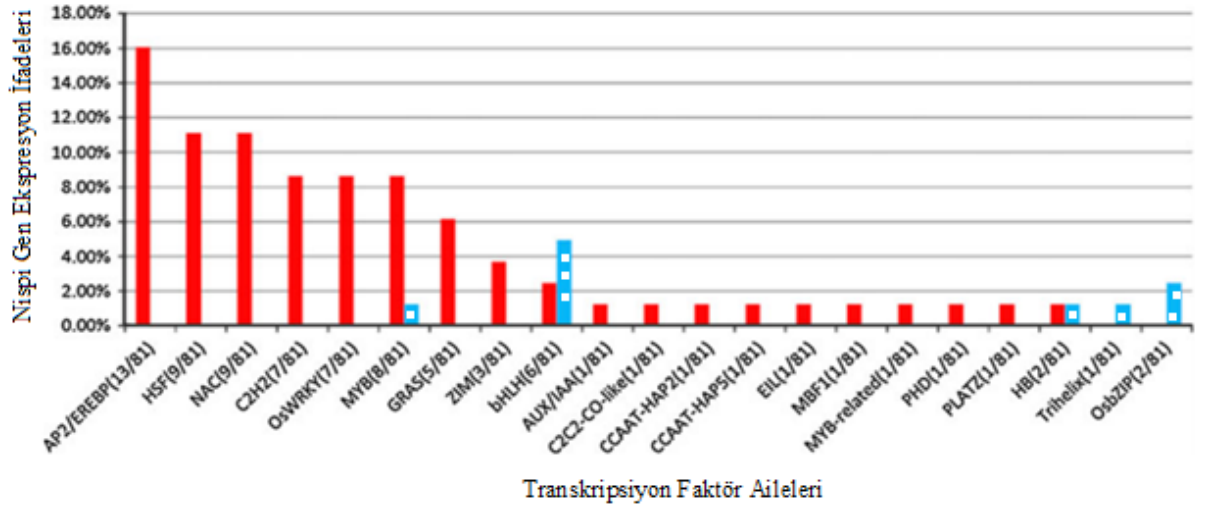
	Kontrol (Saf su)	Juglon (1mM)
Sağlam Tohumlar		
Kök		
Uzama (cm)	16.2 ± 0.3	3.1 ± 0.1*
Taze Ağırlık (mg)	132.0 ± 2.3	56.0 ± 1.7*
Kuru Ağırlık (mg)	5.8 ± 0.3	4.3 ± 0.2*
Filiz		
Uzama (cm)	3.1 ± 0.2	2.2 ± 0.1*
Taze Ağırlık (mg)	102.8 ± 2.8	37.9 ± 1.9*
Kuru Ağırlık (mg)	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1
Kotiledon		
Protein (mg/g fr. wt.)	1.9 ± 0.3	1.1 ± 0.1*
Katekolaz (A ₄₃₀ /g fr. wt.)	10.5 ± 0.9	24.5 ± 1.3*
Dopa Oksidaz (A ₄₉₀ /g fr. wt.)	11.0 ± 0.7	17.8 ± 0.8*
Kabuğu Çıkarılmış Tohumlar		
Kök		
Uzama (cm)	19.5 ± 0.6	4.0 ± 0.1*
Taze Ağırlık (mg)	118.9 ± 2.5	45.2 ± 1.2*
Kuru Ağırlık (mg)	6.7 ± 0.8	3.6 ± 0.2*
Filiz		
Uzama (cm)	2.7 ± 0.2	2.0 ± 0.1*
Taze Ağırlık (mg)	77.2 ± 2.3	40.8 ± 1.4*
Kuru Ağırlık (mg)	2.6 ± 0.2	2.1 ± 0.1*
Kotiledon		
Protein (mg/g fr. wt.)	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.2
Katekolaz (A ₄₃₀ /g fr. wt.)	10.1 ± 0.4	12.7 ± 0.5
Dopa Oksidaz (A ₄₉₀ /g fr. wt.)	12.7 ± 0.5	14.9 ± 0.6

*(P < 0.05) * test, ± SD, n = 4.

2.4.2 Juglon'un Polifenol Oksidaz Enziminin Gen İfadeleri Üzerine Etkileri

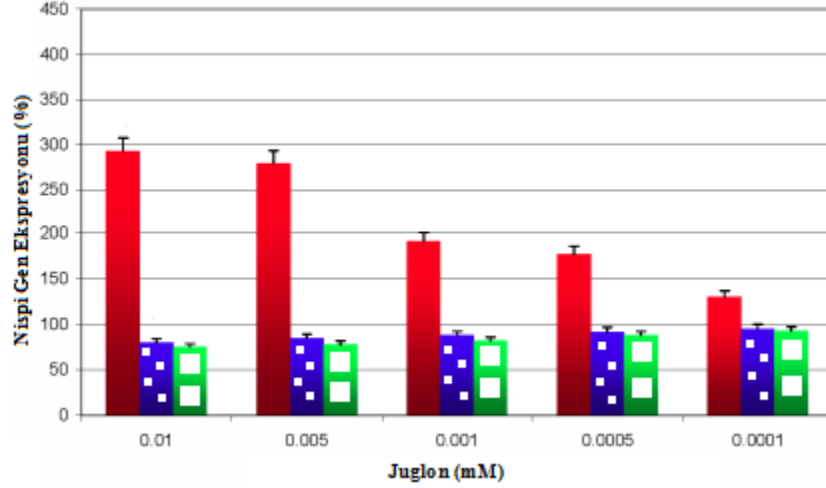
Juglona maruz kalan pirinç köklerindeki hücresel tepkileri daha iyi kavrayabilmek için, juglon stres sırasında pirinç transkriptomunun (Bir organizma veya hücre tipinde belirli koşullarda üretilen haberci RNA moleküllerinin tümü) geniş ölçekli analizini yapıldı. Juglona maruz kalma; hücre büyümesi, hücre duvarı oluşumu, kimyasal detoksifikasyon, abiyotik stres yanıtı ve epigenez ile ilgili transkript gen düzeylerinde değişiklikler başlattı. En baskın transkripsiyon faktörü aileleri AP2 / ERF, HSF, NAC, C2H2, WRKY, MYB ve GRAS'dır. Juglon ile muamele edilmiş pirinç köklerinin gen ekspresyon profili, absisik asit ve jasmonik asidin gen ekspresyon ifadesinin artmasını ve biyosentezini ve giberellik asitin inaktivasyonunu ortaya çıkarmıştır. Buna ek olarak, juglon, iki kalsiyum bağımlı protein kinaz (CDPK), 6 mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) geni ve 1 MAPK geninin

sentezlenmesini arttırdı ve CDPK benzeri bir kinaz ve MAPK'lerin aktivitelerini belirgin şekilde arttırdı (Şekil 2. 3) [22].

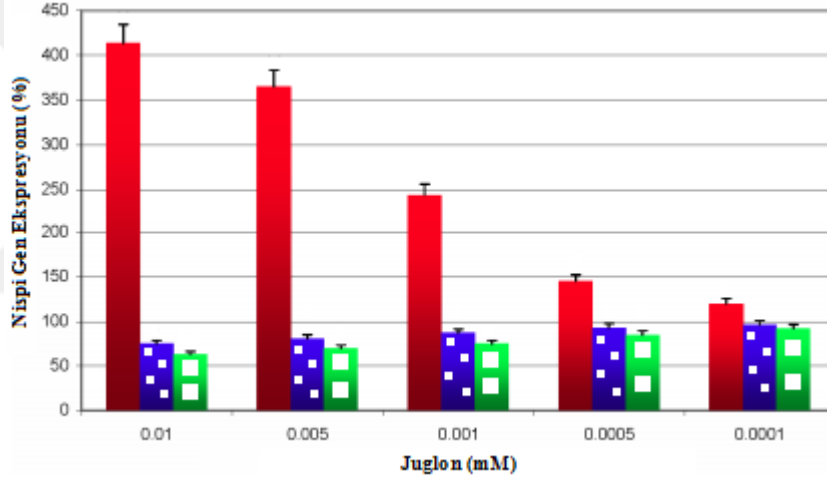


Şekil 2. 3 Pirinç köklerinde juglon uygulamasıyla birlikte transkripsiyon faktör ailelerinin değişen ekspresyon seviyeleri (İçi boyalı olanlar gen ekspresyonunun artışı, içi boşluklu olanlar gen ekspresyonunun azalışını göstermektedir) [22]

Mısırın büyümesi ve gelişmesi üzerindeki allelokimyasal etkiyi araştırmak ve Juglonun sebep olduğu oksidatif stres altındaki mısır fidelerinde Glutasyon Transferaz geninin (GstI) ekspresyon ifadesine bakmak amacıyla yapılan çalışmada mısır tohumlarına 5 farklı konsantrasyonda (0,01, 0,005, 0,001, 0,0005 ve 0,0001 mM) juglon uygulaması yapıldı. 4- gün, 6-gün ve 8-gün olacak şekilde juglona maruz bırakılan mısır tohumlarından elde edilen birincil köklerde (Şekil 2. 5) ve koleoptillerde (Şekil 2. 4) GstI geninin ekspresyon ifadesine bakıldı. Glutasyon Transferaz genleri (E.C.2.5.1.18) sinyal iletiminde, flavanoidlerin katalitik olmayan bağlanmasında ve sitozolik GstI genleri redox iç dengenin kurulmasında önemli rol oynar. Kontrol tohumları ile karşılaştırıldığında allekimyasal strese maruz bırakılan tohumlarda zamana ve doza bağımlı olarak analiz edilen genin transkripsiyonel aktivitesinin değiştiği tespit edildi [23].



Şekil 2. 4 Juglon uygulamasından etkilenen mısır fidelerinin koleoptillerinde GstI geninin nispi gen ekspresyon ifadeleri (içi dolu olan 4-gün, içi küçük boşluklu olan 6-gün, içi büyük boşluklu olanlar 8-gün juglona maruz bırakılmış tohumları gösterir) [23]



Şekil 2. 5 Juglon uygulamasından etkilenen mısır fidelerinin birincil köklerinde GstI geninin nispi gen ekspresyon ifadeleri (içi dolu olan 4-gün, içi küçük boşluklu olan 6-gün, içi büyük boşluklu olanlar 8-gün juglona maruz bırakılmış tohumları gösterir) [23]

Bu çalışma göstermiştir ki; 4-günlük juglon uygulaması analiz edilen genin önemli ölçüde eksprese olmasını sağlarken, 6- günlük ve 8-günlük juglon uygulamaları GstI geninin ekspresyonunu önemli ölçüde düşürmüştür. GstI geninin ekspresyonundaki bu azalmaya uzun süre strese maruz bırakılan mısır tohumlarındaki anti-oksidant savunma sisteminin kırılmasının yol açtığı belirtilmiştir [23].

