

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**KUMARİNİN MERCİMEK BİTKİSİ (*LENS CULINARIS* MEDİK)
ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK, BİYOKİMYASAL VE
GENOTOKSİK ETKİLERİ**

BURCU YÜKSEL

KOCAELİ 2017

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

KUMARİNİN MERCİMEK BİTKİSİ (*LENS CULINARIS* MEDİK)
ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK, BİYOKİMYASAL VE
GENOTOKSİK ETKİLERİ

BURCU YÜKSEL

Doç.Dr. Özlem AKSOY
Danışman, Kocaeli Üniv.

Prof.Dr. Fazıl ÖZEN
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

Doç.Dr. Filiz VARDAR
Jüri Üyesi, Marmara Üniv.

Doç.Dr. Gülden YILMAZ
Jüri Üyesi, Trakya Üniv.

Yrd.Doç.Dr. Sevgi TÜRKER KAYA
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.



.....



.....



.....



.....



.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 11/12/2017

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bitkiler yaşamları süresince biyotik ve abiyotik streslere maruz kalırlar. Biyotik ve abiyotik stres faktörleri bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal zararlar oluşturarak ürün nicelik ve niteliğini olumsuz yönde etkileyebilir. Bu araştırmada; tarım, tıp, boya ve gıda sanayii gibi farklı alanlarda kullanılan ve sekonder bileşik olan kumarin maddesinin model organizma olarak seçilen *L.culinaris* üzerindeki etki mekanizmalarının ortaya çıkarılması amaçlandı.

Doktora öğrenimimin tüm aşamalarında, bilgisi, tecrübesi ve sevgisi ile sürekli olarak desteğini ve ilgisini yanımda hissettiğim, hayata yaklaşımıyla da örnek aldığım tez danışmanım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Özlem AKSOY'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez izleme komitesi üyeleri Doç. Dr. Filiz VARDAR, Yrd. Doç. Dr. Sevgi TÜRKER KAYA, Prof. Dr. Fazıl ÖZEN ve Doç. Dr. Gülden YILMAZ hocalarıma, değerli katkı, öneri ve eleştirilerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca aldığım dersler aracılığıyla, eğitimime katkıda bulunan, Kocaeli Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünün tüm öğretim üyelerine, dostluk ve yardımlarından yararlandığım tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Real time PZR analizlerimiz sırasında desteklerini esirgemeyen sayın hocalarım Doç. Dr. Naci ÇİNE ve Yrd. Doç. Dr. Deniz SÜNNETÇİ AKKOYUNLU'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle bana güç veren, yanımda olan ve bana güvendikleri için çok sevgili anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince büyük bir sabırla bana her zaman destek ve yardımcı olan sevgili eşim Doç. Dr. Doğan YÜKSEL'e, kızlarım Zeynep Esma ve Zehra Ilgın'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Kocaeli Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Birimi BAP 2016/02 No'lu proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Aralık – 2017

Burcu YÜKSEL

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR | 1 |
| İÇİNDEKİLER | i |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | iv |
| TABLOLAR DİZİNİ | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | x |
| ÖZET | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| GİRİŞ | 1 |
| 1. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 1.1. <i>Lens culinaris</i> Medik. | 12 |
| 1.2. Kumarin | 15 |
| 2. LİTERATÜR ÇALIŞMASI | 20 |
| 3. MALZEME VE YÖNTEM | 34 |
| 3.1. Bitkisel materyalinin ve etken maddenin eldesi | 34 |
| 3.2. EC50 Belirleme | 34 |
| 3.3. Sitolojik Analizler | 36 |
| 3.3.1. Çimlenme yüzdesi ve kök uzunlukları değerleri | 36 |
| 3.3.2. Mitotik indeks ve kromozom anormalliğinin belirlenmesi | 36 |
| 3.4. Biyokimyasal Analizler | 37 |
| 3.4.1. Toplam protein analizi | 37 |
| 3.4.1.1. Reaktif hazırlanması | 37 |
| 3.4.1.2. Protein standardının hazırlanması | 37 |
| 3.4.1.3. Bitki örneklerinin spektrofotometrede protein içeriklerinin ölçülmesi | 39 |
| 3.4.2. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) | 40 |
| 3.4.3. Prolin tayini | 42 |
| 3.4.4. Lipid peroksidasyonu | 43 |
| 3.4.5. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) tayini | 43 |
| 3.4.6. α-Amilaz aktivitesinin Ölçülmesi | 44 |
| 3.4.7. Katalaz aktivitesinin Ölçülmesi | 46 |
| 3.4.8. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçülmesi | 47 |
| 3.5. Moleküler Analizler | 49 |
| 3.5.1. RAPD PZR analizleri | 49 |
| 3.5.1.1. Genomik DNA izolasyon protokolü | 49 |
| 3.5.1.2. DNA miktarı ve kalitesinin tayini | 50 |
| 3.5.1.3. RAPD PZR da kullanılan primerler | 50 |
| 3.5.1.4. RAPD PZR karışımı hazırlama ve RAPD PZR döngü optimizasyonunun belirlenmesi | 51 |
| 3.5.1.5. Agaroz jel elektroforezi | 52 |
| 3.5.1.6. RAPD PZR ürünlerinin rakamsal analizi | 52 |
| 3.5.1.7. Genomik kalıp kararlılığının (GKK, %) hesaplanması | 52 |
| 3.5.2. Real Time PZR analizleri | 53 |

| | |
|--|-----|
| 3.5.2.1. Total RNA izolasyonu | 53 |
| 3.5.2.2. cDNA (Komplementer DNA) sentezi..... | 54 |
| 3.5.2.3. Real-Time PZR da kullanılan primerler | 54 |
| 3.5.2.4. Real-Time PZR reaksiyonu | 55 |
| 4. BULGULAR..... | 58 |
| 4.1. EC50 Belirleme | 58 |
| 4.2. Sitolojik Analizler | 60 |
| 4.2.1. Çimlenme yüzdesi ve kök uzunlukları değerleri | 60 |
| 4.2.2. Mitotik indeks sonuçları | 64 |
| 4.2.3. Kromozom anormalliklerinin belirlenmesi..... | 66 |
| 4.3. Biyokimyasal Analizler | 72 |
| 4.3.1. Toplam protein analizi | 72 |
| 4.3.2. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)..... | 74 |
| 4.3.3. Prolin tayini | 77 |
| 4.3.4. Lipid peroksidasyonu..... | 79 |
| 4.3.5. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) tayini | 80 |
| 4.3.6. α-Amilaz aktivitesinin ölçülmesi..... | 81 |
| 4.3.7. Katalaz(CAT) aktivitesinin ölçülmesi | 84 |
| 4.3.8. Süperoksit Dismütaz (SOD; EC.1.15.1.1) aktivitesinin belirlenmesi | 85 |
| 4.4. Moleküler Analizler..... | 87 |
| 4.4.1. RAPD PZR Analizleri | 87 |
| 4.4.1.1. Genomik DNA ekstraksiyonu..... | 87 |
| 4.4.1.2. RAPD profilleri..... | 89 |
| 4.4.2. Real Time PZR | 98 |
| 4.4.2.1. RNA ekstraksiyonu..... | 98 |
| 4.4.2.2. RT PZR için standart grafiğinin çizilmesi | 99 |
| 4.4.2.3. CAT geninin ifade düzeyi..... | 101 |
| 4.4.2.4. Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyi | 105 |
| 4.4.2.5. Mn-SOD geninin ifade düzeyi | 110 |
| 5. TARTIŞMA | 116 |
| 5.1. EC50 Belirlenmesi..... | 116 |
| 5.2. Sitolojik Analizler | 117 |
| 5.2.1. Kumarinin çimlenme yüzdesi ve kök uzunlukları değerleri üzerine etkileri | 117 |
| 5.2.2. Kumarinin mitotik indeks üzerine etkileri..... | 120 |
| 5.2.3. Kumarinin hücre bölünmesi ve kromozom anormallikleri üzerine etkileri | 122 |
| 5.3. Biyokimyasal Analizler | 125 |
| 5.3.1. Kumarinin toplam protein miktarı üzerine etkileri..... | 125 |
| 5.3.2. Kumarinin SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) profillerine olan etkisi..... | 126 |
| 5.3.3. Kumarinin prolin miktarı üzerine etkisi | 128 |
| 5.3.4. Kumarinin lipid peroksidasyon üzerine etkisi | 130 |
| 5.3.5. Kumarinin hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarı üzerine olan etkisi..... | 131 |
| 5.3.6. Kumarinin α-amilaz aktivitesi üzerine etkisi..... | 133 |
| 5.3.7. Kumarinin katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) aktivitesine etkisi..... | 136 |
| 5.3.8. Kumarinin süperoksit dismütaz (SOD; EC.1.15.1.1) | |

| | |
|--|-----|
| aktivitesine etkisi | 138 |
| 5.4. Moleküler Analizler..... | 141 |
| 5.4.1. Kumarinin RAPD PZR analizlerine olan etkisi..... | 141 |
| 5.4.2. <i>L.culinaris</i> 'de Real Time PZR analizleri ile kumarinin etkisinin belirlenmesi | 145 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 149 |
| KAYNAKLAR | 154 |
| EKLER..... | 179 |
| KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER | 181 |
| ÖZGEÇMİŞ | 182 |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| | | |
|-------------|---|----|
| Şekil 1.1. | Major sekonder maddelerin biyosentez yolları | 5 |
| Şekil 1.2. | Alleokimyasalların bitkiler üzerindeki mekanizması..... | 8 |
| Şekil 1.3. | α - piron, γ -piron ve kumarin bileşikleri | 16 |
| Şekil 1.4. | Sinamik asitten kumarin oluşumu | 17 |
| Şekil 2.1. | Bazı allelopatik kumarinlerin yapıları..... | 20 |
| Şekil 3.1. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> tohumlarında EC50 ve 2x EC50 değeri belirlenirken kurulan deney düzeneği | 35 |
| Şekil 3.2. | Konsantrasyonları bilinen BSA çözeltilerinin 595 nm dalga boyundaki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik | 39 |
| Şekil 3.3. | Prolin içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart eğri grafiği..... | 42 |
| Şekil 3.4. | Hidrojen Peroksit içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği | 44 |
| Şekil 3.5. | Alfa amilaz aktivitesini belirlemede kullanılan nişasta standart grafiği | 46 |
| Şekil 3.6. | Bio RAD CFX Connect™ Real-Time PZR Detection System marka ısıt-döngü cihazı | 56 |
| Şekil 3.7. | cDNA seri dilüsyonlarının oluşturulması..... | 57 |
| Şekil 4.1. | EC50 değeri belirlendikten sonra kontrol grubu ve EC50 ve 2xEC50 kumarin konsantrasyonları ile kurulan deney düzeneği..... | 58 |
| Şekil 4.2. | <i>L.culinaris</i> bitkisinde kumarin için hesaplanan 72 saatlik probit değerleri ve regresyon grafiği | 59 |
| Şekil 4.3. | <i>L.culinaris</i> bitkisinde kumarin için hesaplanan 72 saatlik farklı dozlara ait çeşitli istatistiksel değerler. | 60 |
| Şekil 4.4. | Kontrol grubu ve artan kumarin konsantrasyonlarının <i>L.Culinaris</i> tohumları üzerindeki kumarin uygulaması sonucunda çimlenme yüzdesi değerleri. | 61 |
| Şekil 4.5. | Kontrol ve kumarin uygulaması sonucunda doz ve saat dilimlerine göre ortalama <i>L.culinaris</i> 'de kök uzunluklarındaki değişimler. | 63 |
| Şekil 4.6. | Kontrol grubu ve artan kumarin konsantrasyonlarının 3.,5. ve 7. Gün sonundaki <i>L.culinaris</i> kökleri üzerine olan etkileri..... | 64 |
| Şekil 4.7. | Farklı kumarin konsantrasyonlarının <i>L.culinaris</i> kök ucu hücrelerindeki mitotik indekse etkileri..... | 66 |
| Şekil 4.8. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanan <i>L.culinaris</i> kök ucu hücrelerinde 48 ve 72 saatlik bölünme evrelerinde anormal hücrelerin ortalama sayıları | 68 |
| Şekil 4.9. | Kontrolde (Hoagland çözeltisi) çimlendirilen <i>L.culinaris</i> kök ucu hücrelerinde kromozom anormallikleri a- kalgın kromozom, düzensiz metafaz ve metafazda ekvator düzleminde kayma,b- Yapışık kromozom c- Kromozom ipliği ve Düzensiz profaz,d- Anafazda köprü oluşumu,e-Kalgın kromozom, f-Düzensiz metafaz, g-Tabla kayması,h- Kalgın kromozom..... | 71 |
| Şekil 4.10. | 300ppm(EC50) kumarin konsantrasyonunda çimlendirilen <i>L.culinaris</i> kök ucu hücrelerinde meydana gelen kromozom anormallikleri a- Nekrotik hücre, b- Kromozom yapışması, c-Kalgın kromozom, d- Multipolarite ve Tabla kayması, e ve f - Nekrotik | |