3.1 Materyaller

3.1.1 Yararlanılan Alet ve Cihazlar

İklim dolabı: JSR

Masa santrifüj: Hettich Micro 220

Soğutmalı santrifüj: Hettich Micro 220 R

Spektrofotometre: Shimadzu UV-1800 240V

pH metre: Mettler Toledo

Hassas terazi: Shimadzu AY220

Buzdolabı: Bosch Derin dondurucu (-80°C) : Uğur

Karıştırıcı: Isolab

Otomatik pipetler: Isolab, Axygen

Çalkalayıcı: WiseShake SHD-1D

Manyetik karıştırıcı: WiseStir MSH-20A

Elektroforez: Bio-Rad

Gerçek Zamanlı PCR Cihazı: Bio-Rad

Nanodrop Spektrofotometre: PCR Max / Lambda

3.1.2 Kullanılan Kitler, Kimyasallar ve Bitki Materyali

TRIzol®: Invitrogen

Total RNA İzolasyon Kiti: Qiagen

cDNA Sentez Kiti: Jena Bioscience

Gerçek Zamanlı PCR Kiti: Jena Bioscience

Juglon: SIGMA- ALDRICH (H47003)

Sodium Phosphate Dibasic: SIGMA (S3264)

3,4-Dihydroxy-DL-phenylalanine (dl dopa): SIGMA (D9503)

Katekol: SIGMA-ALDRICH (135011)

Sodyum Dodesil Sülfat: SIGMA

β-merkaptöetanol: SIGMA

Salatalık Tohumları: AGROMAR-Bursa (*Cucumis sativus*, Varyete: Beith Alpha)

3.1.3 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

3.1.3.1 Enzim Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözeltiler;

- Yaprak ve köklerden Polifenol enzim ekstraksiyonu için 50 mM Tris-HCl pH:6,8 tamponu hazırlandı (PFO eldesi için kullanılan homojenat tamponu): 0, 6055 g Tris 80 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 2 g SDS ve 2 g β -merkaptoetanol çözeltisi ilave edildi. pH, HCl çözeltisi kullanılarak 6,8 e ayarlandı. Toplam hacim saf su yardımıyla 100 mL ye tamamlandı.

3.1.3.2 Juglon Çözeltisinin Hazırlanışı;

- Juglon çözeltileri 0,5 mM, 0,25 mM, 0,1 mM ve 0,01 mM olarak hazırlandı. 0,5 mM 250 mL Juglon çözeltisi için gerekli olan juglon miktarı hesaplanıp tartıldı. 0,25 mM 100 mL, 0,1 mM 100 mL ve 0,01 mM 100 mL Juglon çözeltileri, 0,5 mM 250 mL Juglon çözeltisinden seyreltilerek hazırlandı.

3.1.3.3 5X MOPS Tamponunun Hazırlanışı;

- 500 mL 5X MOPS tamponu hazırlamak için; 0,2 M MOPS pH:7,00 dan 20,927 g, 50 mM sodyum asetatdan 2,51 g ve 0,5 M EDTA pH:8,00 dan 5 mL alınıp steril bir beherin içinde birleştirildi ve karışımın son pH'ını 7' e ayarlamak için NaOH kullanıldı. Üzerine 0,5 L DEPC'li su eklenerek karıştırıldı ve otoklavlandı.

3.1.3.4 Yükleme Tamponunun Hazırlanışı;

- Yükleme tamponunun hazırlanmasında kullanılacak olan 1X MOPS çözeltisi, hazırlanmış olan 5X MOPS çözeltisinin seyreltilmesiyle elde edildi. Bunun haricinde bu tamponu hazırlamak için, 1 mM EDTA, %50 gliserol ve 4 mg/mL Bromofenol mavisi kullanıldı.

3.2 Metot

3.2.1 Tohumların Sterilizasyonu

Tohumları sterilize etmek için % 1 sodyum hipoklorit çözeltisi hazırlandı. Bunun için 1 mL sodyum hipokloride 99 mL distile su ilave edildi. Tohumlar bu çözeltinin içine ilave edilip, 15 dakika bekletildi. Sonra süzgeç yardımıyla % 1 sodyum hipoklorit çözeltisi süzülüp tohumların üzerine 100 mL distile su eklendi ve 30 dakika bekletildi. Bu işlem iki kere daha tekrar edilip sodyum hipokloridin uzaklaştırılması sağlandı. Sonrasında farklı konsantrasyonlarda juglon çözeltisi hazırlanarak tohumlara uygulandı ve kontrol grubu olarak distile su kullanıldı.

3.2.2 Tohumlara Juglon Uygulanması

Bu aşamadan önce, Petri kaplarının filtre kağıtlarıyla birlikte sterilizasyonu sağlanır. Filtre kağıtları öncelikle Petri kaplarının ölçüsünde kesildi. Her Petri kutusuna, kesilmiş filtre kağıtlarından ikişer adet yerleştirilir ve cam Petriler alüminyum folyo ile sarılarak otoklavlandı. Ardından kurutma işlemi için 70°C lik etüvde 2 saat bekletilir. Sonrasında sterilize edilmiş cam Petrilerin her birine sterilize edilmiş 10 tohum yerleştirildi. Tohumları ekilmiş cam Petriler 5 farklı gruba ayrılır ve her bir grup altışar Petri içerecek şekilde sınıflandırıldı. Kontrol grubunda her Petrideki tohumlara 7,5 mL distile su uygulandı. Diğer gruplar 0,5 mM, 0,25 mM, 0,1 mM ve 0,01 mM lık juglon çözeltilerini içerecek şekilde hazırlandı ve altışarlı Petrilerdeki tohumlara her bir juglon konsantrasyonu için 7,5 mL juglon uygulandı. Örneğin; 0,5 mM lık juglon çözeltisinden Petri başına 7,5 mL alınarak Petrideki tohumlara uygulandı. Diğer konsantrasyonlardaki Juglon çözeltileri için de işlem tekrarlandı. Sonrasında Petri kapları bitki büyütme kabinine kaldırıldı ve kabin 25°C sıcaklığa ve karanlığa ayarlandı. Tohumlar 10 gün için çimlenmeye bırakıldı.

3.2.3 Çimlenen Tohumların Yaprak ve Köklerinin Ayrılması

10 gün sonunda çimlenen tohumlarda, yaprak, kök ve gövde bıçak yardımıyla birbirinden ayrıldı. Juglonun tohumlar üzerindeki etkisini gözlemlemek için her bir gruptaki (kontrol grubu, sırasıyla 0,5 mM, 0,25 mM, 0,1 mM ve 0,01 mM 'lık juglon çözeltilerini içeren gruplar) çimlenen tohumlardan ayrıştırılan kök ve gövdenin uzunluğu cetvel yardımıyla

ölçüldü. Sonrasında yapraklar ve kökler her bir grup için 0,5 g olacak tartıldı ve -80°C de daha sonra enzim aktiviteleri ve gen ifadesi tayinlerinde kullanmak üzere bekletildi.

3.2.4 Yaprak ve Köklerden Polifenol Oksidaz Enzim Ekstraksiyonu

0,5 g olarak tartılan yaprak örnekleri üzerine sıvı azot (yaprakların üzerini örtecek kadar) uygulandı. Azot buharlaştıktan sonra, 0,5 g yaprak başına 10 katı hacimde (mL) tampon çözültiden alındı (0,5 g yaprak başına 5 mL tampon çözülti) ve yapraklar havanda bu çözülti içinde ezilerek homojenize edildi. Ezme süresi her 0,5 g lık yaprak başına 2 dakika uygulandı. Elde edilen homojenat, kurutma kağıdından süzüldü. Süzüntü 10 dakika 10000 rpm arasında +4°C de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı başka bir tüpe alınıp, ağzı kapatılıp, etiketlenip +4°C lik buzdolabına kaldırıldı.

3.2.5 Polifenol Oksidaz Enzim Aktivitesinin Tayini

Polifenol oksidaz enzim aktivite tayini için katekol (MA: 110,1 g/mol) ve dopa (MA:197,2 g/mol) substratları kullanıldı.

3.2.5.1 Katekol Oksidaz Aktivitesi:

100 mL 10 mM katekol substrat çözültisinden 300 µL alınıp, deney tüpünde üzerine 300 µL tampon çözülti ilave edilir. Bunun üzerine enzim özütünden 100 µL ilave edilir ve 30°C ye ayarlı etüvde 3 dakika bekletilir. Spektrofotometrede 430 nm de absorbansı ölçülür. Kör numune olarak 350 µL substrat + 350 µL tampon kullanılır. Ölçülen absorbans değerleri gram yapraktaki absorbans değerine çevrildi.

3.2.5.2 Dopa Oksidaz Aktivitesi:

100 mL 10 mM dopa çözültisinden 600 µL alınıp enzim özütünden 100 µL ilave edilir. 30°C ye ayarlı etüvde 3 dakika bekletilir. Spektrofotometrede 490 nm de absorbansı ölçülür. Kör numune olarak 700 µL substrat çözültiden kullanılır. Ölçülen absorbans değerleri gram yapraktaki absorbans değerine çevrildi.

3.2.6 RNA İzolasyonu

50-100 mg doku örneği başına 1 ml TRIzol® eklendi ve örnek homojenize edildi. 10 dk boyunca +4°C de 12,000xg de santrifüj edildi. Burada sonuçlanan pelet ekstra-selüler matriks, polisakaritler ve yüksek moleküler ağırlıklı DNA içerirken, supernatant kısmı RNA içerir. O yüzden pelet kısmı atılıp supernatant kısmı başka bir tüpe transfer edildi.

Bundan sonra faz ayırma işlemine geçildi. Örnek, nucleo-protein kompleksinin tamamen ayrılması için oda sıcaklığında 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Homojenizasyonda kullanılan 1 ml TRIzol® başına 0.2 ml kloroform eklendi. Elle 15 saniye boyunca karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe ettikten sonra, 15 dk boyunca +4°C de 12,000xg de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası karışım alt tabakada kırmızı renkli fenol-kloroform fazı, ortada ara-faz ve üst tabakada renksiz sıvı faz olacak şekilde fazlara ayrıldı. Üst tabakadaki RNA içeren renksiz sıvı faz pipetle alınarak başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine homojenizasyonda kullanılan 1 ml TRIzol® başına 0.5 ml %100 izopropanol eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Ardından 10 dk boyunca +4°C de 12,000xg de santrifüj edildi. Supernatant kısmı dökülerek geriye sadece pellet kısmı bırakıldı. Homojenizasyonda kullanılan 1 ml TRIzol® başına 1 ml %75 etanol eklendi ve daha sonra kullanılmak üzere -20°C de depolandı.