| | | |
|-------------|---|----|
| | hücre ,g-Kalgın kromozom ve kromozom granülasyonu h-geri kalmış kromozom..... | 71 |
| Şekil 4.11. | 600 ppm(2xEC50) kumarin konsantrasyonunda çimlendirilen <i>L.culinaris</i> kök ucu hücrelerinde kromozom anormallikleri a- C-mitoz, b-Hücre duvar deformasyonu, c ve d- Nekrotik hücre ,e-Hücre duvar deformasyonu, f-C-mitoz ,g-Kromozom ipliği ve kalgın kromozom, h-Kromozom granülasyonun | 72 |
| Şekil 4.12. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> tohumlarında 48. ve 72. saat sonrasında total protein miktarları..... | 73 |
| Şekil 4.13. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> tohumlarındaki 48.ve 72. saat SDS-PAGE sonrası oluşan toplam proteinlere ait bant profilleri(K-48; Kontrol 48 saatlik,300-48;300 ppm kumarin 48 saatlik,600-48; 600 ppm kumarin 48 saatlik, K-72; Kontrol 72 saatlik,300-72;300 ppm kumarin 72 saatlik,600-72; 600 ppm kumarin 72 saatlik örnekler)..... | 74 |
| Şekil 4.14. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> tohumlarındaki 48.ve 72 saat sonrasında SDS-PAGE ile gözlenen toplam proteinlere ait ortalama moleküler ağırlık verileri | 75 |
| Şekil 4.15. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> tohumlarındaki 48.ve 72. saat sonrasında SDS-PAGE ile elde edilen protein bant profillerinin uygulama grupları için ayrı değerlendirilmesi ile elde edilen dendogram | 77 |
| Şekil 4.16. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> köklerindeki 72. saat sonrasında ölçülen prolin miktarları | 78 |
| Şekil 4.17. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> köklerindeki 72. saat sonrasında ölçülen MDA miktarları..... | 79 |
| Şekil 4.18. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> köklerindeki 72. saat sonrasında ölçülen H ₂ O ₂ miktarları..... | 80 |
| Şekil 4.19. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> tohumlarında 48. ve 72. saat sonrasında ölçülen nişasta miktarları | 82 |
| Şekil 4.20. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> tohumlarında 48. ve 72. saat sonrasında ölçülen Alfa amilaz aktivitesinin değerleri | 83 |
| Şekil 4.21. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> köklerindeki 72.saat sonrasında saptanan Katalaz aktivitesinin değerleri | 85 |
| Şekil 4.22. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> köklerindeki 72.saat sonrasında saptanan SOD aktivitesinin değerleri..... | 86 |
| Şekil 4.23. | İzole edilen gDNA örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü (M: Marker 1 kb DNA standartı, K: Kontrol, 300: EC50 değeri(300 ppm), 600:2x EC50 değeri (600 ppm) | 89 |
| Şekil 4.24. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> genomik DNA'larından OPA01, OPA02, OPA03, OPA04, OPA05,OPA06, OPA07, OPA08, OPA09 ,OPA10 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri. [M:, GeneRuler 50bp Thermo Fischer,K:kontrol(Hoagland), 300;300 ppm (EC50) kumarin, 600:600 ppm (2×EC50) kumarin | 90 |
| Şekil 4.25. | Çalışmada kullanılan primerlerle uygulama gruplarına ait elde edilen monomorfik ve polimorfik primer sayıları. 300;300 ppm (EC50) kumarin, 600:600 ppm (2×EC50) kumarin | 93 |
| Şekil 4.26. | Kullanılan RAPD primerlerinin polimorfizm yüzdeleri | 93 |

| | |
|--|-----|
| Şekil 4.27. 300ppm ve 600ppm uygulamalarının <i>L.culinaris</i> kökleri üzerinde olusturduğu genetik polimorfizmi gösteren dendogram. [not: parantez içerisindeki rakamlar kontrole göre her bir uygulama grubu için hesaplanan genetik benzerlik katsayılarını göstermektedir.] | 97 |
| Şekil 4.28. Real Time (RT-PZR) PZR tekniğinin standart eğrisi. | 100 |
| Şekil 4.29. Kontrol GAPDH, kontrol CAT,300 ppm GAPDH, 300 ppm CAT ve 600 ppm GAPDH ,600 ppm CAT örneklerine ait melt curve grafiği | 101 |
| Şekil 4.30. Kontrol GAPDH, kontrol CAT,300 ppm GAPDH, 300 ppm CAT ve 600 ppm GAPDH ,600 ppm CAT örneklerine ait melt peak grafiği | 102 |
| Şekil 4.31. Kontrol GAPDH, kontrol CAT,300 ppm GAPDH, 300 ppm CAT ve 600 ppm GAPDH ,600 ppm CAT örneklerine ait amplifikasyon grafiği | 102 |
| Şekil 4.32. REST programı ile elde edilen CAT geninin ifade düzeyinin grafiksel gösterimi | 105 |
| Şekil 4.33. Kontrol GAPDH, kontrol Cu/Zn-SOD,300 ppm GAPDH, 300 ppm Cu/Zn-SOD ve 600 ppm GAPDH ,600 ppm Cu/Zn-SOD örneklerine ait melt curve grafiği | 106 |
| Şekil 4.34. Kontrol GAPDH, kontrol Cu/Zn-SOD,300 ppm GAPDH, 300 ppm Cu/Zn-SOD ve 600 ppm GAPDH ,600 ppm Cu/Zn-SOD örneklerine ait melt peak grafiği | 106 |
| Şekil 4.35. Kontrol GAPDH, kontrol Cu/Zn-SOD,300 ppm GAPDH, 300 ppm Cu/Zn-SOD ve 600 ppm GAPDH ,600 ppm Cu/Zn-SOD örneklerine ait amplifikasyon grafiği | 107 |
| Şekil 4.36. REST programı ile elde edilen Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyinin grafiksel gösterimi | 110 |
| Şekil 4.37. Kontrol GAPDH, kontrol Mn-SOD,300 ppm GAPDH, 300 ppm Mn-SOD ve 600 ppm GAPDH ,600 ppm Mn-SOD örneklerine ait melt curve grafiği | 111 |
| Şekil 4.38. Kontrol GAPDH, kontrol Mn-SOD,300 ppm GAPDH, 300 ppm Mn-SOD ve 600 ppm GAPDH ,600 ppm Mn-SOD örneklerine ait melt peak grafiği | 111 |
| Şekil 4.39. Kontrol GAPDH, kontrol Mn-SOD ,300 ppm GAPDH, 300 ppm Mn-SOD ve 600 ppm GAPDH ,600 ppm Mn-SOD örneklerine ait amplifikasyon grafiği | 112 |
| Şekil 4.40. REST programı ile elde edilen Mn-SOD geninin ifade düzeyinin grafiksel gösterimi | 115 |
| Şekil 5.1. Bitki hücresinde SOD yerleşimleri | 139 |
| Şekil 5.2. Real Time PZR cevap egrileri | 146 |

TABLolar DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1.1. Kumarin ve Türevlerinin Biyolojik Aktiviteleri | 19 |
| Tablo 3.1. Protein standardı oluşturma düzeneği | 38 |
| Tablo 3.2. Protein konsantrasyon ve absorbans değerleri | 38 |
| Tablo 3.3. Toplam protein izolasyon tamponunun içeriği..... | 39 |
| Tablo 3.4. SDS-PAGE için kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanışı | 41 |
| Tablo 3.5. SOD miktarının belirlenmesinde kullanılan substratın içeriği..... | 48 |
| Tablo 3.6. Çalışmada kullanılan OPA serisi RAPD primerlerinin dizileri, Tm değerleri,G+C içerikleri | 50 |
| Tablo 3.7. RAPD PZR tekniğinde kullanılan bileşenler | 51 |
| Tablo 3.8. Optimize edilen RAPD PZR döngüsü..... | 51 |
| Tablo 3.9. cDNA sentez prosedürü | 54 |
| Tablo 3.10. Real-Time PZR primer dizileri | 55 |
| Tablo 3.11. Real-Time PZR çalışmasında optimize edilen ve kullanılan protokol | 56 |
| Tablo 3.12. Real Time PZR reaksiyonunun gerçekleştirildiği program..... | 57 |
| Tablo 4.1. Kumarinin <i>L.culinaris</i> bitkisine etkisinin EC değerleri | 59 |
| Tablo 4.2. EC50 değeri belirlenirken kumariin farklı konsantrasyonlarının <i>L.culinaris</i> tohumlarının çimlenme sayıları üzerine etkileri (72h) | 61 |
| Tablo 4.3. Kullanılan doza göre farklı saatlerdeki kök uzunluklarının ortalama ve standart sapmaları..... | 62 |
| Tablo 4.4. Kullanılan doza göre toplam kök uzunluklarının ortalama ve standart sapmaları..... | 63 |
| Tablo 4.5. Farklı kumarin konsantrasyonlarının <i>L.culinaris</i> kök ucu hücrelerindeki mitotik indekse etkileri..... | 65 |
| Tablo 4.6. Farklı kumarin konsantrasyonlarının <i>L.culinaris</i> kök ucu hücrelerindeki mitotik indeks üzerindeki etkilerini gösteren ANOVA tablosu..... | 65 |
| Tablo 4.7. Kontrol ve farklı kumarin konsantrasyonlarının <i>L.culinaris</i> kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme evrelerine ait ortalama sayıları ve yüzdelik verileri (N:Normal bölünen hücreler, A;Anormal bölünen hücreler, %;yüzdelik veriler)..... | 67 |
| Tablo 4.8. <i>L.culinaris</i> kök hücrelerinde kontrol grubu ve kumarin konsantrasyonlarının etkisiyle ortaya çıkan kromozom hasarı çeşitleri ve oranları | 69 |
| Tablo 4.9. <i>L.culinaris</i> kök hücrelerinde farklı sürelerde kontrol grubu ve kumarin muamelesinin etkisiyle ortaya çıkan mitotik indeks yüzdeleri, anormal mitoz oranları ve her bir bölünme evresindeki hücre sayıları | 70 |
| Tablo 4.10. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> tohumlarındaki 48.ve 72 saat protein miktarlarının ortalama değerleri ve istatikselsel veriler. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p<0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır..... | 73 |
| Tablo 4.11. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> tohumlarındaki 48.ve 72. saat sonrasında oluşan moleküler ağırlık değerlerinin | |

| | | |
|-------------|---|-----|
| | ortalama ve istatistiksel verileri. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır | 76 |
| Tablo 4.12. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> köklerindeki 72. saat sonrasında oluşan prolin miktarlarının ortalama değerleri. | 78 |
| Tablo 4.13. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> köklerindeki 72. saat sonrasında oluşan MDA miktarlarının ortalama değerleri ve istatistiksel verileri. | 80 |
| Tablo 4.14. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> tohumlarındaki 72. saat sonrasında oluşan H_2O_2 miktarlarının ortalama değerleri ve istatistiksel verileri. | 81 |
| Tablo 4.15. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> tohumlarındaki 48. ve 72. saat sonrasında oluşan nişasta konsantrasyonunun ve alfa amilaz aktivitesinin ortalama değerleri ve istatistiksel verileri..... | 814 |
| Tablo 4.16. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> köklerinde 72.saat sonrasında saptanan katalaz aktivitesi ortalama değerleri ve istatistiksel verileri. | 85 |
| Tablo 4.17. | Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> köklerinde 72.saat sonrasında saptanan SOD aktivitesi ortalama değerleri ve istatistiksel verileri. | 86 |
| Tablo 4.18. | İzole edilen gDNA örneklerinin konsantrasyon değerleri ve saflık miktarları | 88 |
| Tablo 4.19. | Her bir uygulama örneği için 10 primerle belirlenen DNA bantlarının moleküler ağırlıkları ve kontrole (K (Hoagland)) göre,300; 300 ppm (EC50) kumarin, 600; 600 ppm ($2 \times EC50$) kumarin uygulamalarında mevcut "1" ve kayıp "0" bantlar. | 91 |
| Tablo 4.20. | Uygulama gruplarına göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren RAPD primerlerinin listesi. 300; 300 ppm(EC50) kumarin, 600; 600 ppm ($2 \times EC50$) kumarin..... | 92 |
| Tablo 4.21. | RAPD çalışmalarında kullanılan primerler, primer sekansları, her bir primerle elde edilmiş DNA moleküler ağırlıkları,Toplam çoğaltılmış bant sayıları, monomorfik ve polimorfik DNA bant sayıları. | 94 |
| Tablo 4.22. | RAPD primerlerinin çoğaltılması sonucu kontrolde elde edilen toplam bant sayıları ve polimorfik bant veren primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantlarının moleküler büyüklüğü..... | 96 |
| Tablo 4.23. | RAPD bulgularına göre 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulamaları sonucunda PAST programında hesaplanmış olan (Nei, 1978) genetik benzerlik katsayıları. | 97 |
| Tablo 4.24. | 300ppm ve 600 ppm kumarin uygulanmış <i>L.culinaris</i> tohumlarında 8 RAPD primeri için hesaplanmış genomik kalıp kararlılık değerleri (GKK, %). | 98 |
| Tablo 4.25. | İzolasyonu yapılan RNA 'lara ait saflık ve miktar tayinler | 99 |
| Tablo 4.26. | Real-Time PZR testinde standart eğri grafiği oluşturmak için kullanılan cDNA sulandırma oranları ve reaksiyon sonucunda elde edilen Cq değerleri | 100 |
| Tablo 4.27. | CAT ve GAPDH genine ait Real-Time PZR cihazından alınan tüm Cq değerleri (Çalışma 3 biyolojik tekrar içerdiği için her bir örnek için 3 adet Cq değeri bulunmaktadır)..... | 103 |

| | |
|--|-----|
| Tablo 4.28. CAT ve GAPDH genine ait Real-Time PZR cihazından alınan tüm Cq değerlerinin ortalamaları, standart sapma, standart hata ve kontrole göre olan istatistiksel analiz sonuçları | 104 |
| Tablo 4.29. REST programı ile elde edilen CAT geninin ifade düzeyi | 104 |
| Tablo 4.30. Cu/Zn-SOD ve GAPDH genine ait Real-Time PZR cihazından alınan tüm Cq değerleri (Çalışma 3 biyolojik tekrar içerdiği için her bir örnek için 3 adet Cq değeri bulunmaktadır) | 108 |
| Tablo 4.31. Cu/Zn-SOD ve GAPDH genine ait Real-Time PZR cihazından alınan tüm Cq değerlerinin ortalamaları, standart sapma, standart hata ve kontrole göre olan istatistiksel analiz sonuçları | 109 |
| Tablo 4.32. REST programı ile elde edilen Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyi | 109 |
| Tablo 4.33. Mn-SOD ve GAPDH genine ait Real-Time PZR cihazından alınan tüm Cq değerleri (Çalışma 3 biyolojik tekrar içerdiği için her bir örnek için 3 adet Cq değeri bulunmaktadır) | 113 |
| Tablo 4.34. Mn-SOD ve GAPDH genine ait Real-Time PZR cihazından alınan tüm Cq değerlerinin ortalamaları, standart sapma, standart hata ve kontrole göre olan istatistiksel analiz sonuçları | 114 |
| Tablo 4.35. REST programı ile elde edilen Mn-SOD geninin ifade düzeyi | 114 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-----|----------------------|
| Abs | : Absorbans değeri |
| bp | : Baz çifti |
| dk | : Dakika |
| M | : Molarite |
| ml | : Mililitre |
| mm | : Milimetre |
| mM | : Milimolar |
| mg | : Miligram |
| µg | : Mikrogram |
| µl | : Mikrolitre |
| ppm | : Milyonda bir kısım |
| Sn | : Saniye |
| U | : Unit/birim |
| °C | : Santigrat derece |
| % | : Yüzde |