3.2.7 RNA'nın DNA Kalıntılarından Temizlenmesi

RNA'nın DNA kalıntılarından temizlenmesi deneyine başlamadan önce -20°C den RNA örnekleri alınıp 30 dk boyunca +4°C de 12,000xg de santrifüj edildi. Sonra steril bir ortamda kapakları açılıp ters çevrilerek etanol kalıntılarının uzaklaştırılması sağlandı. Örnek hacmi RNaz'sız su ile 100 µL ye ayarlandı. Üzerine 350 µL RLT tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı. Seyreltilmiş RNA örneğinin üzerine 250 µL saf etanol eklendi ve pipetleme yapılarak iyice karıştırıldı. 700 µL lik bu örnek 2 mL lik toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy Mini spin kolonlara transfer edildi. Kapak sıkıca kapatılarak 1 dk boyunca +4°C de 8000xg de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra RNeasy Mini spin kolonlar kaldırıldı ve toplama tüpü boşaltıldıktan sonra tekrar kullanıldı. RNeasy Mini spin kolona 500 µL RPE tamponu ilave edildi. Kapak sıkıca kapatıldıktan sonra spin kolon membranı yıkamak için 1 dk boyunca +4°C de 8000xg de santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldıktan sonra tekrar kullanıldı. Tekrar RNeasy Mini spin kolona 500 µL RPE tamponu ilave edildi ve kapak sıkıca kapatıldıktan sonra spin kolon membranı yıkamak için 2 dk boyunca +4°C de 8000xg de santrifüj edildi. RNeasy Mini spin kolon yeni bir 2 mL lik toplama tüpüne aktarıldı. Kapak sıkıca kapatıldıktan sonra yüksek hızda 1 dk boyunca santrifüj edildi. RNeasy Mini spin kolon yeni bir 1.5 mL lik toplama tüpüne yerleştirildi. 30-50 µL RNaz içermeyen su RNeasy Mini spin kolona eklendi. Kapak sıkıca kapatılarak, RNA'yı tüpte toplamak için 1 dk boyunca +4°C de 8000xg de santrifüj edildi.

Eğer beklenen RNA ürününün 30 µg dan fazla olduğu düşünülüyorsa bu aşama tekrarlandı. Toplama tüpünde biriken RNA örneği daha sonra kullanılmak üzere -80°C buzdolabına kaldırıldı.

3.2.8 RNA Elektroforez Jeli

RNA Elektroforez jeli (50 mL %1 lik) hazırlamak için 0,5 g agaroz tartılıp sterilize edilmiş bir beherin içine aktarıldı. 5X'lik MOPS' tan 10 mL ve DEPC'li sudan 31,25 mL alınıp beherin içerisine aktarıldı. Sonra ağzı kapatılan beher mikro dalga fırına koyulup agarozun çözünmesi sağlandı. Buharlaştan kısım yerine DEPC'li su ilave edildi ve etüvde sıcaklığının 60°C'ye gelmesi için bekletildi. Diğer taraftan 8,75 mL formaldehit etüvde ısıtılarak sıcaklığının 60°C'ye gelmesi sağlandı. Formaldehit beherin içerisine aktarılmasıyla toplam hacim 50 mL oldu. Elde edilen karışım bir süre elle karıştırılarak formaldehitin karışım içine iyice dağılması sağlandı, ardından jel dökülüp tarak yerleştirilerek donması sağlandı. Tank tamponu olarak 1X MOPS kullanıldı. Yükleme için RNA örneklerinin hazırlanmasında Çizelge 3. 2 kullanıldı.

Çizelge 3. 2 Yükleme için RNA Örneklerinin Hazırlanması

Gerekli Malzemeler	Yüklenen Miktar
5X MOPS	2 µL
RNA	2 µL
Steril DEPC'li Su	2,5 µL
Formaldehit	3,5 µL
Formamid	10 µL
Etidyum Bromür (mg/mL)	0,5 µL
	Toplam = 20,5 µL

Hazırlanan örnekler etüvde 55°C de 15 dakika bekletildi ve ardından 2 µL yürütme tamponu eklenerek karıştırıldı. Jele yükleyip 60 Voltta 1,5 saat yürütüldü.

3.2.9 Primer Tasarlama

Primer tasarlamak için *Cucumis sativus*'a ait olduğu tahmin edilen dört farklı dizin gen düzeyinde ve aminoasit düzeyinde birbirleriyle karşılaştırıldı. Sekanslar arasında yüksek oranda benzerlik olduğu görüldü. Bu dört farklı tahmin edilen dizin, PREDICTED: Cucumis

sativus polyphenol oxidase, chloroplastic-like (LOC105434462) (XM_011650143.1), PREDICTED: Cucumis sativus polyphenol oxidase, chloroplastic-like (LOC101220458) (XM_004146596.2), PREDICTED: Cucumis sativus polyphenol oxidase II, chloroplastic-like (LOC101219500) (XM_004146595.1) ve PREDICTED: Cucumis sativus polyphenol oxidase, chloroplastic-like (LOC101219021) (XM_004146593.1) 'a aittir. Bunun haricinde, farklı bitkilerdeki polifenol oksidaz genine ait dizin bigisi de gen düzeyinde ve aminoasit düzeyinde birbiriyle karşılaştırıldı ve bunun sonucunda yüksek oranda ortak dizinlerin olduğu görüldü. Bu durumun polifenol oksidaz enzimine ait genin korunmuş bölgelerinin olabileceği düşünüldü. Bir sonraki aşamada, bu karşılaştırmaya *Cucumis sativus*'a ait olduğu tahmin edilen dört farklı dizin de ilave edildi ve bunların içerisinde farklı bitkilerdeki polifenol oksidaz enziminin sekans bilgisiyle yüksek oranda benzerlik gösteren PREDICTED: Cucumis sativus polyphenol oxidase, chloroplastic-like (LOC101219021) (XM_004146593.1) (Çizelge 3. 3) seçildi ve bu gene ait sekans bilgisi NCBI'dan Fasta formatında indirildikten sonra Primer3 programıyla ileri ve geri primerler tasarlandı (Çizelge 3. 4). Primerler SYBR GREEN boyası ile işaretlenip Gerçek Zamanlı PCR reaksiyonları kuruldu. Reaksiyonlar Molgen Biyoteknoloji firmasında BİORAD Real Time PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Çizelge 3. 3 Salatalıkta (*Cucumis sativus*) Polifenol Oksidaz ve Aktin Genlerine ait Fasta Formatında Sekans Bilgileri

ENZİM	SALATALIK (<i>Cucumis sativus</i>) cDNA
Aktin	<p>Cucumis sativus clone CU36H1 actin mRNA, partial cds (GenBank: DQ641117.1)</p> <pre> 1 gcaagtggcc gtactaccgg tatcgtgctg gattctgggtg atggtgtgag tcacactggt 61 cccatctatg agggttacgc cctccctcat gccattctcc gtttggacct tgctggtcgt 121 gaccttactg atgctctcat gaaaattctc actgaagag gttacatggt caccaccact 181 gccgaacggg aaattgtccg tgacatgaaa gtgaagctgg catatggtgc tcttgactac 241 gaacaagaac tcgagactgc aaagagcagt tcctctattg agaagaacta tgaacttctc 301 gatggacaag tcatcaccat cggagctgag agattccggt gcccagaagt tctattccag 361 ccatctctca tcggtatgga agctgcagga atccacgaaa ctacttacia ctccatc 421 aagtgtgatg tagatatcag aaaggacctt tatggaaaca ttgtcctcag tgggtgttca 481 accatgttcc ctggcattgc agacaggatg agcaaggaaa tcacagccct tgctcccagc 541 agcatg </pre>
Polifenol Oksidaz	<p>PREDICTED: Cucumis sativus polyphenol oxidase, chloroplastic-like (LOC101219021)</p> <pre> 1 ATGGCTTCTT TATCTTCTCT TCTATTACTT TCTTCCTATT CTCAAACCAA 51 AACCAAATCC TCCATTTCTT CAAACAAAAG ACATGTTGTT GTCAATTATG 101 TCTCATGCAA AGCAGCCTCT AATAATGGAG AAGATTCTGT AAGCAAATTT 151 GATCGTAGAG AAGTGTGTTT CGGTCTTGGA GGTCTTTTAT GCGTCGTAC 201 GGCCACCAGC TCTGTGTTGG CAGCTCCATT GACGCCAGAT ATCTTTAACT 251 GTCATATGGC GAAAACACCT GGTGGCATCA AGGATTGTTG CCCACCACAA 301 ATTGGAAAAA TCATCCATTT CGTCCCCCCA AAAATTCAAC AACCTTATGT 351 TCGACGACCC GCTGCCCAT T GATGAACCA GACCCAAATT GAGGAATTGG 401 AAAGTGGCAT TAAGAAATTA AAACAAC TCG ATGAAGGTGA CCCGCATAGC 451 TTTTACATC AAGCTAAAAT TCATTGTGCA TATTGCGATT ATGTGTACAA 501 CCAGTTGGGG TCTATCACAG AAAC TAGATT TGGAGTTCAT AGCAACGCGT 551 TATTCTTCCC ATTTTCATCGT GCCTATCTCT ACTTCTTCGA GAGAATCTTG 601 AGGCATTATA TTGGGAACCC AAATTTCGCC ATACCCTTTT GGAATTGGGA 651 TTCACCACCG GGGATGTACA TGCCCGAATT CTACAACCGC CCATCTTCAT 701 CACTTTACGA TCATCTCCGT GATCCACGTC ACGATCCACA CAAATTGATT 751 TACCTAAACT ACAATGGAAA AACCGAAGAC CATTCTTTTG ACGTTGTGGA 801 TTGCAATCTC CGTTGGATGA ATGACCGAAT GCAAGTCCAA AGCCCTCGAA 851 GTTCTCTTGG AAGAGTTCTG AAAGCTGGAG AAACACCCAA TCCCACTGAT 901 ATGGGCACCA TTGAACAATC CCCACATAAT AACATTCACG ATTGGCTTGG 951 CACAAAGACC CCTCATTTTG AAGACATGGG ATCTTTTTAC TCGGCAGCGC 1001 TAGATCCGTT GTTTTATGCT CACCATGCCA ATATAGACCG GTTGTGGAAT 1051 ATTTGGAAAA CATTGGACGG GAATCCAAAA GATCACATTG ACCCAGATTG 1101 GTTGAATTCC TCGTTTGTGT TTTACGATGA GAATAAAAAC GCTGTAAATA 1151 TCAAAGTTTC TGATTGTTTG GACACTGAAA AGCTTGTTTA TGTTTACCAA 1201 GAGGTACCAC TTCCATGGTT GCACATGAAC AAAATCCCCA CCCCAAATCC 1251 GTGATAAGA ACTGAAGAAT CTGAGCCTCC AATCGTCAAC TTCCCCAGA 1301 TTTTGAATTC GGACATAACC ACAATGGTAG ACAGGCCGGA AGAGGATAGG 1351 AGCGGTGAGG AAGTTGATGA GGTGTTGGTG TTGGAAGATG TGGAGTATGA 1401 TCCAAC TACT CGGGTGCATT TTGATGTACT TGTTAATGTT GTTGATAAGG 1451 CGCAGGACAG GTGCGCTGCG TTTCTTGAGT TTGTGGGCAG CTTCAAAAAC 1501 ATTCCCATG GTCTCCACCA CCATGATAAA ACCTCTTTGC GTTTTGTGAT 1551 AACTGAGGTC ATTCAAGGGT TGGGTTTGGG GCGTGATAAA AATTTGGCTG 1601 TTAAGATTGA ACCTATGGTT GGTGAGAAG GTGTCACCGT TGGAGGAATT 1651 AAGATTCAAC TTGAGCCCC TCGATAA </pre>