Kısaltmalar

| | |
|-------------------------------|---|
| BSA | : Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albümin) |
| BHT | : Butil Hidroksi Toluen |
| CAT | : Catalase (Katalaz) |
| Cu-ZnSOD | : Bakır-Çinko Süperoksit Dismütaz |
| dNTP | : Deoxynucleotide Triphosphate (Deoksinükleotit Trifosfat) |
| EC50 | : Effective Concentration 50 (Ortalama Etkili Seviye) |
| EDTA | : Etilen Diamin Tetra Asetikasit |
| FeSOD | : Demir Süperoksit Dismütaz |
| GAPDH | : Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrogenaz) |
| GKK | : Genomik Kalıp Kararlılığı |
| H ₂ O ₂ | : Hidrojen Peroksit |
| MDA | : Malondialdehit |
| MnSOD | : Mangan Süperoksit Dismütaz |
| MN | : Mikronükleus |
| MI | : Mitotik İndeks |
| mRNA | : Mesajcı Ribo Nükleik Asit |
| NADPH | : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat) |
| NBT | : Nitro Blue Tetrazolium (Nitro Mavi Tetrazolyum) |
| NCBI | : National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) |
| PBS | : Phosphate Buffer Solution (Fosfat Tampon Solüsyonu) |
| PZR | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| RAPD | : Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNAO) |

REST : Relative Expression Software Tool
ROT : Reaktif Oksijen Türleri
RT : Real Time (Gerçek Zamanlı)
SDS : Sodyum Dodesil Sülfat
SPSS : Statistical Package for the Social Sciences (Sosyal Bilimler İçin İstatistik Paketi)



KUMARİNİN MERCİMEK BİTKİSİ (*LENS CULINARIS* MEDİK) ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK, BİYOKİMYASAL VE GENOTOKSİK ETKİLERİ

ÖZET

Bu araştırmada; tarım, tıp, boya ve gıda sanayii gibi alanlarda kullanılan ve sekonder bir bileşik olan kumarin maddesinin, model organizma olarak seçilen *Lens culinaris* Medik. üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlandı. Bunun için deney gruplarının çimlenme yüzdeleri hesaplandı, kök uzunlukları ölçüldü, çimlenen ve çimlenmeyen tohum sayıları belirlenerek, Probit analizi ile EC50 değeri belirlendi. 72 saatlik uygulama sonucunda, probit analizine göre EC50 değeri kumarin için 278,86 ppm olarak bulundu. Ölçümlerin daha kolay yapılabilmesi için alt ve üst sınır aralığında bulunan 300 ppm değeri EC50 değeri olarak alındı. Saptanan EC50 değeri ve EC50x2 (600 ppm) olmak üzere iki farklı konsantrasyon ve kontrol grubu olarak Hoagland çözeltisi ile deneyler yapıldı. Sitolojik çalışmalarda, örneklerin mitotik indeks yüzdeleri hesaplandı ve kromozom anormallikleri belirlendi. Kontrol ile karşılaştırıldığında, artan kumarin konsantrasyonunun mitotik indeksi azalttığı, kromozomal anormalliklere sebep olduğu gözlemlendi. Biyokimyasal çalışmalarda, deney gruplarının çözünebilir protein miktarı ve SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) ile protein bant profilleri belirlendi. Prolin, lipid peroksidasyonu ve hidrojen peroksit miktarlarının yanısıra α -amilaz, CAT (katalaz) ve SOD (süpeoksit dismutaz) enzim aktiviteleri de incelendi. Sonuçlar, kontrol ile karşılaştırıldığında, protein konsantrasyonunun EC50x2'de arttığı ve SDS-PAGE ile yapılan analizler sonucunda, bant profillerinde farklılık oluştuğu, Malondialdehit, prolin miktarlarında artma, H₂O₂ miktarında ve katalaz aktivitesinde önce azalma sonra artma belirlendi. SOD ve α -amilaz aktivitesinde ise azalma tespit edildi. Moleküler çalışmalarda, kumarinin genotoksik etkilerini belirlemek için RAPD ve Real Time PZR teknikleri kullanıldı. RAPD analizlerinde uygulanan kumarin maddesinin doza bağlı olarak bant profillerinde polimorfizm artışına ve genomik kalıp stabilitesi oranında azalmaya neden olduğu tespit edildi. Real Time PZR analizlerinde abiyotik stresle ilişkili olan (CAT, Cu/Zn SOD ve Mn SOD) 3 farklı genin anlatımı incelendi. Kumarin stresinin CAT ve Cu/Zn SOD genlerinin anlatımını azalttığı buna karşın Mn SOD anlatımında hem artma ve hem de azalma tespit edildi. Kumarinin; sitotoksik, genotoksik ve biyokimyasal hasarlar oluşturduğu belirlendi. Bu tez, kumarin stresi altında yetiştirilen *L.culinaris* bitkisinin sitolojik, biyokimyasal ve genotoksik açıdan araştırıldığı ilk detaylı çalışmadır.

Anahtar kelimeler: Genotoksik Etki, Kumarin, *L.culinaris*, RT PZR.

DETERMINATION OF CYTOTOXIC, BIOCHEMICAL, AND GENOTOXIC EFFECTS OF COUMARIN ON LENTIL (*LENS CULINARIS* MEDIC)

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects mechanisms of the coumarin, which is a secondary compound in plants used in different fields such as agriculture, medicine, dye and food industry, on *L. culinaris* Medik. Germination percentages of the experimental groups were calculated, root lengths were measured, germinated and ungerminated seed were counted, and EC50 value was determined by Probit analysis. As a result of 72 hours of application, the EC50 value for coumarin was determined as 278,86 ppm based on the probit analysis. In order to make the measurements easier, the EC50 value was taken as 300 ppm, which is between the lower and upper limit. Experiments were carried out with two different concentrations, the EC50 value and the EC50x2 (600 ppm), and the Hoagland solution was used as the control group. In cytological studies, mitotic index percentages of samples were calculated and chromosomal abnormalities were detected. Compared with the control, it was observed that the increasing concentration of coumarin decreased the mitotic index and caused chromosomal abnormalities. In biochemical studies, protein band profiles were determined by the amount of soluble protein in the experimental groups and by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Proline, lipid peroxidation and hydrogen peroxide quantities as well as α -amylase, CAT (catalase) and SOD (superoxide dismutase) enzyme activities were investigated. The results of the study showed that protein concentration increased at EC50x2 and analysis by SDS-PAGE revealed differences in band profiling, increased amounts of MDA, proline, a decrease in H₂O₂ and a decrease in catalase activity when compared to the control. A decrease in SOD and α -amylase activity was detected. In molecular studies, RAPD and Real time PZR techniques were used to determine the genotoxic effects of coumarin. It was determined that the coumarin we applied in the RAPD analysis caused polymorphism and increased the band profiles due to the polysaccharide and decrease in genomic pattern stability. In Real Time PZR analysis, three different genetic expressions related to abiotic stress (CAT, Cu / Zn SOD and Mn SOD) were examined. Coumarin stress reduced the expression of CAT and Cu / Zn SOD genes where both an increase and decrease of the expression of Mn SOD was detected. The results also revealed that coumarin caused cytotoxic, genotoxic and biochemical damages. This study is the first detailed investigation of the effects of *L.culinaris* plant grown under coumarin stress in terms of cytological, biochemical and genotoxic analysis.

Key words: Genotoxic Effects, Coumarin, *L.culinaris*, RT PZR.

GİRİŞ

Bitki bileşenleri buldukları habitatlardaki farklı populasyonlara etki ederek bitkilerin habitatlarını seçmelerini büyük oranda etkilerler. Bu tür bileşiklere alleopatik bileşikler denir. Belirli miktarlarda inhibitör etki gösterebilen bu bileşiklerin etki mekanizmaları fizyolojik, sitotoksik ya da genetiksel bir değişim oluşturabilir. Rekabete girdikleri canlıların DNA'sında meydana getirecekleri kalıtsal varyasyonlar populasyonların zayıflamasına veya yok olmasına neden olabilir. Bitkiler ortaya çıkan olumsuz etkileri en aza indirmek ya da tamamen engellemek için moleküler savunma mekanizmalarına başvururlar. Bu bitki bileşenleri besinsel olarak tüketildiklerinde ise canlı da benzer olumsuz sonuçlar doğurabilirler. Bu araştırmada; tarım, tıp, boya, kozmetik ve gıda sanayii gibi farklı alanlarda kullanılan ve sekonder bileşik olan kumarin maddesinin model organizma olarak seçilen *L. culinaris* Medik. üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılması planlandı.

Bu tez ile; bitkilerde sekonder bileşikler olarak ortaya çıkan kumarinin ekonomik ve besin değeri yüksek olan *L. culinaris* Medik. üzerindeki çimlenme ve çimlenme parametreleri üzerine yapmış olduğu etki ölçüldü. Bu sonuçlar kullanılarak tıptan kimyaya, ekonomiden sosyal bilimlere sıklıkla kullanılan; aralarında sebep - sonuç ilişkisi bulunduğu varsayılan iki veya daha fazla değişken arasındaki ilişkiyi inceleyerek modelleyen istatistiksel bir analiz metodu olan probit analizi ile EC50 değerleri tespit edildi. Artan kumarin konsantrasyonlarının mitotik indeks üzerine ve kromozom anormalliklerine olan etkilerinin tespiti yapıldı. Biyokimyasal çalışmalarda total protein miktarı, H₂O₂ konsantrasyonlarındaki değişikliğine ve alfa amilaz, katalaz, süperoksit dismutaz enzim aktivitelerinin değişimleri incelendi. Bitkilerde stresin öncelikli hedefi olan membranlardaki etkileri lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit analizleri ile tespit edildi. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak malondialdehidin tiyobarbütirik asit ile yaptığı kompleksin miktarından lipid peroksidasyon değişimleri hesaplandı ve ayrıca yine stres koşullarında artış gösteren bir amino asit olan prolin konsantrasyonundaki değişim belirlendi. Ayrıca tohumda total protein

miktarlarındaki değişimleri belirlemek amacıyla SDS-PAGE analizi yapıldı. Genomik DNA'da oluşabilecek polimorfizmin saptanması için RAPD-PZR primerleri uygulandı. Çalışmamızın en son aşamasında Real Time PZR uygulaması ile katalaz, Cu/Zn-SOD ve Mn-SOD enzimlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri belirlendi. Bu genlerle ilgili olarak, kumarinin söz konusu enzimler üzerine bir etkiye sahip olup olmadığı konusunda literatürde yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Bu çalışma sonucunda ekonomik değeri olan ve çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılan kumarinin model organizma olan *L. culinaris* Medik üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve biyokimyasal etkileri ilk defa araştırıldı. Ayrıca allelopatik kimyasal olan bu bileşiğin hücrel ve moleküler etki mekanizmalarının ortaya çıkarılmasına katkı sağlandı.

Çalışmamızın amacı tarım, tıp, boya ve kozmetik sanayiinde kullanılan kumarin maddesinin bitkide sebep olduğu bazı fiziksel, sitolojik, biyokimyasal ve genetiksel değişiklikleri belirlemek ve böylece bitkide meydana gelebilecek; olası oksidatif stres izlerini, bitkinin strese yanıtını, lipid peroksidasyonu ve bitki gelişimi üzerine etkilerini ortaya koymaktır. Yapılan çalışma sonunda elde edilen tespitler genel bir değerlendirme niteliğinde olacağı gibi ayrıca analizlerin sonuçları üretici ve tüketiciye, kumarin maddesinin kullanıldığı alanlarda avantaj ve dezavantajları hakkında fikir verebilecektir.

1. GENEL BİLGİLER

Sınırları belli bir bölgede yaşayan ve kendi aralarında düzenli etkileşim içinde olan canlılar ve onların cansız çevreleri ekosistemleri oluşturmaktadır. Doğal ekosistemlerin canlı öğelerinin ilk kısmını yeşil bitkilerden oluşmuş üreticiler topluluğu meydana getirmektedir. Çeşitli canlılar için temel besin kaynağı olan bitkiler birçok canlı için habitat oluşturmakta ve çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkiler, iklimlerin şekillenmesini sağlamakta, toprak erozyonunu engellemekte, ekosistemleri dengelemekte, sera etkisini azaltmakta ve çeşitli ham maddelerin kaynağını oluşturmaktadır (Gibson ve Gibson, 2007). Bitkilerden elde edilen çeşitli ürünler ve bu ürünlerin kullanım alanları özellikle son zamanlarda büyük bir artış göstermiştir. Bitkilerden elde edilen bu maddeler zirai ilaçların (herbisit, fungusit, insektisit, gübre ve büyüme regülatörleri), gıda katkı maddelerinin (nutrasotikler, koruyucu ve lezzet verici baharatlar), çeşitli ilaçların (antibiyotikler, anti-inflamatuar ilaçlar, hormonlar, analjezikler vb.) ve kozmetik ürünlerin (krem bileşenleri, parfüm ve losyonlar) kaynağını oluştururlar (Sampietro ve diğ., 2009; Wink, 2010). Örneğin thaumatin adlı *Thaumatococcus danielli*'den elde edilen tatlandırıcı, kalorisi az olması ve sukrozdan 2000 kat daha tatlı olmasından dolayı sıklıkla kullanılmaktadır (Akay, 2011). Dünya Sağlık Örgütü'nün açıklamalarına göre, özellikle gelişmekte olan ülkelerde bitkisel kaynaklı ilaçlar, nüfusun yaklaşık %80'inin sağlık ihtiyaçlarını karşılamada kullanılmaktadır (Jain ve Saxena, 2009). Bitkiler tarafından bol miktarda oluşturulan, farklı sentez basamaklarına sahip olan biyoaktif fitokimyasallar ve antioksidan maddeler ilaçların hammaddesi olarak kullanılmaktadır. Vinkristin, digitoksin, paklitakzel, streptomisin, 6 kloramfenikol, rifampisin, artemisinin gibi sekonder metabolit kökenli ilaç olarak kullanılan birçok biyoaktif bileşik örneği mevcuttur (Akay, 2011). Aspirin, *Salix sp.* ve *Populus sp.* bitki cinslerinin birçok türünde bulunan glikozit salisinden türetilmiştir (Strobel ve Daisy, 2003).