Çizelge 3. 4 Aktin ve Polifenol Oksidaz Genine ait İleri ve Geri Primerler

Aktin: ActF1: 5'-CCACGAAACTACTTACAACCTCCATC-3' ActR1: 5'-GGGCTGTGATTTTCCTTGCTC-3'
Polifenol Oksidaz: PFO F: 5' CACTGATATGGGCACCATTG 3' PFO R: 5' ACCGGTCTATATTGGCATGG 3'

3.2.10 Komplementer DNA sentezi (cDNA)

Komplementer cDNA sentezi için hazır ticari kitlerden biri olan Jena Bioscience firmasının (Alman menşeli Cat no: PCR511) script cDNA sentez kiti kullanıldı. Deney sırasında yapılan işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. cDNA sentezi öncesi tüm RNA konsantrasyonları 100 ng/µl olacak şekilde eşitlendi. Reaksiyon örnek başına toplam hacim 20 µl olacak şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirildi (Çizelge 3. 5). Enzim eklemeyen önce tüpe konulan tüm reaktifler birkaç kez pipet ile karıştırıldı. Tüm bileşenler tüpe konulduktan sonra tüpler Bio-Rad termal cyler cihazına konularak cDNA reaksiyonunun Çizelge 3. 6'da belirtilen sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirilmesi sağlandı.

Çizelge 3. 5 cDNA Sentezi için Gerekli Bileşenler ve Hacimleri

Bileşen	Hacim (µL)
RNaz'sız distile su	10
Oligo dT Primer	0,5
dNTP Karışımı	1
DTT	1
Script RT Tamponu	4
Enzim	0,5
RNA Ürün	2
RNaz İnhibitör	1
Toplam	20

Çizelge 3. 6 cDNA Reaksiyonunun Gerçekleşmesi için Bio-Rad Termal Cyclers Cihazında Belirlenen Sıcaklık Değerleri ve Bunlara Karşılık Gelen Süreler

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
50	60
42	10
70	10

cDNA reaksiyonu sonrasında elde edilen cDNA gerçek zamanlı PCR'da kullanılmak üzere -20 derecede saklandı.

3.2.11 Gerçek Zamanlı PCR

cDNA eldesinden sonra Gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR) işlemi için de hazır ticari kitlerden biri olan Jena Bioscience firmasının (Alman menşeli Cat no: PCR306) qPCR GreenMaster with UNG/lowROX kiti kullanıldı. Bu deney esnasında yapılan işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PCR reaksiyonları için gerekli bileşenler Çizelge 3. 7'de belirtilen hacimlerde kullanıldı ve toplam hacim 20 µL olacak şekilde deney gerçekleştirildi.

Çizelge 3. 7 PCR Reaksiyonları için Gerekli Hacmi İçeren Bileşenler

Bileşen	Hacim
PCR Grade Su	6,8 µL
Real Time Master Karışım	10 µL
Geri Primer	0,6 µL
İleri Primer	0,6 µL
cDNA Ürün	2 µL
	Toplam = 20 µL

Sonrasında 96 well plate içine konulan karışımlara ait reaksiyon Biorad CFX Connect cihazı ile Çizelge 3. 8'de ifade edildiği şekilde gerçekleştirildi.

Çizelge 3. 8 Q-PCR Reaksiyonları için Gerekli Olan Sıcaklık Değerleri ve Süreler

Sıcaklık (°C)	Süre
50	3 dk
95	2 dk
95	15 sn
55	40 sn
72	30 sn

} 40 siklus

Gerçek zamanlı PCR (Q-PCR) reaksiyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirildikten sonra, C_T değerleri kontrol grubu ve juglon uygulanmış örnekler (yaprak ve kök) için polifenol oksidaz (PFO) ve Aktin genlerinde kat değişimi (fold change) hesaplamak amacıyla kullanıldı. Karşılaştırmalı C_T metodu kullanılarak ΔC_T ve $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri hesaplandı.

3.2.12 DNA Elektroforez Jeli

DNA Elektroforez jeli için 0,75 g Agaroz tartılıp bir behere aktarıldı. Üzerine 75 mL 1X TBE tamponu ilave edildi. Mikrodalga fırın içinde agarozun erimesi sağlandı ve biraz soğuduktan sonra 3 μ L etidyum bromür ilave edildi ve jel döküldü. 7,4 μ L örnek ve 1,6 μ L yürütme boyası (loading dye) kuyulara yüklendi.

3.2.13. İstatistik Analiz

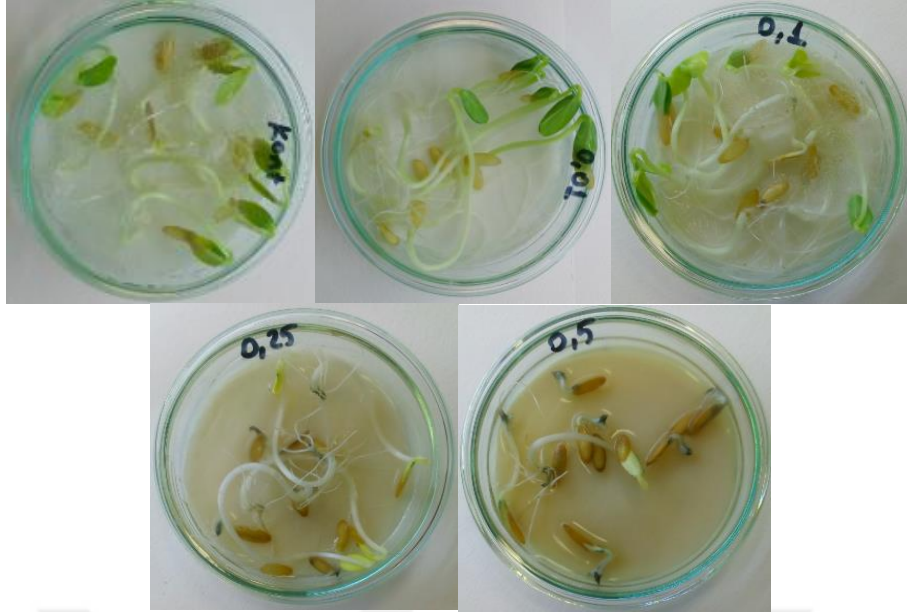
Araştırma üç tekrarlı olarak yürütülmüş olup juglon konstrasyonunun salatalıkta büyüme parametreleri (çimlenme, kök ve gövde büyümesi), PFO enzim aktiviteleri ile PFO gen ifadeleri arası ilişkileri belirlemek için korelasyon testi yapıldı ve 0,01 ve 0,05 önemlilik düzeylerinde korelasyon durumları belirtildi.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Sonuçlar

4.1.1 Juglonun Salatalıkta Tohum Çimlenmesi ile Kök ve Gövde Büyümesi Üzerine Etkileri

Salatalık tohumlarına 10 gün süreyle uygulanan farklı konsantrasyonlardaki Juglon çözeltisi bitkilerin kök, gövde gelişiminde ve tohumların çimlenme oranında gözle görülür derecede farklılıklara neden olmuştur. Özellikle 0,25 mM ve 0,5 mM Juglon uygulandığında kontrol grubuna (saf su) göre salatalık tohumlarının kök ve gövde büyümesinde inhibisyon etkisi göstermiş olup tohumların çimlenme oranını da olumsuz etki göstererek düşürmüştür. Fakat 1 mM Juglon uygulandığında ise kontrol grubuna göre kök, gövde büyümesi ve tohumların çimlenmesinde olumlu etki göstererek artışa sebep olmuştur (Şekil 4. 6).



Şekil 4. 6 Kontrol (Saf Su) ve 0,01, 0,1, 0,25 ve 0,5 mM Juglon uygulanmış olan tohumların karanlıkta ve 25°C de 10 gün süreyle çimlenmesinin ardından elde edilen sonuçlar

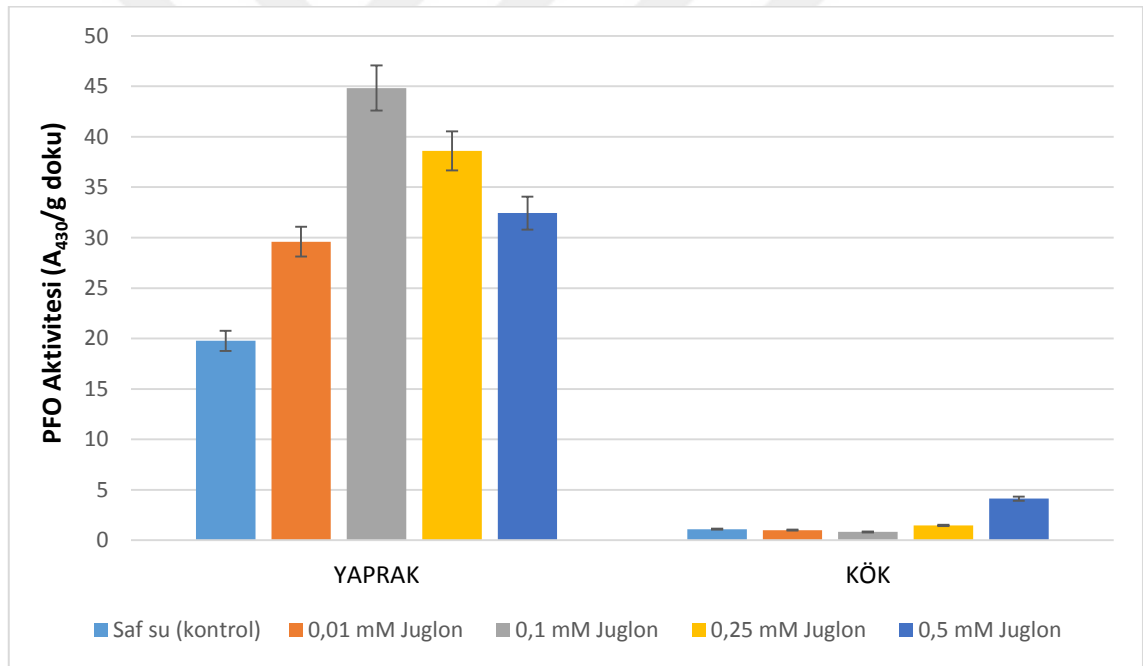
Çizelge 4. 9'da ise bu çimlenmelere ait veriler bulunmaktadır ve bu veriler gözle görülen sonuçları doğrular niteliktedir.