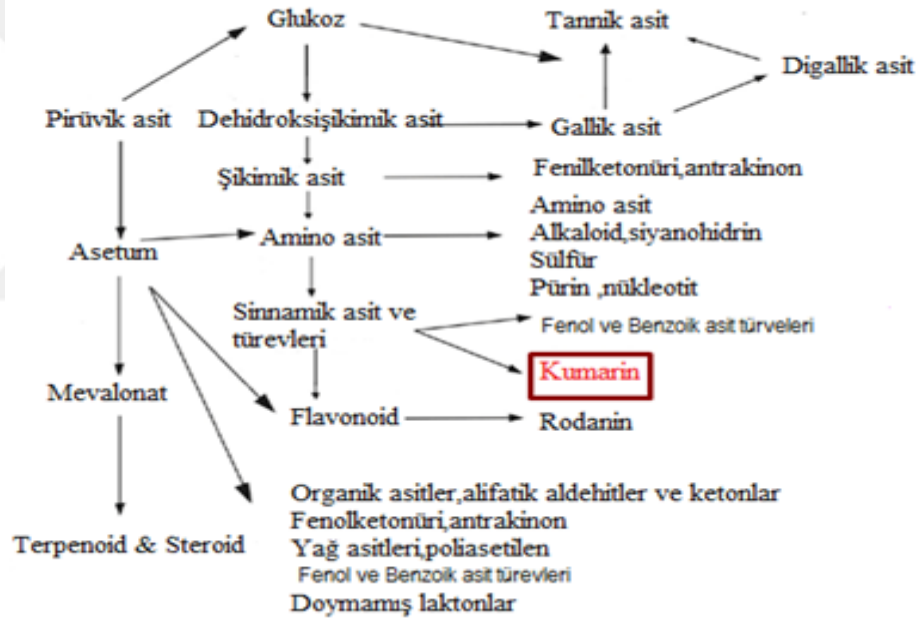
Teknolojinin ve bilimin ilerlemesiyle tüm organizmalar günlük yaşamda sık sık doğal ya da yapay kimyasal maddelerle yüz yüze gelmektedir. İnsan popülasyonunun karşılaştıkları bu kanserojen ve mutajen maddelerin etkisinden korunması için bu

özelliğe sahip bileşiklerin tespit edilmesi ve etkilerinin açığa çıkarılması gerekmektedir (Maron ve diğ., 1983; Debnath ve diğ., 1991). Sıklıkla kullanılan endüstriyel kimyasallar, pestisidler, kozmetik ürünleri, ilaçlar gibi yapay kimyasallar ve havayı kirleten çeşitli kimyasal maddelerin ya da ilaçların mutajen kaynaklarının toksik etkileri mutajenik, karsinojenik ve teratojenik olarak ortaya çıkmaktadır (Dökmeci, 1994). Mutajenik, karsinojenik ve teratojenik ürünler hakkında doğal ürünlerde olduğu gibi çok fazla bilgi sahibi olduğumuz söylenemez. Toksik ürünlerin etkileri için denemelerde hayvanlar kullanılmakta, ancak bu hem masraflı hem de zaman alıcı testler olarak bilinmektedir. Bu yüzden biyolojik aktivitelerin tahmin edilmesi için daha etkili ve uygun yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Zahmetsiz, hemen yetişebilen, ekonomik olarak kolay elde edilebilen ökaryotik organizmalar ile birlikte çalışmanın hedefe yönelik daha etkili ve sağlıklı çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Günümüzdeki bilimsel yeniliklerle birlikte, biyoloji kimya ve tıbbın farklı alanlarındaki disiplinlerarası çalışmalar, tıbbi bitkilerin doğal bileşiklerinin moleküler yapıları ile ilgili yeni bilgiler elde etmemize yardımcı olmakta ve saflaştırma sonucunda bu bitkilerdeki biyolojik aktiviteler incelenebilmektedir (Dülger ve diğ., 1999; Tadeğ ve diğ., 2005). Aynı araştırmalar, bitkilerin çevresi ve ekosistemle olan etkileşimlerinde karmaşık mekanizmalar ile çeşitli kimyasal maddeler içerdikleri ve bu maddeler yardımıyla savunma, korunma, ortama adaptasyon, varlığını sürdürme ve neslini devam ettirme gibi hayati konularda avantajlar sağladıklarını ortaya çıkarmıştır (Bourgaud ve diğ., 2001).

Sekonder metabolitler bitkinin belirli kısımlarında sentezlenen ve uzun süre depo edilebilen, genellikle savunma amaçlı kullanılan bileşikler olarak tanımlanmıştır (Hartmann, 2007; Karlovsky, 2008). Sekonder metabolitler, sayıları 100 binlere ulaşmış azot içeren (alkoloidler, aminler, siyanojenik glikozitler, alkamidler, peptitler, glikosinolatlar ve protein yapısına girmeyen aminoasitler örn: β -alanin, taurin, ornitin vb gibi) ve azot içermeyen (terpenler, poliketidler, fenolikler, saponinler ve poliasetlenler) bileşiklerdir. Bu bileşikler, bitkinin farklı doku ya da organlarında sentezlenebilirler (Facchini, 2001) (Şekil 1.1). Bunlar arasında bitkiyi, zararlı hayvanlar ve otlara karşı korunmayı sağlayan insektisitler, çimlenmeyi önleyici maddeler ve toksik maddeler, ortamdaki zararlı çevresel faktörlerin yol

açtığı strese karşı güçlendirici metabolitler, doğal yaşamda rekabet gücünü artıran bileşikler, bakteri, mantar ve virüs karşıtı maddeler, herbisitler, tozlaşma ve tohum dağılımı vasıtasıyla hayvanları cezbedecek renkli ve güzel kokulu metabolitler yer almaktadır (Charwood, 1990). Bitki yapılarındaki sekonder metabolitlerin çoğu yalnızca bir bitki cinsine ya da türüne özgü olabilir. Bu yapılar farklı bitkiler tarafından üretilemez (Ramachandra ve Ravishankar 2002; Gül, 2011). Ayrıca bu bileşikler bitkileri UV ışınlarından korumada, patojenleri inhibe etmede ve hücre duvarında yapısal bütünlüğü sağlamada başlıca rol oynarlar (Verma ve diğ., 2009). Özellikle terpenoid türevlerinin ve fenolik asitlerin kuvvetli allelopatik etkiye sahip oldukları belirtilmektedir (Chengxu ve diğ., 2011).



Şekil 1.1. Major sekonder maddelerin biosentez yolları (Li ve diğ., 2010)

Sekonder bileşiklerin ve özellikle fenolik bileşiklerin sağlık açısından önemi gün geçtikçe artmaktadır (Cemeroğlu, 2009). Gıda sanayiinde kullanılan fenoliklere olan ilgi, antioksidan özellikleri sayesinde insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkisinden dolayı artmıştır. Fenoliklerin antioksidan aktivesinin yanında, detoksifiye enzimleri uyararak tümör gelişimini başlatan ve ilerleten transkripsiyon faktörlerini inhibe etme yetenekleri ve metal iyonlarını şelatlama özellikleri vardır (Verma ve diğ., 2009). Fenolik bileşiklerin sağlık üzerine etkilerinin belirlenmesindeki en önemli

zorluklardan biri besinlerde farklı biyolojik aktivitelere sahip çok sayıda fenolik bileşimin bulunmasıdır (Cheynier, 2005). Fenolik bileşiklerin, antioksidanlar olarak hücre canlılığını artırırken, prooksidanlar olarak apoptozu indükleyebildikleri ve tümör gelişimini engelleyebildikleri de bilinmektedir (Lambert ve diğ., 2005).

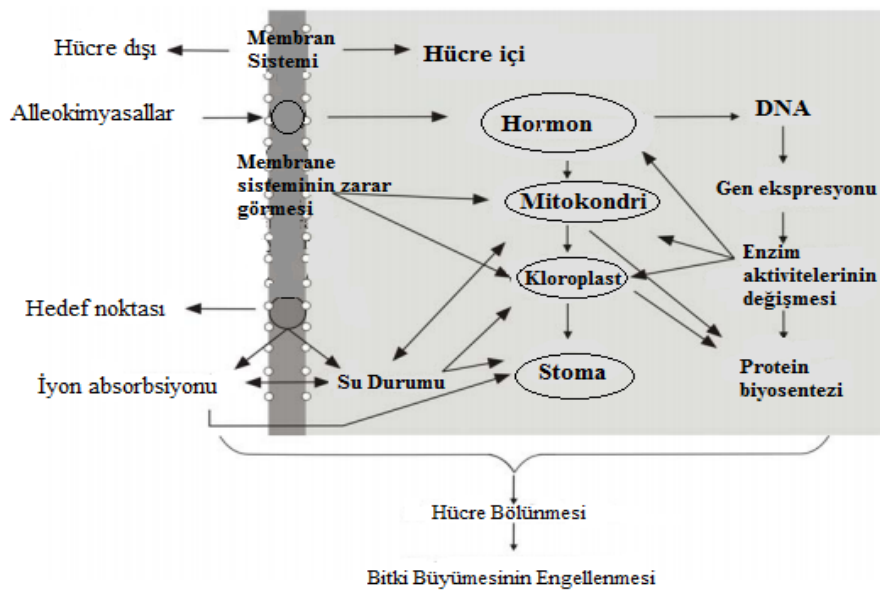
Kimya endüstrisi ve ilaç yapımının hızlı gelişimi, tarım ve evlerde kullanılan kimyasal maddelerin artması ve ortaya çıkan çevre sorunları, endüstride görülen mesleki zehirlenmeler, medikal ilaçlarla ortaya çıkan zehirlenmeler, besin zehirlenmeleri gibi nedenlerden dolayı kimyasal maddelerin önemi ve onlara olan ilgi giderek artmaktadır (Vural, 1984). İnsan popülasyonunun çevredeki kanserojen ve mutajen maddelerin etkisinden korunması için bu özelliğe sahip bileşiklerin tespit edilmesi ve etkilerinin değerlendirilmesi önemlidir (Maron ve Ames, 1983; Debnath ve diğ., 1991). Son zamanlarda yapılan araştırmalar sentetik kimyasal ilaçların yerine daha doğal ve çevreye daha az olumsuz etkisi olan kimyasalların bulunmasına yöneliktir. Çünkü sentetik kimsayallar hem çevreye ve insan sağlığına zarar vermekte hem de yabancı otların çoğu bu kimyasallara karşı bağışıklık geliştirmektedir. Bütün bunlar gözönüne alındığında, bitkilerden salınan allelokimyasalların kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Bu bileşiklerin yarılanma ömürleri daha kısadır ve ekosistemde kimyasal herbisitlere göre daha güvenlidir (Duke, 1986). Allelopatik maddeler; farklı mikroorganizmalar (bitki, mantar gibi) tarafından üretilirler (Kohli ve diğ., 1997) ve etki ettikleri organizmalarda doğal gelişimi yavaşlatır ya da tamamen bitirirler (Macias ve diğ., 2007; Lam ve diğ., 2012)

Güneş ışığı, nem ve rüzgarlı hava koşulları bitkisel kökenli pestisitlerin hızlıca parçalanmasına yol açar. Bu nedenle hasattan az bir zaman önce uygulanabilirler. Genelde bitki kökenli pestisitler, çevredeki zararlı maddeleri direk olarak bitirmese de önemli ölçüde yavaşlatırlar ve bu zararlı maddelerin bitkiye etkisini zayıflatırlar. Diğer bir deyişle, zararlı etken maddeyi hemen öldürmezler ama zararlarını bloke edebilirler. Ayrıca, memeli hayvanlara ve ekosisteme çok fazla olumsuz etkileri yoktur. Orantılı olarak kullanıldıklarında kültür bitkilerinin çimlenme ve büyümesini durdurmazlar ve bitkinin kalitesine zarar vermezler. Başlıca dezavantajları ise etkilerini çok çabuk kaybettiklerinden uygulama zamanı ve sıklığı açısından doğru planlama gerektirmesidir. Genellikle toksik özellikleri kullanılarak çeşitli alanlarda

yaşamımıza dahil olan bu bileşiklerin biyoherbisit olarak kullanımları da son zamanlarda gündeme gelmiştir (Özdemir, 2007). Ancak sentetik herbisitlerin sebep olduğu gibi kalıcı hasarlarla karşılaşmamak için bu amaçla kullanılacak allelopatik etkiye sahip kimyasalların etki mekanizmalarının araştırılıp açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

Allelopatinin etkileşimin sebepleri arasında sitolojik bölünme, uzama vb. ile birlikte hormon seviyesi ve konsantrasyonu, hücre zarı geçirgenliği, besin maddesi alımı, stoma açıklığı, klorofil içeriği, solunum, enzimatik etkinlikler (protein sentezi, yağ metabolizması, porfirin yapımı gibi), su ilişkileri ile toprak mikroorganizmaları gibi faktörlerin etkisi (özellikle tarla bitkilerinde) gösterilebilir (Manuel ve diğ., 1999; Reigosa ve diğ., 2002). Allelopatik bileşikler hedef bitkiye nüfuz ettikten sonra; mineral alımı, enzim inhibisyonu veya stimülasyonu, stomaların açılması ve fotosentez, hücre bölünmesi, solunum, membran geçirgenliği, topraktaki potasyum (K) ve fosfat (P)'in kullanılabilirliği, protein sentezi ile lipid ve organik asit metabolizmasının değişimi, porfirin halkalarının sentezinin durdurulması, hormonal gelişim, ksilem elemanlarının tıkanması ve gövdeden suyun geçişi gibi fizyolojik ve biyokimyasal olayları etkileyebilirler (Kocaçalışkan, 2010; Rice, 1985; Seigler, 1996). Belirtilen fizyolojik ve biyokimyasal değişimlerin belirlenebilmesi için verici ve hedef bitki hakkında bilgi sahibi olmak gerekir. Aynı zamanda bu ajanların yapısının ve etki mekanizmalarının bilinmesi, sebep olduğu morfolojik, sitolojik ve genetiksel değişimleri açıklamayı kolaylaştırır. Örnek verilecek olursa anormal kök gelişimi, inhibitör maddenin mikrotübül oluşumunu engellediğini gösterir. Lateral kök gelişimi veya primer kökün zarar görmesi hormonal dengenin bozulduğunu belirtir. Kök ve gövde uzunluğundaki farklılıklar, bitki gelişimin primer düzeyde etkilendiğine işaret eder. Bu etkiler salınan allelokimyasal etkiye sahip bileşiğin etki mekanizmasına ve biyolojik etkisine bağlı olduğu kadar, hedef bitkinin fiziksel ve biyokimyasal tolerans durumuna da bağlıdır (Erez, 2009). Sekonder metabolitlerin ya da allelopatik bileşiklerin hedef bitki ile etkileşimi sonucunda hücre membranında geçici porlar açılabilir ya da membranın çözülmesine sebep olabilirler. Böylece hücre zarının permeabilitesini artırıp ekzojen kaynaklı maddelere açık hale getirebilirler (Wink, 2010). Ayrıca bu bileşikler metabolik ve yapısal olaylarda hücre bölünmesinde, gen regülasyonunda ve iletişimde çok önemli yere sahip olan

proteinler ve toksik maddeler ile kolaylıkla reaksiyona girebilirler. Bu etkileşim sonucunda proteinin konformasyonu kolaylıkla aktif veya inaktif duruma gelebilir. Sekonder metabolitler, bu etkiyi özellikle sahip oldukları reaktif fonksiyonel gruplarıyla proteinlere kovalent bağlanarak gerçekleştirirler (Wink ve Latzbruning, 1995). Ferulik asit ve sinamik asit gibi bazı fenolik bileşikler protein sentezlemesini inaktive ederler. Örneğin *O. sativa*'daki fenol içeren alelokimyasallar amino asit taşınımı ve protein sentezini kısıtlayarak büyümeyi durdururlar. Bütün fenolik bileşikler DNA ve RNA'nın kararlılığını azaltır. Şekil 1.2'de alleopatik bileşiklerin yol açtığı bir seri fizyolojik ve biyokimyasal değişimler gösterilmektedir (Li ve diğ., 2010). Ayrıca fenol içeren allelopatik ajanlar bitki hormonlarının fizyolojik aktivitelerini azaltabilir, artırabilir ya da sonlandırabilir. Bu durum bitkilerin normal fizyolojik gelişim sürecini engeller. Benzoik asit ve polifenoller gibi sekonder bileşikler indolasetik asit ve gibberelin gibi hormonların bozulmasına neden olabilirler. *O. sativa*'nın sulu ekstraktları, bazı bitkilerdeki indolasetik asidin oksidaz aktivitesini arttırdığı ve daha sonrasında indolasetik asitin seviyesini azalttığı belirtilmiştir. Bazı araştırmalarda da salisilik asitin armut meyvesinde (*Pyrus communis*) etilen sentezini engellediği gösterilmiştir. Genel olarak fenolik bileşiklerin çimlenme ve erken fide gelişimi üzerindeki etkisi, kullanılan bileşime, konsantrasyona ve hedef bitkiye bağlı olarak aktive veya inhibe edici olabilir (Reigosa ve diğ., 1999).



Şekil 1.2. Allelokimyasalların bitkiler üzerindeki etki mekanizması (Li ve diğ., 2010)

Allelokimyasallar; kimi bitkiler için toksik olup bitkide inhibisyona, strese hatta ölüme bile neden olabilirler. Aynı allelokimyasallar diğer bir bitkide ise olumlu etki göstererek büyüme ve gelişmeyi düzenleyebilirler.

Geniş yayılış alanları ve biyokütleleriyle besin zincirinin ilk basamağını oluşturan bitkilerin doğal ortamlardaki dağılımları biyotik (aynı türe ait bitkiler, farklı türlere ait bitkiler, hayvanlar, bakteriler ve mantarlar) ve abiyotik (sıcaklık, coğrafik şekiller, toprak bileşimi, su ve güneş ışınları) faktörler tarafından oluşturulmaktadır. Bu açıdan konuya, bitki stres fizyolojisi açısından bakılacak olursa; bitkiye yönelik yabancı ot uygulamaları, doku(ların) yaşı, hastalık ve parazitler, iyonize ve UV radyasyon, çok düşük düzeydeki sıcaklıklar, ortamdaki besin ya da su kısıntısı, genotip vb etmenler bitkilerde önemli ekofizyolojik etki bırakırlar (Gürsoy ve diğ., 2012). Stres sonucu serbest radikaller ile antioksidan sistem aktivitesi arasındaki dengenin bozulması ile lipid peroksidasyonu, protein denatürasyonu, DNA mutasyonlarını içine alan oksidatif hasarların meydana gelmesine neden olmaktadır (Poontariga ve diğ., 2003). Özellikle hidroksil radikalleri hücresel DNA, protein ve lipid hasarlarına sebep olmaktadır. Lipid peroksidasyonu, hücre membranındaki doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle birleşmesi nedeniyle bir seri reaksiyona girmeleri sonucu deforme olmaları ve lipid hidroperoksitlerin ortaya çıkmasıdır. Peroksidasyon sonrasında ortaya çıkan malondialdehit gibi aldehitlerin biyolojik aktiviteleri, DNA ve proteinlerle çapraz bağlanarak moleküllerin işlevlerini değiştirmeleri ile oluşmaktadır (Griffiths ve diğ., 2002; Aksoy, 2009).

Bitkilerin hayatlarına devam edebilmeleri için bazen önleyici mekanizmalar kullanarak strese karşı mücadele etmeleri bazen de tolerans mekanizmalarını kullanmaları gerekmektedir. Ekosistemden kaynaklanan strese karşı kullanılan tepkiler basit kimyasal ya da biyokimyasal tepkiler, hormonal ya da gelişim tepkileri ile genetiksel olarak meydana gelen kalıtsal etmenlere kadar pek çok farklı moleküler tepki şeklinde olabilir. Çevre kaynaklı strese karşı adaptasyonda anatomik ve morfolojik düzeyden hücresel, biyokimyasal ve moleküler düzeye kadar organizmadaki bütün düzeylerde ortaya çıkan ve birbirini etkileyen farklı olaylar etkili olmaktadır. Hücrelerdeki stres toleransının seviyesini yükselten hücresel tepkiler; hücre siklusu, hücre bölünmesi, hücrelerin endomembran sistemi ve vakuolleşmesi ile hücre duvarının yapısındaki farklılaşmaları içermektedir.

Biyokimyasal düzeyde, bitkiler prolin, glisin ve betain gibi ozmodüzenleyici bileşiklerin üretimini içeren metabolizmada çeşitli farklılıklarla çevresel streslerle başedebilmektedir. Bir stres sinyalinin algılanmasını içeren moleküler olaylar ise toleransa neden olan genomik tepkiler olarak adlandırılırlar (Taiz ve Zeiger, 2002). Ayrıca bitkilerde stres koşullarına karşı oluşan moleküler tepki mekanizmaları içinde makromoleküllerin ve iyonların homeostazisi, bazı koruyucu moleküllerin sentezi, reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu ve detoksifikasyon da vardır.

Bitkilerin strese verdikleri yanıtlara genetiksel olarak bakıldığında, verdikleri cevaplar yapılarına bağlı olarak değişmektedir. Bunlar stres uyarıları, taşıyıcılar, transkripsiyon düzenleyicileri, hedef genler ve stres tepkileridir. Bunların etkisiyle bitkide fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik değişimler oluşmaktadır. Yapılan çok sayıda transkriptomik ve proteomik çalışmalar stres esnasında hangi genlerin aktif olduğu ve bu aktivitenin nelere yol açtığı konusunda açıklamalar getirmektedir. Çevresel koşullarda meydana gelen değişiklikler, stresin algılanması sonrası sinyal iletim mekanizmalarının devreye girmesiyle çok sayıda transkripsiyon faktör ve regülatörlerinin aktivasyonuna sebep olmaktadır. Mevcut çalışmalar moleküler, hücresel ve fizyolojik olarak değişimlere yol açan biyotik ve abiyotik stres cevabının oldukça karmaşık olduğunu ve tüm bu değişimlere yol açan mekanizmaların birbiriyle etkileşim içinde olduklarını belirtmişlerdir (Ergen ve Budak, 2009). Bu mekanizmaların merkezinde strese karşı dayanıklılığı arttırdığı ya da stresin etkilerini yavaşlattığı düşünülen bir takım proteinlerin sentezlendiği belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda da belirtildiği gibi stres altındaki bitkilerde, protein sentezi genellikle artmaktadır. Bu proteinler, transkripsiyon faktörleri, RNA'ya bağlı proteinler, protein kinazlar ve fosfatazlar olabileceği gibi (Rock, 2000; Shinozaki ve Yamaguchi, 2000; Xiong ve diğ., 2001), stres koşullarında iyon homeostazisini ve canlı kalma yeteneğini sağlayan proteinler de olabilmektedir (Blumwald, 2000). Su kanallarındaki bazı proteinler ise aktif oksijen türlerini yok eden enzimlerin (Bohnert ve Sheveleva, 1998), ozmolitlerin sentezini sağlayan enzimlerin (Bohnert ve Shen, 1999) yapısına katılan proteinlerdir. Yapılan araştırmalarda, toleranslı bitki türlerinde strese karşı dayanıklılıkta protein miktarının daha fazla artış gösterdiği (Aspinall, 1986; Hurkman ve diğ., 1989; Ramagopal, 1987) ve duyarlı türlerde ise protein miktarındaki artışın az olduğu, hatta azaldığını belirtilmiştir (Türkyılmaz, 2004).

Bitkilerin çevreye uyum seviyesi stres etmenlerinden meydana gelen zararı etkiler. Bu olgu farklı bitkilerin farklı bölgelerde en verimli seviyede yetişmelerindeki başlıca etmendirdir. Bitkiler biyotik ve abiyotik streslerin etkisi altında iken hücre döngüsünde meydana gelen olaylar ile birçok genin birlikte çalışması ve genetik bilginin yavru hücrelere doğru şekilde aktarılmasıyla bu stres faktörlerini yenebilirler (De Veylder ve diğ., 2003; Harashima ve diğ., 2013).

Yüksek yapılı bitkiler, çevresel kimyasalların sitotoksik, sitogenetik ve mutajenik etkilerini bizlere göstermektedir. Bu özellikleri yüksek yapılı bitkileri deneysel çalışmalarda, kimyasalların uygulanması veya çevresel kirliliğın sebep olduğu olası genetik zararın ölçülmesinde en önemli alternatif test sistemleri olarak ön plana çıkarırlar (Ma ve diğ., 1995).

Genotoksisite genlerdeki DNA moleküllerinin toksik ajanlarla etkileşmesi sonucunda meydana gelen ve etkileri sonraki jenerasyonlara taşınan toksisitedir (Başaran, 2002). Bitkiler hareketsiz canlılardır ve çevresel kirleticilere ve streslere doğrudan ya da dolaylı olarak maruz kalmaktadır. Bitkilerin çevresel kirliliğın neden olduğu genetik toksisitenin iyi bir biyoindikatörü olduğu belirtilmektedir (Krystofova ve diğ., 2009). Bu nedenle çevresel kirliliğın neden olduğu muhtemel genetik hasarın izlenmesinde hayvan biyotestlerine alternatif olarak *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Vicia faba* ve *Zea mays* gibi birçok bitki, son yıllarda bu çalışmalar için model organizmalar olarak kullanılmaktadır (Liu ve diğ., 2005; Aksoy ve diğ., 2015).

Toksisite testlerinde seçilecek organizmalar için şu faktörler önemlidir (Rand ve diğ., 1995):

- 1- Ekosistemi temsil edebilecek yerli türler kullanılmalıdır.
- 2- Seçilen tür ulaşılması kolay ve bol miktarda bulunabilecek bir tür olmalıdır.
- 3- Seçilen türün ekolojik ve ekonomik önemi olmalıdır.
- 4- Tür içi ve türler arasındaki duyarlılık farklılık gösterdiğinden, en geniş duyarlılık aralığına sahip canlılar seçilmelidir.
- 5- Türlerin laboratuvar ortamlarına uyum yeteneklerinin yüksek ve kültürlerinin yapılabilir olması önemlidir.
- 6- Seçilecek türler laboratuvar muhafaza ömürlerinin en az bir ay olması gerekir.

7- Türlerin biyolojileri, tuzluluk, pH ve sıcaklık ihtiyaçları çalışmadan önce bilinmelidir.

8- Organizmanın gıda zincirindeki seviyesi, ekonomik olarak önem arz etmelidir.

9- Denemede kullanılacak organizmalar uygun boyutta olmalıdırlar.