Çizelge 4. 9 Juglon'un kök, gövde uzunluğu ve çimlenme yüzdesine etkileri

	Kök Uzunluğu (cm)	Gövde Uzunluğu(cm)	Çimlenme Yüzdesi (%)
Saf Su	7,05	4,37	82,2
0,01 mM Juglon	9,65	5,94	73,4
0,10 mM Juglon	11,59	5,70	83,4
0,25 mM Juglon	4,47	3,40	81,1
0,50 mM Juglon	2,30	1,91	75,5

4.1.2 Juglonun Saltalıktaki Polifenol Oksidaz Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri

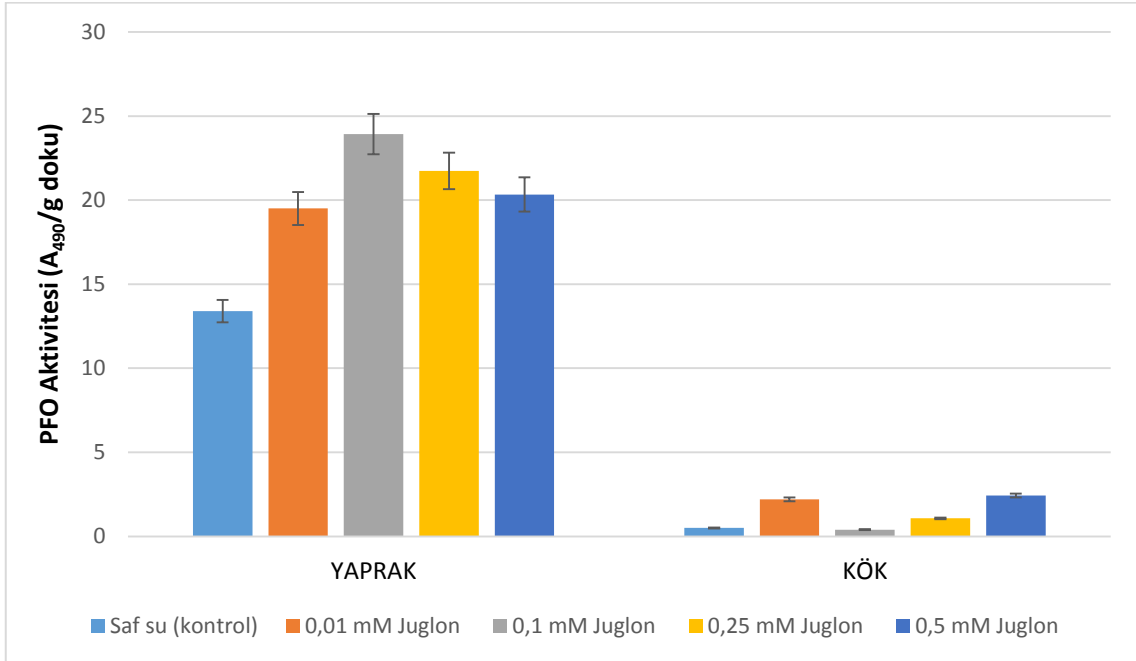
Enzimlerin ekstraksiyonu aşamasında 1g doku 10 mL tamponda homojenize edildiğinden substrat olarak katekolün kullanıldığı deneyde 100 µL (0,1 mL) enzim özütüne karşı gelen gram doku miktarı hesaplandı ve 0,01 g doku olduğu bu hesaplamayla belirlendi. Spektrofotometrede 430 nm de ölçülen aktivite değerleri 0,01 gr dokuya karşı geldiğinden 1 gramdaki aktivite değerleri hesaplandı ve nisbi aktivite değerleri olarak Şekil 4. 7’de kullanıldı. Bu şekle bakıldığında özellikle tohumlara juglonun uygulandığı tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre yaprakta PFO aktivite değerlerinin önemli ölçüde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat aktivitenin 0,1 mM değerine kadar arttığı sonrasında ise düştüğü gözlenmiştir. Kökte ise özellikle 0,5 mM Juglon uygulanması sonucunda kontrole göre PFO aktivite değerlerinde yine yüksek oranda artış tespit edilmiştir.



Şekil 4. 7 Juglonun katekol okside eden PFO aktiviteleri üzerine etkisi

Substrat olarak katekolün kullanıldığı deneyde kullanılan enzim özüt miktarı ile substrat olarak dopanın kullanıldığı deneydeki enzim özüt miktarları aynı olduğundan hesaplamada kullanılan işlemler burada da tekrar edildi fakat spektrofotometrede ölçüm 490 nm’de yapıldı. Gram doku başına aktivite değerleri hesaplanarak nisbi aktivite değerleri olarak Şekil 4. 8’de sunuldu. Bu şekle bakıldığında özellikle tohumlara juglonun uygulandığı tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre yaprakta PFO aktivite

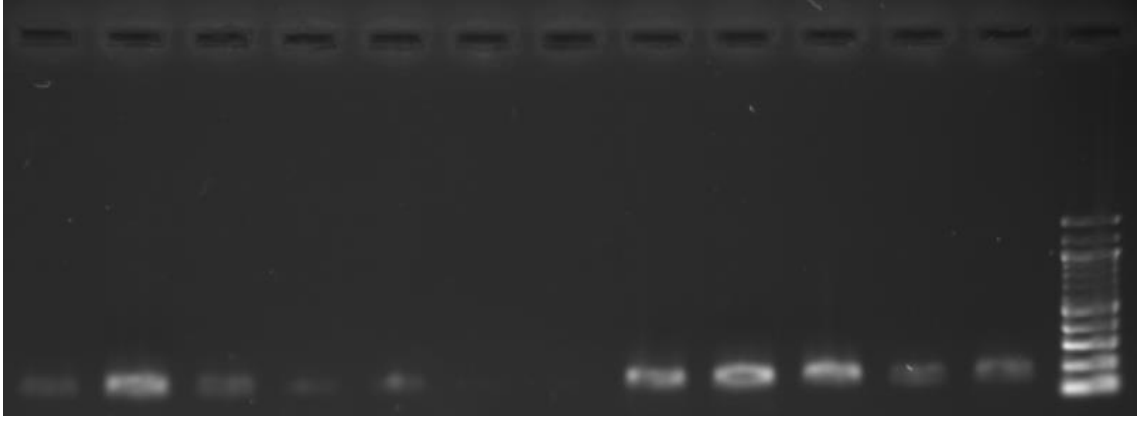
değerlerinin önemli ölçüde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat aktivitenin 0,1 mM değerine kadar arttığı sonrasında ise düştüğü gözlenmiştir. Kökte ise özellikle 0,01 mM ve 0,5 mM Juglon uygulanması sonucunda kontrole göre PFO aktivite değerlerinde yine yüksek oranda artış tespit edilmiştir.



Şekil 4. 8 Juglonun dopa okside eden PFO aktiviteleri üzerine etkisi

4.1.3 Juglonun Salatalıkta Polifenol Oksidaz Gen İfadeleri Üzerine Etkileri

Gerçek zamanlı PCR sonrasında yapılan DNA Elektroforez jeline ait sonuç Şekil 4. 9'da gösterilmiştir. İlk beş örnek yapraktaki polifenol oksidaz genine ait olup, sonraki beş örnek kökteki PFO genine aittir. Son örnek ise yüklenen markerı göstermektedir. Bu şekilde bakıldığında PFO genine ait bant dışında herhangi bir bant gözükmemesi ve primer dimerlerin varlığının tespit edilmemiş olmasından dolayı PFO nun gen ifadesine ait deneyin yaprakta ve kökte başarıyla gerçekleştirildiği söylenebilir.



Şekil 4. 9 Real-time PCR sonrası Polifenol Oksidaz enziminin jel görüntüsü: İlk beş örnek yaprak, sonraki beş örnek kök ve son örnek de yüklenen markeri göstermektedir

Gerçek zamanlı PCR sonrası elde edilen C_T değerleri yaprakta Aktin geni için Çizelge 4. 10'da ve PFO enzimini kodlayan gen için Çizelge 4. 11'de belirtildi ve bu değerlerden karşılaştırmalı C_T metodu kullanılırken yararlandı.

Çizelge 4. 10 Yaprakta, kontrol grubu ve Juglon uygulanmış örneklerde Aktin geni için C_T değerleri

YAPRAK	Kontrol Aktin	0,01 mM Juglon Uygulanmış Aktin	0,1 mM Juglon Uygulanmış Aktin	0,25 mM Juglon Uygulanmış Aktin	0,5 mM Juglon Uygulanmış Aktin
C_T değerleri	21,14698	21,02855	23, 19177	21,82798	21,31957
C_T değerleri	21,13708	20,61256	21,68293	21,09705	21,66007
Ortalama	21,14203	20,82056	22,43735	21,46252	21,48982

Çizelge 4. 11 Yaprakta, kontrol grubu ve Juglon uygulanmış örneklerde PFO geni için C_T değerleri

YAPRAK	Kontrol PFO	0,01 mM Juglon Uygulanmış PFO	0,1 mM Juglon Uygulanmış PFO	0,25 mM Juglon Uygulanmış PFO	0,5 mM Juglon Uygulanmış PFO
C_T değerleri	34,20915	32,12126	34,12938	34,45911	33,72980
C_T değerleri	35,43509	36,09639	32,61299	35,57442	34,18564
Ortalama	34,82212	34,10883	33,371185	35,01677	33,95772

Karşılaştırmalı C_T metodunun kullanılmasıyla ΔC_T ve $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerlerini hesaplamak için kullanılan formül;

$$\Delta C_T = C_T (\text{hedef gen}) - C_T (\text{referans gen}) [24]$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-((C_T \text{ ilgili gen} - C_T \text{ control geni})(JUGLON) - [C_T \text{ ilgili gen} - C_T \text{ control geni}](KONTROL))} [24]$$

$2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri yaprakta; 0,01 mM Juglon uygulanmış örnek için 1,312; 0,1 mM Juglon uygulanmış örnek için 6,710; 0,25 mM Juglon uygulanmış örnek için 1,091; 0,5 mM Juglon uygulanmış örnek için 2,317 olarak bulundu. Bu değerler kat değişimini (fold change) göstermektedir.