Kirleticilerin bitkiler üzerinde oluşturdukları etkilerini belirlemek için biyokimyasal, fizyolojik, kromozomal ve moleküler seviyede araştırmalar yapılabilir. (Antonsiewiez, 1990; Gichner ve Plewa, 1998; Rank ve Nielsen, 1994; Conte ve diğ., 1998; Atienzar ve diğ., 1999; Kovalchuk ve diğ., 2001, Aksoy ve Dane, 2007).

Günümüzde özellikle ekonomik öneme sahip bitkilerin korunması ve kaliteli ürün elde edilmesi gibi nedenlerden dolayı bitkilerin stresörlere karşı daha hazırlıklı olması ve maruz kaldıkları etkilerden daha çabuk kurtarılmaları hedeflenmektedir. Stresli ortamlar besin kalitesini negatif olarak etkilediğinden, araştırmacılar zorlu ekolojik ortamlarda hayatta kalabilecek bitki türlerini geliştirerek, gelecek zamanda farklı alanlarda bu bitkileri kullanmaya devam etmek istemektedirler.

Fenolik yapıdaki bitkisel bileşiklerin yapı-etki ilişkilerini ve mekanizmalarını daha ayrıntılı ortaya çıkarmak, dolayısıyla insan sağlığına olası etki/yan etkilerini aydınlatmak ve yeni kullanım alanlarını belirlemek için ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır. Bu amaçla bu tez çalışmasında, doğal ürünlerde bulunan ve son yıllarda tıp,kozmetik gibi alanlarda kullanımı artan fenolik bileşiklerden kumarinin *L. culinaris* üzerindeki sitotoksik, biyokimyasal ve genotoksik özellikleri araştırıldı. Ayrıca olası alleopatik özellikleri hakkında literatür taramaları ile öngörülerde bulunuldu.

1.1. *Lens culinaris* Medik.

Bölüm : *Phanerogamae*

Alt Bölüm : *Angiospermae*

Sınıf : *Dicotyledoneae*

Takım : *Rhosales*

Familya : *Fabaceae (Leguminosae)*

Alt Familya : *Papilionoideae*

Cins : *Lens*

Tür : *L. culinaris* Medik. cv. Sultan

Mercimek tohum ve fidelerinin tercih edilmesinin sebebi kolay yetiştirilebilen bir kültür bitkisi olması, kromozom sayısının az olması ve kromozomların gözlenebilir olması, kısa sürede deney materyali haline gelmesi ve literatür incelemelerine göre çimlenme deneyleri ile ilgili çalışmalarda bitkisel materyal olarak sıklıkla kullanılmasıdır.(Aksoy ve diğ., 2007; Aksoy, 2008)

Mercimek insanoğlunun ilk gıda ürünlerinden biridir. Orijininin Türkiye ve Mezopotamya olduğu tahmin edilmektedir. Mercimek bu bölgelerden Mısır, Yunanistan ve Avrupa'ya yayılmıştır. Mercimek (*Lens*), *Fabaceae* familyasına bağlı bir bitkidir (Kaya, 2010). Mercimeğin makrosperma adı verilen yeşil kabuklu ve genellikle sarı iç renginde olan türü ile mikrosperma adındaki kırmızı iç rengine sahip türü mevcuttur (Çoşkuner ve Karababa, 1998). Mercimek bitkisi ($2n=2x=14$) kendi kendini dölleyebilen diploid bir bitkidir. Haploid genom boyutu 4063 Mbp büyüklüğündedir (Arumuganathan ve Earle, 1991). Mercimek yılda bir kez ürün veren, yarı dik olan 30–45 cm aralığında uzunluğa sahip bir bitkidir. Gövdesi tek ve kuvvetli, pinnat yaprakları soya ve fasülye ile karşılaştırıldığında biraz küçük ve her biri 1-4 cm uzunlukta 5-7 çift sapsız yaprakçık içerir. Yapraklarda 2 küçük kulakçık ve uçta sülük bulunur. Üretken nodlar kısa pedinküllerdeki çiçek durumlarında küçük, 4–8 mm uzunlukta 1-4 çiçek taşır. Çiçekler kendiliğinden tozlaşma özelliği vardır. Baklalar 2,5 cm'den kısadırlar ve 1–2 tohumları bulunur. Tohum yuvarlak ve merkeze doğru şişkindir. Tohumların 2–9 mm arasında çapları olur. 100 tohum

ağırlığı 1,07–8,55 g arasındadır. Bitkilerde bulunan tohum sayısı 17,6 ile 139,6 arasındadır (Muehlbauer, 1974).

Faklı bir şekilde mercimek kabuklu ve iç mercimek olarak 2 sınıfa ayrılır. Türkiye’de yetiştirilen mercimekler Türk Standartları Enstitüsü tarafından 4 grup altında toplanmıştır. İsmi büyüklüğüne, şekline ve renklerine göre alan mercimeğin türleri şunlardır: Sultan mercimek (yaprak-pul mercimek), yeşil mercimek (sıra mercimek), kabuklu kırmızı mercimek ve kırmızı iç mercimek (Özdemir, 2007)

100 g kuru mercimek tohumu; 340-346 g kalori, %12 nem, %22-34,6 g protein, 0,6 g yağ, 65 g karbonhidrat, yaklaşık 4 g lif, 2,1 g kül, 68 mg Ca, 325 mg P, 7,0 mg Fe, 29 mg Na, 780 mg K, 0,46 mg thiamine, 0,33 mg riboflavin ve 1,3 mg niacin içerir (Sürek ve diğ., 2014). Mercimeğin içerdiği önemli aminoasitler; lizin, arginin, lösin ve sülfür içeren amino asitlerdir. Nişasta içeriği tohumda %35-53 ve %42 arasında değişir (Şehirali, 1988). Mercimek iyi bir B vitamini kaynağıdır. 100 gramında: 0,26 mg thiamine, 0,21 mg riboflavin, 1,7 mg nikotinik asit, 223 mg kolin, 107 mg folik asit, 130 mg inositol, 1,6 mg pantothenik asit, 13,2 mg biotin ve 0,49 mg piridoksin bulunur (Hawtin, 1979). Mercimeği önemli kılan hem yoğun protein içermesi hem de farklı yemeklik baklagil tohumların ile karşılaştırıldığında yapısında bulunan tripsin inhibitörleri, hemaglutininler ve tannin gibi toksik maddelerden az miktarda bulundurmasıdır. Ayrıca, demir bakımından zengin olması baklagiller arasında mercimek bitkisinin değerini arttırmaktadır (Muehlbauer ve Tullu, 1997).

Mercimeğin ayrıca ekildiği toprağa da çeşitli katkıları vardır; örneğin, mercimek köklerinde bulunan *Rhizobium leguminosarum* bakterilerinin yardımıyla, havada bulunan serbest azotu toprağa bağlar ve kendisinden sonra aynı yerde ekilecek bitkiye azot bakımından verimli bir ortam hazırlar (Canbolat, 2014). Bununla birlikte mercimeğin köklerinde bulunan N, Ca, P, K gibi besin maddeleri de ayrışma sonrasında toprağın kök bölgesinde kalırlar (Sepetoğlu, 2002). Mercimeğin toprak verimliliğine katkıda bulunmasının yanı sıra, sap ve samanında en az selüloz içeren bitki olması nedeniyle hayvan beslenmesinde de öncelikli olarak tercih edilmektedir (Aydoğan, 2001). Tüm bu özellikleri ile mercimek bitki ıslahı ve çeşit geliştirme çalışmalarında önemli bir kaynaktır (Canbolat, 2014).

Türkiye’de tarımı yapılan bakliyatlar içerisinde ise mercimek en yüksek üretim değerlerine sahiptir (Gerçek, 2014). Dünya mercimek üretiminde Türkiye 2014 yılı itibariyle 4.827.121 ton ile üçüncü sırada yer almıştır (FAO, 2014). Türkiye dünya mercimek üretiminde %7’lik bir paya sahiptir. Ülkemizin dünya üretimindeki payını koruyabilmesi için verim düzeyi yüksek, kaliteli, teknolojik özellikleri ve besin öğeleri yönünden zengin mercimek türlerinin yetiştirilmesi çok önemlidir (Kaya, 2010).

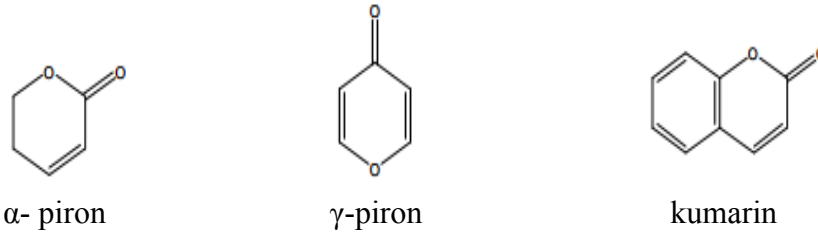
1.2. Kumarin

Kumarin serbest halde ilk defa 1820 yılında Vogel tarafından tonka baklası adı verilen ve Güney Amerika’da yetişen Fabaceae familyasından *Dipteryx odorata* (*Coumarouna odorata*) isimli ağacın kurutulmuş hoş kokulu tohumlarından saflaştırılmıştır. Bileşik ilk defa bu bitkiden izole edildiğinden, bitkinin cins adına dayanılarak “coumarin” ismi verilmiştir. Literatürde “coumarin” olarak anılan bu bileşik Türkçe kaynaklarda “kumarin” olarak geçmektedir. Kumarin ve kumarin türevlerine bitkilerde tek başlarına veya birleşik halde yaygın olarak rastlanmaktadır. Bu tür bileşikler çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle son yıllarda önem kazanmış doğal bileşiklerdir. Kumarin bileşiğinin kimyasal yapısı Strecker (1867) ve Fitting (1870) tarafından aydınlatılmıştır (Coffey, 1977). Bugün tonka baklası dışında, yaklaşık 600 cins bitkiden kumarin türevleri izole edilmiştir (Murray ve diğ., 1982). Kumarin, özellikle Orchidaceae, Leguminosae, Rutaceae, Apiaceae ve Lamiaceae familyalarındaki bitkilerin meyve, yaprak, kök, gövde, kabuk kısımlarında belli oranlarda bulunmaktadır. *Dipteryx odorata* ve diğer *Dipteryx* çeşitlerinden sıklıkla elde edilmekle birlikte *Melilotus alba*, *Hierochloe odorata*, *Glycyrrhiza glabra*, *Medicago sativa* ve *Lavendula officinalis* gibi bitkilerde ve vişne, çilek, şeftali gibi meyvelerde de önemli miktarda bulunmaktadır (Boğa, 2005; Kavran, 1998). Ayrıca, hint baklası, çilek, nane, yeşil çay, havuç, kereviz, yabanmersini, tarçın, bira ve tütünde de bulunduğu açıklanmıştır (Felter ve diğ., 2006).

Kumarinlerin bitki biyokimyası ve fizyolojisinde, antioksidan gibi hareket etme, enzim inhibitörü, toksik maddeleri önleme gibi önemli etkileri incelenmiştir (Kostova, 2005). Kumarinlerin in vivo olarak farklı tümör türlerine karşı etkili olduğu, bazı türlerinin anti-HIV aktivite içerdiği belirtilmektedir. Kumarinler ve

türevlerinde bulunan antibiyotik, antikoagulan, antikanser, antiinflamatuvar ve bakteriyostatik sahip etkileri onları biyoloji ve tıp alanındaki araştırmalarda önemli bir madde yapmaktadır. İlaç sanayisinde kumarinler hakkında pek çok araştırma bulunmaktadır (El-Khatib ve diğ., 2007)

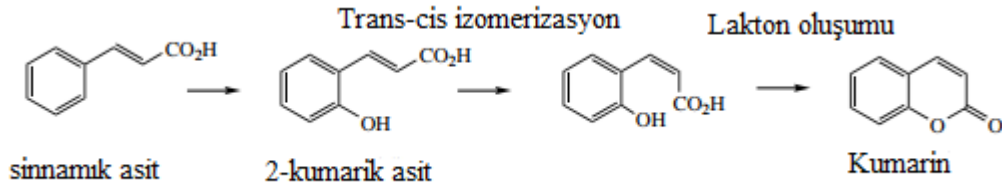
Beyaz kristal görünümlü katı bir madde olan kumarinler, kondanse lakton halkası ile kaynaşmış bir aromatik halkadan oluşurlar. 1,2-benzopiron, 2*H*-1-benzopiran-2-on, *cis*-o-kumarik asit lakton ve kumarinik anhidrit yaygın olarak kullanılan diğeri isimleridir. Molekül formülü C₉H₆O₂' dir ve molekül ağırlığı 146,14 g/mol' dür. Kumarinin erime noktası 68-70°C iken, kaynama noktası 297-299°C dir. Kumarinler, etanol, kloroform, dietil eter ve yağ içinde rahatlıkla çözünürken suda az çözünürler. Birinci sınıf kumarinler hint baklasından izole edilirken; ticari olarak kullanılan kumarinler salisil aldehitten sentezlenmektedir (Lake, 1999; Yüce, 2006). Kumarinin genel yapısı Şekil 1.3'de gösterilmiştir.