Bundan sonra, juglon ile muamele edilmiş ve juglon ile muamele edilmemiş (kontrol) örneklerde Polifenol Oksidaz enzimini kodlayan gen için ΔC_T değerleri hesaplandı. Ortalama değerler bulunup bu değerleri gösteren sütun grafiği çizildi.

Juglon ile muamele edilmemiş (kontrol) yaprakta PFO Gen İfadesi

$$2^{-\Delta C_T} = 2^{-[34,20915-21,14698]} = 0,000116922$$

$$2^{-\Delta C_T} = 2^{-[35,43509-21,13708]} = 4,96444E-05$$

$$\text{Ortalama} = 8,3283E-05$$

0,01 mM Juglon ile muamele edilmiş yaprakta PFO Gen İfadesi

$$2^{-\Delta C_T} = 2^{-[32,12126-21,02855]} = 0,00045789$$

$$2^{-\Delta C_T} = 2^{-[36,09639-20,61256]} = 2,18224E-05$$

$$\text{Ortalama} = 0,000239856$$

0,1 mM Juglon ile muamele edilmiş yaprakta PFO Gen İfadesi

$$2^{-\Delta C_T} = 2^{-[34,12938-23,19177]} = 0,00050986$$

$$2^{-\Delta C_T} = 2^{-[32,61299-21,68293]} = 0,000512536$$

$$\text{Ortalama} = 0,000511198$$

0,25 mM Juglon ile muamele edilmiş yaprakta PFO Gen İfadesi

$$2^{-\Delta C_T} = 2^{-[34,45911-21,82798]} = 0,000157634$$

$$2^{-\Delta C_T} = 2^{-[35,57442-21,09705]} = 4,38407E-05$$

$$\text{Ortalama} = 0,000100738$$

0,5 mM Juglon ile muamele edilmiş yaprakta PFO Gen İfadesi

$$2^{-\Delta CT} = 2^{-[33,72980-21,31957]} = 0,000183717$$

$$2^{-\Delta CT} = 2^{-[34,18564-21,66007]} = 0,000169601$$

Ortalama = 0,000176659

0,01 mM Juglon ile muamele edilmiş yaprakta PFO Gen İfadesi için Kat Değişimi =

$$0,000239856/8,3283E-05 = 2,880015551$$

0,1 mM Juglon ile muamele edilmiş yaprakta PFO Gen İfadesi için Kat Değişimi =

$$0,000511198/8,3283E-05 = 6,138081895$$

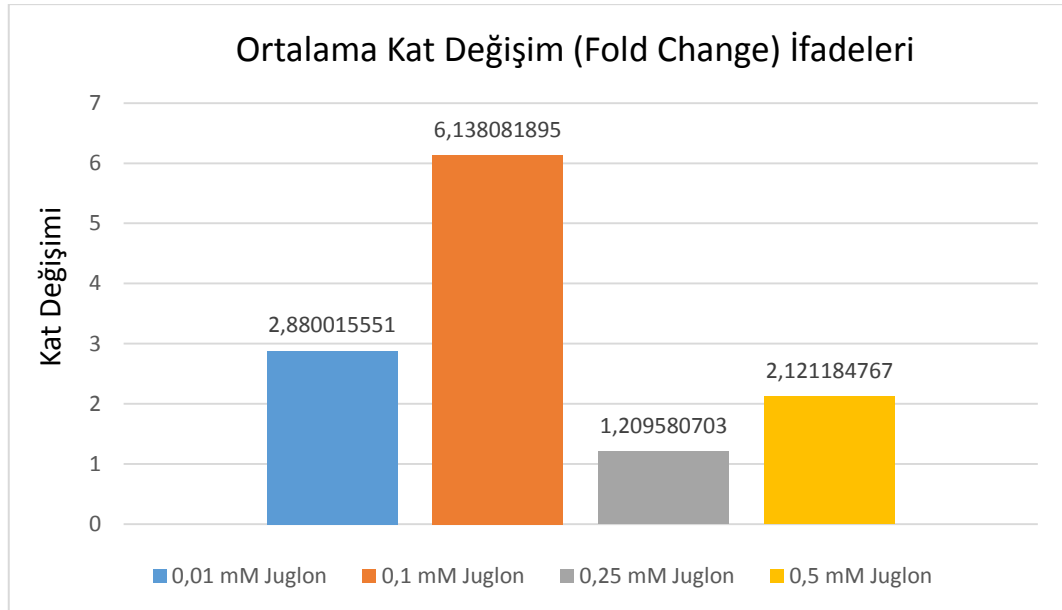
0,25 mM Juglon ile muamele edilmiş yaprakta PFO Gen İfadesi için Kat Değişimi =

$$0,000100738/8,3283E-05 = 1,209580703$$

0,5 mM Juglon ile muamele edilmiş yaprakta PFO Gen İfadesi için Kat Değişimi =

$$0,000176659/8,3283E-05 = 2,121184767$$

Hesaplanan bu değerleri içeren grafik Şekil 10'da gösterildi ve bu hesaplanan değerler yaprakta juglon uygulanan grupların kontrol grubuna göre kat değişimini ifade etmektedir. Bu grafiğe göre PFO'yu kodlayan genin nisbi gen ifadesinin kontrol grubuna kıyasla uygulanan tüm juglon konsantrasyonlarında artış gösterdiği belirlenmiş olup en fazla artış 6 kat artış 0,1 mM değerinde gözlenmiştir [25].



Şekil 4. 10 PFO'nun Yaprakta Nisbi Gen İfadeleri

Gerçek zamanlı PCR sonrası elde edilen C_T değerleri kökte Aktin geni için Çizelge 4. 12’de ve PFO enzimini kodlayan gen için Çizelge 4. 13’de belirtildi ve bu değerlerden karşılaştırmalı C_T metodu kullanılırken yararlandı.

Çizelge 4. 12 Kökte, kontrol grubu ve Juglon uygulanmış örneklerde Aktin geni için C_T değerleri

KÖK	Kontrol Aktin	0,01 mM Juglon Uygulanmış Aktin	0,1 mM Juglon Uygulanmış Aktin	0,25 mM Juglon Uygulanmış Aktin	0,5 mM Juglon Uygulanmış Aktin
C_T değerleri	19,76789	20,33378	21,58126	19,16448	20,8737
C_T değerleri	21,16711	21,51164	21,27429	21,04078	17,80701
Ortalama	20,4675	20,92271	21,427775	20,10263	19,340355

Çizelge 4. 13 Kökte, kontrol grubu ve Juglon uygulanmış örneklerde PFO geni için C_T değerleri

KÖK	Kontrol PFO	0,01 mM Juglon Uygulanmış PFO	0,1 mM Juglon Uygulanmış PFO	0,25 mM Juglon Uygulanmış PFO	0,5 mM Juglon Uygulanmış PFO
C_T değerleri	33,82281	32,50037	32,27385	33,63978	34,06980
C_T değerleri	32,65201	34,16753	34,77789	36,71197	35,17017
Ortalama	33,23741	33,33395	33,52587	35,17587	34,61998

$2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri kökte; 0,01 mM Juglon uygulanmış örnek için 1,282; 0,1 mM Juglon uygulanmış örnek için 1,593; 0,25 mM Juglon uygulanmış örnek için 0,203; 0,5 mM Juglon uygulanmış örnek için 0,176 olarak bulundu. Bu değerler kat değişimini (fold change) göstermektedir.

Bundan sonra, juglon ile muamele edilmiş ve juglon ile muamele edilmemiş (kontrol) örneklerde Polifenol Oksidaz enzimini kodlayan gen için ΔC_T değerleri hesaplandı. Ortalama değerler bulunup bu değerleri gösteren sütun grafiği çizildi.

Juglon ile muamele edilmemiş (kontrol) kökte PFO Gen İfadesi

$$2^{-\Delta CT} = 2^{-[34,20915-21,14698]} = 5,87554E-05$$

$$2^{-\Delta CT} = 2^{-[35,43509-21,13708]} = 0,0003489$$

$$\text{Ortalama} = 0,000203828$$

0,01 mM Juglon ile muamele edilmiş kökte PFO Gen İfadesi

$$2^{-\Delta CT} = 2^{-[32,12126-21,02855]} = 0,000217516$$

$$2^{-\Delta CT} = 2^{-[36,09639-20,61256]} = 0,000154952$$

$$\text{Ortalama} = 0,000186234$$

0,1 mM Juglon ile muamele edilmiş kökte PFO Gen İfadesi

$$2^{-\Delta CT} = 2^{-[34,12938-23,19177]} = 0,00060424$$

$$2^{-\Delta CT} = 2^{-[32,61299-21,68293]} = 8,61016E-05$$

$$\text{Ortalama} = 0,000345171$$

0,25 mM Juglon ile muamele edilmiş kökte PFO Gen İfadesi

$$2^{-\Delta CT} = 2^{-[34,45911-21,82798]} = 4,39036E-05$$

$$2^{-\Delta CT} = 2^{-[35,57442-21,09705]} = 1,91647E-05$$

$$\text{Ortalama} = 3,15342E-05$$

0,5 mM Juglon ile muamele edilmiş kökte PFO Gen İfadesi

$$2^{-\Delta CT} = 2^{-[33,72980-21,31957]} = 0,000106556$$

$$2^{-\Delta CT} = 2^{-[34,18564-21,66007]} = 5,93155E-06$$

$$\text{Ortalama} = 5,62438E-05$$

0,01 mM Juglon ile muamele edilmiş kökte PFO Gen İfadesi için Kat Değişimi =

$$0,000186234/0,000203828 = 0,91368$$

0,1 mM Juglon ile muamele edilmiş kökte PFO Gen İfadesi için Kat Değişimi =

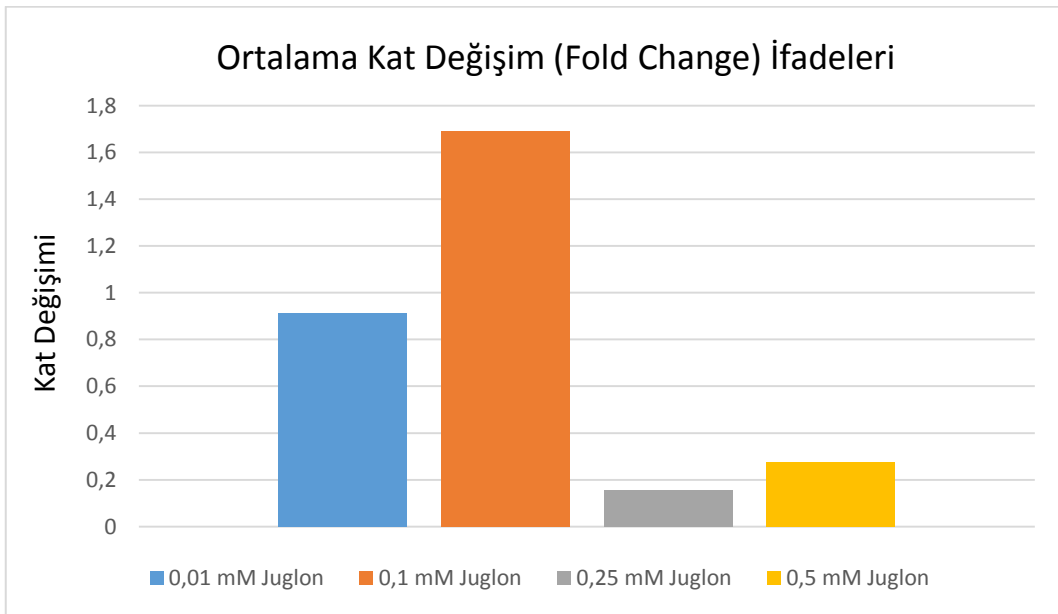
$$0,000345171/0,000203828 = 1,69345$$

0,25 mM Juglon ile muamele edilmiş kökte PFO Gen İfadesi için Kat Değişimi =

$$3,15342E-05/0,000203828 = 0,15471$$

0,5 mM Juglon ile muamele edilmiş kökte PFO Gen İfadesi için Kat Değişimi = $5,62438E-05/0,000203828 = 0,27594$

Hesaplanan bu değerleri içeren grafik Şekil 11'de gösterildi ve bu hesaplanan değerler kökte juglon uygulanan grupların kontrol grubuna göre kat değişimini ifade etmektedir. Bu grafiğe göre PFO'yu kodlayan genin nisbi gen ifadesinin kontrol grubuna kıyasla uygulanan 0,25 mM ve 0,5 mM juglon konsantrasyonlarında azalma gösterdiği belirlenmiş olup 0,01 mM ve 0,1 mM juglon uygulanan örnekte Polifenol oksidaz geninin ifadesinin kontrole göre arttığı, 0,1 mM juglon uygulandığında bu artışın yaklaşık 2 kat arttığı tespit edilmiştir [25].



Şekil 4. 11 PFO nun Kökte Nisbi Gen İfadeleri

Son olarak (Çizelge 4. 14) çalışılan tüm parametreler arasındaki ilişkiyi ve istatistiksel önemlilik durumlarını gösteren tablo hazırlandı. Bu aşamada SPSS istatistik programından yararlanıldı. Tekrar değerlerine göre yaprakta katekol oksidaz aktivitesi ile dopa oksidaz aktivitesi arasında, kökte katekol oksidaz aktivitesi ile dopa oksidaz aktivitesi arasında ** (P < 0,01) önem seviyesinde pozitif korelasyon; kökte Katekol oksidaz aktivitesi ile çimlenme verimi arasında, kökte dopa oksidaz aktivitesi ile çimlenme verimi arasında aynı önem seviyesinde negatif korelasyon tespit edildi. Aynı zamanda kök uzunluğu ile gövde uzunluğu arasında yaprakta polifenol oksidaz gen ifadesi ile kök uzunluğu arasında * (P < 0,05) önem seviyesinde pozitif korelasyon; kökte

Katekol oksidaz ile kök uzunluğu arasında, kökte dopa oksidaz aktivitesi ile kök uzunluğu arasında yine aynı önem seviyesinde negatif korelasyon tespit edildi.

Çizelge 4. 14 Juglonun etkileri bakımından salatalıkta büyüme parametreleri, PFO aktiviteleri ve gen ifadeleri arasındaki korelasyonlar

Parametreler	Kök Uzunluğu	Gövde Uzunluğu	Çimlenme Verimi	Katekol Oksidaz Yaprak	Katekol Oksidaz Kök	Dopa Oksidaz Yaprak	Dopa Oksidaz Kök	PPO Gen İfadesi Yaprak	PPO Gen İfadesi Kök
Kök Uzunluğu	1	0,711*	0,565	0,482	-0,674*	0,443	-0,703*	0,696*	0,330
Gövde Uzunluğu	0,711*	1	0,329	0,123	-0,611	0,184	-0,589	0,193	0,283
Çimlenme Yüzdesi	0,565	0,329	1	0,234	-0,903**	0,092	-0,926**	0,288	0,255
Katekol Oksidaz Yaprak	0,482	0,123	0,234	1	-0,121	0,970**	-0,091	0,579	0,354
Katekol Oksidaz Kök	-0,674*	-0,611	-0,903**	-0,121	1	-0,006	0,983**	-0,212	-0,220
Dopa Oksidaz Yaprak	0,443	0,184	0,092	0,970**	-0,006	1	0,017	0,575	0,319
Dopa Oksidaz Kök	-0,703*	-0,589	-0,926**	-0,091	0,983**	0,017	1	-0,290	-0,255
PPO Gen İfadesi Yaprak	0,696*	0,193	0,288	0,579	-0,212	0,575	-0,290	1	0,161
PPO Gen İfadesi Kök	0,330	0,283	0,255	0,354	-0,220	0,319	-0,255	0,161	1

** (P < 0,01), * (P < 0,05)

4.2. Tartışma

Juglonun salatalıkta tohum çimlenmesine etkisi hakkında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, dikkat çeken bir olumsuz veya olumlu etki görülmemektedir. Oysa salatalık fidelerinin kök ve gövde uzamaları juglon tarafından oldukça olumsuz etkilenmiştir. Bilhassa 0,25 ve 0,50 mM juglon konsantrasyonları hem kök hem de gövde uzamasını engellemiştir. Kök uzaması gövdeye göre daha olumsuz etkilenmiştir. Şöyle ki; 0,25 mM juglon kontrole göre yaklaşık %50 oranında ve 0,50 mM juglon ise %70 oranında kök uzamasını azaltmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda da buna benzer sonuçlar elde edilmiştir. 1 mM juglon uygulandığında salatalık tohumlarının çimlenmesi hafif bir azalma gösterirken fidelerin kök ve gövde uzamaları önemli derecede engellenmiştir (Kocaçalışkan ve Terzi 2001, Terzi ve ark. 2003, Kocaçalışkan ve ark. 2009, Terzi ve Kocaçalışkan 2010). Önceki

çalıřmalarda juglonun tek konsantrasyonu (1 mM) kullanılmıřtır. Bu çalıřmada ise daha dūřuk konsantrasyonlar çalıřıldıđı halde bazı konsantrasyonlarda benzer sonuçlar elde edilmiřtir. Dūřuk konsantrasyonlar olan 0,01 ve 0,1 mM juglonda fide būyūmesi olumsuz etkilenmemiř hatta olumlu etkilendiđi durumlar da olmuřtur. Dolayısıyla juglonun salatalıkta çimlenme ūzerine nōtr etki gōsterirken fide būyūmesi ūzerine etkisinin ise konsantrasyona bađlı olduđunu sōyleyebiliriz. řōyle ki; bu hususta 0,25 mM eřik konsantrasyon olarak belirlenmiř olup bu ve ūzeri juglon konsantrasyonları engelleyici etki, buna mukabil bunun ařađısındaki konsantrasyonlar ise ya nōtr yada būyūmeyi artırıcı etki gōstermektedir.

Yine juglon maddesinin sentezlendiđi ceviz ađaçlarının yaprak ūzūtleri salatalıđa uygulandıđında da juglon etkisine paralel sonuçlar elde edilmiřtir. Yođun ūzūtler fide būyūmesini engellerken seyreltik ūzūtler būyūmeyi artırıcı etki gōstermektedir (Kocaçalıřkan ve Terzi 2001). Juglon maddesi ceviz ađaının kōk hūcrelerinde toksik olmayan hidrojuglon formunda sentezlenmekte ve buradan ksilem borularıyla yapraklara tařınarak bir kısmı yaprakta birikirken bir kısmı da hidatodlardan dıřarı salgılanmaktadır. Havayla temas ettiđinde oksitlenerek juglona dōnūřen madde yaprak yūzeyinde birikip yađmurla yıkanarak toprađa geçmektedir. Dolayısıyla juglon cevizde en çok yapraklarda bulunmaktadır. Yaprak ūzūtlerinin uygulanmasıyla yapılan deneylerde de juglon uygulanmıř etkisi gōzlenmektedir (Kocaçalıřkan 2006).

Juglonun katekol okside eden polifenol oksidaz enzimi ūzerine etkisine baktıđımızda yapraklardaki enzimlerin daha çok etkilendiđi gōrūlmektedir. Yapraklarda her iki substrat ile ūlūlen enzim aktiviteleri 0,01 mM juglon uygulandıđında kontroldekine çok yakın bir deđer verirken ūst konsantrasyonlar enzim aktivitesini oldukça artırmıřtır. Kōkte ise kontrole gōre belirgin bir fark gōrūlmemiřtir. Yani juglon etkisinin kōkte nōtr olduđunu sōyleyebiliriz. Dopa okside eden polifenol oksidaz ise yaprakta būtūn juglon konsantrasyonlarınca aktivitesi artırılmıřtır. Kōkte sadece 0,50 mM juglon tarafından aktivite artıřı belirlenmiřtir. Diđer konsantrasyonların etkisi nōtr olmuřtur. Őnceki çalıřmalarda 1 mM gibi yūksek konsantrasyonda, ki bundan daha yūksek konsantrasyonda juglonu suda ōzmek mūmkūn olmamaktadır, uygulandıđında juglon polifenol oksidaz aktivitesini kontrole gōre önemli derecede arttırdıđı rapor edilmiřtir

(Terzi ve ark. 2003, Kocaçalışkan ve ark. 2009). Bu cihetle bu çalışma öncekileri büyük oranda desteklemektedir.