Şekil 1.3. α - piron, γ -piron ve kumarin bileşiğı (Boğa, 2005)

Kumarinler, flavonoidler sınıfından bileşiklerdir. Flavonoidler flavonoller, flavonlar, katekinler, flavanonlar, antosiyanidler ve izoflavonoidler olmak üzere 6 alt sınıftan oluşurlar (Guardia ve diğ., 2001). Kumarinler, sinnamik asit ve kafeik asitlerle yapısal benzerlikler göstermektedirler. O-dihidroksi sinnamik asidin yan zincirinin laktonlaşmasıyla kumarin türevleri meydana gelmektedir. Umbeliferon (7-hidroksikumarin), herniarin (7-metoksikumarin), psöralen, novobiosin ve imperatorin bazı kumarin türevleridir. Sinnamik asit doğada yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin temel sınıfı olan hidroksisinnamik asitlerdendir. Tüm hidroksisinnamik asitler yan zincirde çift bağ bulunan ve böylece *cis* ve *trans* formu olan C₆C₃ karbon iskeletine sahiptir. En yaygın ve en iyi bilinen hidroksisinnamik asitler sinnamik asit, kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asittir (El-Seedi ve diğ., 2012). Sinnamik asit, karboksil grubu ile biten üç karbonlu bir yan zincire sahiptir, şikimat ve fenilpropanoid yollarında önemli bir ara üründür. Fenilpropanoid yolağında

fenilalaninin deaminasyonu ile sentezlenir. Fenilpropanoidler fenilalanin temelli bitkisel bir metabolit sınıfıdır. Fenilalanin ilk olarak sinnamatlar, kumarinler, kafeik asitler, ferulik asitler ve sinapik asitlere dönüştürülür. Şekil 1.4'de sinnamik asitten kumarin oluşumu gösterilmiştir. Tüm bu asitlerin öncüsü olan sinnamik asit, diğer bölgelere daha kolay taşınmasını sağlayan daha uçucu bileşiklerin ana bileşenidir. Sinnamik asit ve türevleri tatlandırıcıların, parfümlerin, sentetik boyaların ve farmasötiklerin önemli bileşenleridir (Natella ve diğ., 1999; Bickers ve diğ., 2005). Genel olarak diyet destekleri içinde en yaygın olarak kullanılan grup fenoller olmasına rağmen bu bileşiklerin genotoksik ve antigenotoksik etkileri ile ilgili çalışmalar halen yeterli değildir ve yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar tartışmalıdır (Maistro ve diğ., 2011). Yapılan araştırmalara göre tannik asit, kumarin, vanilin, kafein ve sinnamik aldehit gibi fenolik bileşiklerin memeli hücrelerinde mutajenik etkileri olduğu bildirilmiştir (Ferguson ve diğ., 1985; Sanyal ve diğ., 1997). Fenolik bileşiklerin yüksek dozlardaki genotoksik etkileri; DNA interkalasyonu, DNA topoizomerez II hasarı, serbest radikal üretimi ve anahtar enzimlerin inhibisyonu gibi mekanizmalarla meydana gelmektedir (Stopper ve diğ., 2005).



Şekil 1.4. Sinnamik asitten kumarin oluşumu (Dewick, 2002).

Bitkisel kaynaklı flavonoidlerin biyokimyasal ve farmakolojik aktiviteleri oldukça geniştir. Antioksidan, damar açıcı, anti-inflamatuar, antibakteriyel, immün-uyarıcı, antiallerjik ve antiviral etkileri bu aktiviteler arasındadır. Aynı zamanda, insanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalar flavonoidlerin kardiyovasküler ve kanser hastalıklarına yakalanma riskini azalttığı belirlenmiştir (Cirico ve diğ., 2006). Flavonoidlerin bir diğer özelliği ise, geçiş metal iyonu şelatörü olarak görev yapmasıdır. In vivo ve in vitro ortamlarda, geçiş metalleriyle katalizlenen serbest radikal oluşturma reaksiyonlarında önemli rol oynar. Bu durum, flavonoidlerin antioksidan etkisinden ileri gelmektedir (Gao ve diğ., 2002). Kumarinler antikoagülan, sedatif ve antiinflamatuvar etkiye sahiptir. Kumarin hoş kokusu

sebebiyle parfüm sanayiinde ve hoş gitmeyen kokuları maskeleyen amacıyla kullanılmaktadır (Guenther, 1974). Gıda sanayiinde yine hoş kokusu nedeniyle bir dönem kullanılmış olsa da, hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda toksik özelliği bulunduğundan dolayı, bu alanda kullanılmasından vazgeçilmiştir (Guenther, 1975). Kumarinlerin en bilinen kullanım alanları, kanama üzerindeki antikoagülan etkileridir. Bazı kumarin türevleri ticari olarak oral antikoagülan olarak satılmaktadır. Antikoagülan etkilerine (Shilling ve diğ., 1969) ilaveten, antibiyotik (Lewis ve diğ., 1996) ve antikanser (Manfredini ve diğ., 1994) etkileri nedeniyle de kumarinler birçok biyoloji ve ilaç araştırmalarında önemli yer almaktadır. Tablo 1.1’de kumarinlerin kullanıldığı yerler gösterilmiştir. Önemli bir biyoaktivite gücüne sahip olması nedeniyle, son yıllarda etkili farmakolojik değeri olan yeni tür kumarin türevleri sentezlenmektedir (Hoult ve Paya 1996). Ayrıca çeşitli doğal ve sentetik kumarin türevleri, floresans özellikleri nedeni ile günümüzde kimya, biyoloji, fizik ve ilaç gibi birçok farklı uygulamalarda ve araştırmalarda kullanılmaktadırlar. Örneğin; bir kumarin türevi olan kalanolid HIV virüsüne karşı inhibitör olarak kullanılmaktadır. Bir başka kumarin türevi olan clemencosin A’ nın, tümörleri durdurucu etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Amino kumarinler ve bazı kumarin türevlerinin antibakteriyel etkisi ve biyolojik aktivitesi olduğu açıklanmıştır. Yine bir kumarin türevinin günlük 5 gramlık dozunun klinik olarak yüksek proteinli lenf birikimi tedavisinde ve metastazlı renal karsinomlarda etkin olduğu saptanmıştır (Born ve diğ., 2003; Demiralay, 2005).

Tablo 1.1. Kumarin ve Türevlerinin Biyolojik Aktiviteleri (Boğa, 2005)

| Türevin adı | Gösterdikleri Biyolojik Aktivite |
|--|--|
| Herniarin | Antienflamatuar etkili |
| Dafnetin | Romatizmada etkili |
| Umbelliferon | Antibakteriyel etkili |
| Skopoletin | Spazmalitik etkili |
| Eskuletin | P vitamini aktivitesi |
| Fraksetin | Diüretik etkili |
| Furanokumarinler | Vitiligoda C derideki pigment yetersizliği |
| Bergapten | Derinin bronzlaşmasında etkili |
| Visnadin | Antispazmatik etkili |
| 3-Fenilkumarin | Östrojenik etkili |
| Mammein,Gerpavein | Antikanserojenik etkili |
| 4-OH veya süstitüe Monomer ve dimer kumarinler | Antikoagülant etkili |

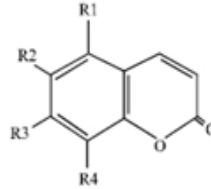
Bitkilerdeki kumarinler türüne ve konsantrasyona bağlı olarak, bitki gelişimini ya teşvik eder ya da inhibe ederler. Bir bitki gelişim düzenleyicisi gibi rol alarak hücre farklılaşmasını, oksin metabolizmasını etkilerler (Abenavoli ve diğ., 2002; Demiralay, 2005; Yüce, 2006).

Kumarinler reaktif oksijen türlerinin oluşumunda ve bunların ortadan kaldırılmasında rol alarak, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı kontrol altına aldıkları saptanmıştır. Kumarinlerin yapısına ve oksidatif stresin kaynağına bakarak, kumarinlerin hem antioksidan olarak hem de oksidan olarak rol oynadığı belirtilmiştir. (Lin ve diğ., 2011; Traykova ve Kostova, 2005).

2. LİTERATÜR ÇALIŞMASI

Saleh ve diğ. (2015) yaptıkları araştırmada kumarinin *Vicia faba*'nın çimlenmesine, gelişmesine ve bazı fizyolojik parametreleri üzerindeki etkisini araştırmışlar. Kumarinin çimlenmeye etkisinin belirlemek için *Vicia faba* tohumlarını farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1,0, 2,0 ve 4,0 mM) kumarin ile muamele etmişlerdir. Gelişme evresinde kumarinin bitkiye daha fazla etki ettiğini, birincil ve ikincil metabolitlerin yanı sıra fitohormon düzeylerini önemli ölçüde arttırdığını belirtmişler. Araştırmacılar, kumarinin uygulandığı bitki çeşidinin büyüme ve fizyolojisini etkileyebileceğini saptamış ve fitohormon metabolizması ile etkileşiminin olabileceğini açıklamışlardır.

Razavi (2011) yaptığı çalışmada imperatorin ve psoralen gibi bazı kumarin türevlerinin önemli pestisitleri üretmek için kullanılabileceğini belirtmiştir. Şekil 2.1'de Bazı allelopatik kumarinlerin yapıları verilmiştir.



| Bileşik | R1 | R2 | R3 | R4 |
|--------------|----|--------------------|---|--|
| Kumarin | H | H | H | H |
| Umbelliferon | H | H | OH | H |
| Skopoletin | H | -O-CH ₃ | OH | H |
| Skopolin | H | -O-CH ₃ | -O-Gln | H |
| İzoamotinin | H | H | OH | -CH ₂ -CH=C(CH ₃)(CH ₂ OH) |
| Auraptin | H | H | -O-CH ₂ -CH=(CH ₃)-CH ₂ -CH ₂ -CH=C(CH ₃) ₂ | H |

Şekil 2.1. Bazı allelopatik kumarinlerin yapıları

Mata ve diğ. (1998) yaptıkları çalışmada doğal kumarin türevi olan imperatorini *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* ve *Lycopersicon esculentum* üzerine uygulamışlardır. Bu bitkiler üzerindeki radikula büyümesine ve çimlenmeye olan etkisini araştırmışlardır. İmperatorinin bu bitkilerde ATP sentez ve fosforilasyon mekanizmalarını inhibe ettiğini ve allelopatik ajan olarak davrandığını rapor etmişlerdir.

Wu ve diğ. (2016) yaptıkları çalışmada çeşitli organik çözücü ekstraksiyonu, kromatografi, ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi-kütle spektrometre (GC-MS) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) yöntemlerini kullanarak sarı tatlı yulaf bitkisinin allelokimyasallarını izole ederek bunları tanımlamışlardır. Kumarin bileşimini, izole ettikleri bileşikler içinde en etkin allelokimyasal olarak belirlemişlerdir. 40 µg mL⁻¹ kumarin, İtalyan çavdar çiçeği (*Lolium multiflorum Lam.*), kuş ekmeği (*Polygonum aviculare*), kırmızı yonca (*Trifolium pratense*), veronica (*Veronica persica*), *Poa pratensis L.*, *Chenopodium albüm*, *Plantago asiatica* bitkileri üzerine uygulanmış ve bu bitkilerin tohum çimlenmesini ve fide gelişimini önemli ölçüde inhibe ettiğini bulmuşlardır (P <0,05). 80 µg mL⁻¹'de kumarin uygulanan tüm test bitkilerinde ise hem tohum çimlenmesi hem de fide gelişiminde önemli inhibisyon etkileri gösterdiği belirtilmiştir (P <0,05). Kumarinin, aynı zamanda İtalyan çavdar çiçeği otu ve kırmızı yonca bitkisinin tohum çimlenme ve fide büyümesini tamamen engellediği belirtilmiştir. Kumarinin sarı renkli tatlı yulafın baskın allelokimyasal maddesi olduğu ve bu kumarinin birçok yabani otun tohum çimlenmesini ve fidan gelişimi üzerine güçlü inhibisyon etkisine sahip olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, kumarinin doğal bir herbisit olarak kullanılabilmesi rapor edilmiştir.

Razavi ve diğ. (2010) yaptıkları başka bir çalışmada ise, *Zosima absinthifolia* bitkisi ile veriler elde etmişlerdir. Mevcut çalışmada, bitki tohumlarından furanokumarin olarak bilinen imperatorin ve 7-preniloksi kumarin ve auraptin saflaştırılmıştır. Özellikle imperatorinin, yaygın bir bitki patojeni olan *Sclerotinia sclerotiorum*'a karşı mantar toksik etkisi sergilediğini ortaya koymuşlar. Bileşiklerin ayrıca fitotoksik etkileri olduğunu ve allelokimyasal rol oynadığını belirtmişler.

Shettel ve Balke'nin (1983) yaptıkları çalışmada kumarin türevi olan umbelliferonun *Zea mays L.*, *Glycine max L.*, *Abutilon theophrasti Medic.*, *Amaranthus retroflexus L.* ve *Panicum miliaceum L.* bitkilerinin büyümesini inhibe ettiğini açıklamışlardır.

Kupidłowska ve diğ. (1994) yaptıkları çalışmada kumarin ve ksantotoksin maddelerini *Allium cepa* bitkisi üzerinde incelemişlerdir. *Allium cepa* kök uçlarının meristematik hücrelerinde mitozu geciktiren konsantrasyonlarda (200 ppm kumarin ve 100 ppm ksantotoksin), bu maddeler ile muamele etmişlerdir. Meristematik

hücreleri tarafından oksijen alımını düşürdüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca aynı maddelerin mitokondriyal matrisindeki yapısal değişikliklerin yoğunlaşmasına ve bu organellerin oluşumunda ve fizyolojisinde değişikliğe sebep olduklarını rapor etmişlerdir. Kumarinin ksantotoksine göre daha az olarak mitokondriyumda ve membran geçirgenliğindeki değişiklikleri gösteren sitoplazmadaki suksinat dehidrogenaz enziminin üretimini arttırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca, mitozu geciktirmesi ve mitokondriyal yapıda değişikliklere sebep olmasından dolayı bu bileşikler allelokimyasallar olarak tanımlamışlar. Kumarin ve ksantotoksinin *Allium cepa* kök uçlarındaki meristematik hücrelerin sitoplazması ve mitokondrinin değişikliğinin, bu bileşikler ile bu organellerin etkileşiminden kaynaklandığını ve bu etkileşimin membran geçirgenliklerini etkilediklerini belirtmişlerdir. Bu değişiklikler sonucunda enerji metabolizması etkilediğini açıklamışlardır. Ayrıca Stenlid ve Saddik, (1962), Knypl, (1968, 1969) araştırmacılar da benzer şekilde kumarinin glikolizis ve oksidatif fosforilasyonu inhibe ettiğini açıklamışlardır. Ön çalışmalar ile bu yeni kumarin türevlerinin mantar büyümesini inhibe etmek için in vitro olarak çok etkili bir şekilde çalıştıklarını göstermiştir. Yüksek ölçüde aktif kumarin türevlerinin birçoğunun, suda çözünürlüğe sahip halojenlenmiş bileşikler olduklarını, bunların sentezlenmesinin nispeten daha kolay olduğunu ve bu türevlerin ekonomik olarak kolay elde edilebilir bileşikler olduklarını belirtmişlerdir.