Juglonun polifenol oksidaz enziminin gen ifadeleri üzerine etkilerine baktığımızda; yaprakta polifenol oksidazın gen ifadesi kontrole göre juglon tarafından artırılmıştır. Ancak juglon konsantrasyonlarına göre artışın derecesi değişmektedir. En etkili konsantrasyon 0,1 mM juglon olup kontrole göre 6 kat artış sağlamıştır. Diğer konsantrasyonların etkileri buna göre çok daha düşüktür. Kökte ise PFO' yu kodlayan genin nisbi gen ifadesinin kontrol grubuna kıyasla uygulanan 0,25 mM ve 0,5 mM juglon konsantrasyonlarında azalma gösterdiği belirlenmiş olup 0,01 mM ve 0,1 mM juglon uygulanan örneklerde polifenol oksidaz geninin ifadesinin kontrole göre arttığı, 0,1 mM juglon uygulandığında bu artışın yaklaşık 2 kat arttığı tespit edilmiştir. Böylece hem yaprakta hem de kökte polifenol oksidaz enziminin gen ifadesi 0,1 mM juglon tarafından hatırı sayılır bir gen ifadesi artışı sağlamıştır. Bundan daha düşük ve daha yüksek konsantrasyonların etkisi zayıf olmuştur. Polifenol oksidaz aktivitesi ve gen ifadesinin juglon uygulanması sonucu oluşan bu değişiklikler, bitki büyümesinde doğrudan olmasa da dolaylı katkısı olan katekol, dihidroksifenil alanin, tirozin, kafeik asit, klorogenik asit gibi birçok fenolik maddeyi oksitleyerek azalmasına sebep olur.

Juglonun salatalıkta polifenol oksidaz gen ifadeleri üzerine etkileri hususunda daha önce çalışma yapılmamıştı. Fakat, juglon stres uygulanmış piriņ köklerinde ve mısır fidelerinde bazı genlerin ifadeleri üzerine çalışmalar yapılmıştır. Juglon stres uygulanmış piriņ köklerinde piriņ transkriptomunun geniş analizi yapılarak juglona maruz kalan piriņ köklerinde hücre büyümesi, hücre duvarı oluşumu, kimyasal detoksifikasyon, abiyotik stres yanıtı ve epigenез ile ilgili transkript gen düzeylerinde değişiklikler tespit edilmiş. Juglon ile muamele edilmiş piriņ köklerinin gen ekspresyon profili, absisik asit ve jasmonik asidin gen ekspresyon ifadesinin artmasını ve biyosentezini ve giberellik asitin inaktivasyonunu ortaya çıkarmıştır ve buna ek olarak iki kalsiyum bağımlı protein kinaz (CDPK), 6 mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) geni ve 1 MAPK geninin sentezlenmesini arttırmış ve CDPK benzeri bir kinaz ve MAPK'lerin aktivitelerini belirgin şekilde arttırmıştır (Chang 2011). Mısır fideleriyle yapılan çalışmada ise juglonun mısırın büyümesi ve gelişmesi üzerindeki allelokimyasal etki ve juglonun sebep olduğu oksidatif stres altındaki mısır fidelerinde Glutatyon Transferaz geninin (GstI) ekspresyon ifadesi

üzerine etkileri araştırılmış. Tohumlarına 5 farklı konsantrasyonda (0,01, 0,005, 0,001, 0,0005 ve 0,0001 mM) juglon uygulaması yapılarak 4- gün, 6-gün ve 8-gün olacak şekilde juglona maruz bırakılan mısır tohumlarından elde edilen birincil köklerde ve koleoptillerde GstI geninin ekspresyon ifadesine bakılmıştır. Kontrol tohumları ile karşılaştırıldığında allekimyasal strese maruz bırakılan tohumlarda zamana ve doza bağımlı olarak analiz edilen genin transkripsiyonel aktivitesinin değiştiği tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, 4-günlük juglon uygulaması analiz edilen genin önemli ölçüde eksprese olmasını sağlarken, 6- günlük ve 8-günlük juglon uygulamaları GstI geninin ekspresyonunu önemli ölçüde düşürdüğü gözlenmiştir. GstI geninin ekspresyonundaki bu azalmaya uzun süre strese maruz bırakılan mısır tohumlarındaki anti-oksidant savunma sisteminin kırılmasının yol açtığı belirtilmiştir (Sytykiewicz, 2011). Yapılan bu çalışmalara bakıldığında uygulanan juglon konsantrasyonunun ve uygulama süresinin farklılığı enzimlerin gen ifadesi üzerinde etkilerinde elde edilen sonuçları etkileyebileceğini ortaya koymuştur. Juglonun salatalıkta polifenol oksidaz gen ifadesi üzerine etkilerinde konsantrasyona bağlı olarak gen ifadesinde meydana değişiklik bu durum ile açıklanabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Kocaçalışkan, İ., (2006). Allelopati, 2. Baskı, Bizim Büro Basım Yayın
- [2] Stamp, N., (2003). "Out of the quagmire of plant defense hypotheses", The Quarterly Review of Biology, 78 (1): 23–55.
- [3] Inderjit, I., (1996). "Plant phenolics in allelopathy" Botanical Review, 62: 186-202.
- [4] Taiz, L. ve Zeiger, E., (2010). Plant Physiology, Chapter 13: 292-293.
- [5] Ercisli, S., Esitken, A., Turkkal, C. ve Orhan, E., (2005). "Allelopathic Effects of Juglone and Walnut Leaf Extracts on Yield, Growth, Chemical and PNE Compositions of Strawberry cv. Fern", Plant Soil Environment, 51(6): 283-287.
- [6] Terzi, I., Kocaçalışkan, I., Benlioğlu, O. ve Solak, K., (2003). "Effects of juglone on growth of cucumber seedlings with respect to physiological and anatomical parameters", Acta Physiologiae Plantarum, 25: 353-356.
- [7] Kocaçalışkan, İ. Ceylan M. ve Terzi, I., (2009). "Effects of juglone on seedling growth in intact and coatless seeds of cucumber (Cucumis sativus cv. Beith Alpha)", Scientific Research and Essay, 4: 39-41.
- [8] Rice, E. L., (1984). Allelopathy, Academic Press, Second Edition, New York.
- [9] Kocaçalışkan, İ., (2015). "Allelopatinin Bitki Fizyolojisindeki Yeri ve Önemi", I. Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu, 1-4 Eylül 2015, Erzurum
- [10] Rizvi, S.J.H., ve Rizvi, V., (1992). Allelopathy: Basic and Applied Aspect, Chapman and Hall, London.
- [11] Stamp, N., (2003). "Out of the quagmire of plant defense hypotheses", The Quarterly Review of Biology, The University of Chicago Press, 78(1): 23–55
- [12] Turan, E., (2003). Juglon'un kavun fidelerinde protein ve enzim parametreleri üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Kütahya.
- [13] Cosmulescu, S., Trandafir, I., Achim, G. ve Baci, A., (2011). "Juglone Content in Leaf and Green Husk of Five Walnut (Juglans regia L.) Cultivars", Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 39(1): 237-240.

- [14] Kocaçalışkan, I. ve Terzi, I., (2001). Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth, *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76: 436-440.
- [15] Lindroth, R.L., Anson, B.D. ve Weisbrod A.V., (1990). "Effects of protein and juglone on gypsy moths: growth performance and detoxification enzyme activity", *Journal of Chemical Ecology*, 16(8): 2533–2547.
- [16] Segura- Aguilar, J., Hakman, I. ve Rydström, J., (1992). "The effect of 5 OH-1,4 naphthoquinone on Norway spruce seeds during germination", *Plant Physiology*, 100(4): 1955-196.
- [17] Chen, L., Na-Shun, B.Y. ve Zhang, J., (2009). "Effect of juglone on the ultrastructure of human liver cancer BEL-7402 cells", *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 29(6): 1208–11.
- [18] Ji, Y.B., Qu, Z.Y. ve Zou, X., (2011). "Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway", *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63(1–2): 69–78.
- [19] Inbaraj, J.J. ve Chignell, C.F., (2004). "Cytotoxic Action of Juglone and Plumbagin: A Mechanistic Study Using HaCaT Keratinocytes", *Chemical Research in Toxicology*, 17(1): 55–62
- [20] Gökkaya, Ö., (2009). "Beyaz Kiraz Meyvesi (Starks Gold) Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniveristesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Adana.
- [21] Kocaçalışkan, I., Terzi, I. ve Ceylan, M., (2009). "Effects of Juglone on Seedling Growth in Intact and Coatless Seeds of Cucumber (*Cucumis sativus* cv. Beith Alpha)", *Scientific Research and Essay*, 4(1): 039-041.
- [22] Chang, C.W., (2011). "Identification of Transcriptome Profiles and Signaling Pathways for Allelochemical Juglone in Rice Roots", *Plant Molecular Biology*, 77(6): 591-607.
- [23] Sytykiewicz, H., (2011). "Expression Patterns of Glutathione Transferase Gene (GstI) in Maize Seedlings Under Juglone-Induced Oxidative Stress", *Internal Journal of Molecular Sciences*, 12(11): 7982-7995.
- [24] Schmittgen, T. D. ve Livak, K. J., (2008). "Analyzing Real Time PCR Data by the Comparative C_T Method", *Nature Protocols*, 3: 1101–1108.
- [25] Rao, X. ve Huang, X., (2013). "An Improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Data Analysis", *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, 3(3): 71-85.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Merve YALÇIN
Doğum Tarihi ve Yeri :16.02.1991/Trabzon
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :merveyalcin.01@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Teknik Üniversitesi	Ocak 2016
Lise	Sayısal	Tevfik Serdar Anadolu Lisesi	Haziran 2009

Bildiri

1. Juglonun Salatalıkta (*Cucumis sativus*) Dopa Oksidaz Aktivitesi Üzerine Etkileri, EJONS International Congress on Mathematic, Engineering and Natural Sciences – III, Nisan 21-22, 2018 Mardin/TÜRKİYE
2. Juglonun Salatalıkta (*Cucumis sativus*) Katalaz Enzimi Üzerine Etkileri, EJONS International Congress on Mathematic, Engineering and Natural Sciences – III, Nisan 21-22, 2018 Mardin/TÜRKİYE

Proje

1. Juglon Uygulanan Salatalık Fidelerinde Bazı Enzimlerin Aktivite ve Gen Anlatımlarının Analizi, BAP projesi (No: 2014-01-07-KAP01)