Brooker ve diğ. 2007'de yaptıkları çalışmada kumarinin altı farklı türevini çeşitli toprak bitkileri üzerindeki patojen mantarlarına karşı antifungal aktivitesi açısından taramışlardır. Bu funguslar arasında *Macrophomina phaseolina* ve *Pythium spp.*, patojenleri üzerinde özellikle durmuşlardır. Kumarin türevlerinin in vitro ortamda 3 haftadan fazla sürede mantar gelişiminde % 100 inhibisyon göstererek ortamda aktif kaldıklarını açıklamışlardır. In vitro fungal inhibisyon deneylerine ilaveten, kumarin bileşiklerinin fitotoksosite analizleri sonucunda, belirgin bir bitki toksisitesi sorunu veya bitki gelişiminde bir sorun oluşturmadıkları belirtilmiştir.

Al-Barwani ve diğ. 2004'de yaptıkları çalışmada kumarin türevi olan furanokoumarinlerin *Conium maculatumun* bitkisinde baskın antifungal bileşikler olduğu göstermişler. Bu bileşiklerin sağlıklı bitkide yapısal olarak bulunmayışıyla birlikte, strese giren bitkilerde kontrol grubuna göre 103 kat arttıkları belirtilmiştir. Bu

bileşikler, kimyasal stres sonucunda büyük ölçüde arttığı için, bu bileşiklerin stres bileşikleri olarak düşünülebileceği açıklanmıştır.

Olson ve Roseland (1991), Reda and El-Banhewy, (1986) Stevewnson ve diğ. (2003) yaptıkları araştırmalarda kumarin ve türevlerinin insektisidal etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir.

Ahrabi ve diğ. 2011'de yaptıkları çalışmada, bitki büyümesini ve gelişimini etkileyebilen ikincil metabolitler olan fenolik bileşiklerden para-hidroksibenzoik asit ve kumarinin kanola üzerindeki biyokimyasal ve fizyolojik etkilerini araştırılmışlardır. Araştırmada, klorofil, karotenoid ve antosiyanin içeriği spektrofotometrik olarak belirlenirken, guaikol peroksidaz ve katalaz aktiviteleri ölçülmüştür. Bununla birlikte, lipid peroksidasyonu tiobarbitürik asit işlemi ile ölçülmüş ve sonuçlarına göre çimlenmenin bu fenolik bileşiklerden biraz etkilendiği, ancak fide büyümesinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Kök ve sürgün uzunluğunun, taze ve kuru ağırlığın bu bileşiklerden etkilendikleri belirtilmiştir. Klorofil içeriğinin düşük konsantrasyonlarda etkilenmediği ancak fenolik bileşiklerin konsantrasyonlarındaki artışla azaldığı açıklanmıştır. Bazı bitkilerin allelopatik potansiyelinin fenolik bileşikleriyle ilişkili olduğunu ve allelokimyasalların, çevre ve ekosistem üzerinde daha az olumsuz etkiye sahip herbisitlerin gelişmesine yardımcı olabileceği belirtilmiştir.

Abenovoli ve diğ., 2006'da yaptıkları çalışmada allelokimyasal kumarin maddesini *Triticum turgidum* üzerinde incelemişler ve özellikle tohumlarda çimlenmenin engellenmesine neden olan fizyolojik ve biyokimyasal değişimleri incelemişlerdir. 200 µm'nin üzerindeki konsantrasyonlarda, kumarin tohum çimlenmesini konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe ettiğini, inhibisyon tohumun çimlenmesi sırasında meydana geldiği, hızlı olduğunu ve geri döndürülemez şekilde meydana geldiği belirtilmiştir. Bu erken çimlenme evresi sırasında, kumarin maddesinin su alımını, elektrolit tutma kapasitesini ve O₂ tüketimini inhibe ettiği açıklanmıştır. Kumarinin peroksidazların aktifleşmesini geciktirdiği, süperoksit dismutaz aktivitesini arttırdığı, bazı enzimlerin(APX,CAT) aktivitelerini düşürdüğü ve salgı yollarında yer alan moleküler şaperonların transkripsiyonunu bastırdığı belirtilmiştir. Kumarinin neden olduğu yetersiz su alımı reaktif O₂ türünün fazla üretilmesine sebep

olduğu, bu durumun membran yapısını bozabileceği ve solunumu azaltabileceği rapor edilmiştir. Ayrıca, antioksidan savunma sistemlerinin yeterli miktarda yükseltilememesi nedeniyle, ortaya çıkan oksidatif stres çimlenme programına etki etmiş olabileceği belirtilmiştir. Kumarinin elektron taşımasını sağlayan membran sistemiyle etkileşime girerek hem solunumu hem de fotosentezi inhibe edebildiği rapor edilmiştir. Ayrıca araştırmacılara, 1000 µm kumarin konsantrasyonunda alfa amilazın inhibe olduğunu belirtmişler. Benzer şekilde Khan 1969'da 340 µm kumarin konsantrasyonunda arpadaki alfa amilazın inhibe olduğunu ağıklamıştır.

Aliotta ve diğ., 1992'de 2×10^{-4} M kumarin muamelesinin turp bitkisinde çimlenme, ışık ve karanlıkta kök büyümesi üzerine biyolojik aktiviteleri açısından etkili bir inhibitör olduğu bulunmuştur. Yan zincirdeki karboksilik grubun kök büyümesini engellediği rapor edilmiştir.

Zhou ve diğ., 2013'de yaptıkları çalışmada kumarin uygulamasının *Medicago sativa*'daki büyüme üzerindeki etkileri, net nitrat alımına, nitrat konsantrasyonuna (NO_3^-) ve amonyum (NH_4^+) konsantrasyonuna, çözüner proteinlerin miktarına ve nitrat redüktaz (NR), glutamin sentaz (GS) ve glutamat Dehidrogenaz (GDH) aktivitelerini incelemişler. Yonca fidelerini kumarin 0, 0,025, 0,05, 0,1 ve 1 mM kumarin konsantrasyonlarına maruz bırakılmışlar. Yüksek konsantrasyonda kumarin ($\geq 0,1$ mM), sürgünlerde ve köklerde taze ağırlık üretimini ve kök/gövde gelişim oranını düşürdüğu belirtilmiştir. 0,025 ve 0,05 mM kumarine maruz kalan fidelerde, net nitrat alım miktarı önemli ölçüde uyarılmış ancak 0,1 ve 1 mM'de azalmıştır. 0,05 mM kumarin uygulaması, NO_3 içeriğini belirgin bir şekilde arttırırken, 0,1-1 mM aralığında uygulanan kumarin NO_3 içeriğini azalmıştır. Amonyum (NH_4^+) seviyesi ise 0,025 ila 0,1 mM arasında azaldığı, 1 mM'de yükseldiği ağıklanmıştır. NR aktiviteleri yüksek kumarin konsantrasyonunda bastırılmış, GS seviyeleri 0,05 mM'de arttırmışken, 1 mM'de azaldığı rapor edilmiştir. En yüksek kumarin konsantrasyonunda, GDH faaliyetlerinin köklerde engellendiği belirtilmiştir.

Li ve Gao 2011'de yaptıkları çalışmada kumarin türevi 4-metilumbelliferon'un (4-MU) *Arabidopsis thaliana*'daki birincil kök büyümesini azaltarak tohum çimlenmesini engellediğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, 4-MU muamelesi yanal kök uzama ve yoğunluğa yol ağığı ağıklanmıştır. 4-MU hipokotil oluşumuna ve

oksinini dağılımında, katkıda bulunduğu görülmüş ve 4-MU'nun, oksin ile kök dallanmasını incelemek için faydalı bir kimyasal araç görevi yapacağını önermişlerdir.

Abenavoli ve diğ. 2003'de yaptıkları çalışmada allelokimyasal bir bileşik olarak tanımladıkları kumarini (1,2 benzopiron) *Daucus carota* üzerine uygulamışlardır. Bu bitki üzerindeki hücre büyümesine ve nitrat alımına, amonyum ve karbonhidratların kullanımı üzerine etkilerini incelemek için bitki kültürü oluşturmuşlardır. Kumarine mikromolar seviyelerine maruz kalınması, özellikle ikinci günden itibaren hücre büyümesinin ciddi inhibisyonuna neden olduğu belirtilmiş. 50 µmol / L kumarin varlığı, hücre kültüründe serbest amino asitler ve amonyum birikimine neden olmuş ve glutamin sentetaz, glutamat dehidrojenaz, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz ve fosfoenolpiruvat karboksilaz aktivitelerini uyardığı ve malat dehidrojenazın aynı koşullar altında inhibe edildiği açıklanmıştır. Bu etkiler, protein katabolizmasının uyarılması ve/veya kumarin tarafından indüklenen protein biyosentezi ile müdahale açısından yorumlanmıştır. Aynı şekilde bu araştırmacılar da kumarinin hücre döngüsünün bir inhibitörü olarak yaşlanmayı teşvik eden madde olarak hareket edebileceğini öngörmüşlerdir.

Abenavoli ve diğ. 2004'de yaptıkları çalışmada mısır fidelerinde (*Zea mays* L. cv. cecilia) kumarinin etkilerini incelemişlerdir. Mısır fideleri 6 gün süreyle hidroponik bir kültürde yetiştirilmiş ve daha sonra besleyici çözeltiye kumarin (0, 25, 100 ve 400 µM'lik konsantrasyonlarda) eklenmiştir. Kumarin kök uzunluğunu engellemiş, ancak etkileri kök türüne göre değişiklik göstermiştir. 1 ve 0,25 mM kumarin konsantrasyonunun, radikal, seminal ve nodal kök uzunluklarını sırasıyla % 50 azaltmak için yeterli olduğu belirtilmiştir. En yüksek kumarin konsantrasyonunda, kök bölgesinin en alt kısmı şişme göstermiştir. Ayrıca, kumarin yarı köklerin sayısını ve dallanma yoğunluğunu seminalde kök köklerinden daha fazla düşürmüştür. Bu sonuçlar ile bitkinin kumarine karşı: nodal> seminal> radikül bitkinin köklerinin daha hassas olduğunu göstermiştir.

Lupini ve diğ. 2010'da yaptıkları çalışmada kumarinin üç farklı mısır primer kök bölgesinde, geçiş bölgesi ve iki büyümeyen bölgede kök uzama hızı üzerindeki allelokimyasal etkilerini incelenmişlerdir. Kök bölgelerindeki ATPaz aktivitesi, pH

değişiklikleri ve hücre zarı potansiyelleri değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre kumarinin kök geçiş bölgesinde kök uzama hızını arttırdığı böylelikle ATPaz aktivitesinin artması ve proton miktarının değişikliğine, hücre membran potansiyelinin hiperpolarizasyonu ile izlenen geçici bir depolarizasyon oluştuğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca mısır kökünün iki büyümeyen kök bölgesinde belirgin olmadığını açıklamışlardır. Birinci büyümeyen kök bölgesinde kumarin uygulamasının kök büyüme hızını değiştirmedığı ancak bir membran depolarizasyonuna neden olduğunu; ikinci büyümeyen kök bölgesinde ise çoğunlukla allelokimyasala duyarsız olduğunu belirtmişlerdir. Bu veriler ile, mısırın birincil kök ucundan 20 mm'lik bir kesitte kumarine duyarlı olduğunu, ancak daha uzaktaki büyümeyen kök bölgesinde kumarin kaynaklı fizyolojik değişikliklere sebep olmadığını ileri sürmüşlerdir.

Al-Wakeel ve diğ. 2013'de yaptıkları çalışmada Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich'in neden olduğu kömür çürüğü hastalığına karşı kumarin ve salisilik asit ile üç farklı düzeyde (0,3, 1,0 ve 3,0 mM) uygulama yapmışlardır. Ayçiçeği çekirdeğinin 0,3 mM kumarin veya 1,0 mM salisilik asit ile hazırlanması, hastalık şiddetinin azalmasına neden olduğunu ve sera koşullarında kök lezyonlarının uzunluğunda yaklaşık % 50 koruma ve % 80'den fazla azalma sağladığı belirtmişlerdir.

Pergo ve diğ. 2008'de yaptıkları çalışmada dokuz farklı bitki çeşidini; *Bidens pilosa* L.'ye karşı fitotoksisite açısından taramışlardır. 500 µM'lik bir kumarin konsantrasyonunda *Senna obtusifolia* L., *Euphorbia heterophylla* L. ve *Ipomoea grandifolia* L. bitkilerinin çimlenmesi ve büyümesi üzerinde çok az etkili olduğu belirtilmiştir. Buna karşı 10-100 µM'lik bir kumarin konsantrasyonunda *B. pilosa* L.'da çimlenmesinin inhibe edildiğini bulmuşlardır. Çalışmada, kumarinin çimlenmeyi geciktiren bir sitotoksik ajan gibi davrandığı bulunmuştur.

Saleh ve Madany (2015)'de buğday tohumlarının tuzluluk stresine karşı dayanıklılığını artırmak için kumarinin potansiyelini araştırmışlardır. Buğday tohumlarını kumarin (50 ppm) ile kaplamışlar ve daha sonra iki hafta boyunca farklı NaCl seviyeleri (50, 100, 150 mM) altında büyütmüşlerdir. Kumarin ön muamelesi ile çözünebilir şekerler ve prolin gibi ozmolitlerin birikiminden dolayı, kumarin

muamele edilmemiş fidelere nazaran tuzluluk altındaki buğday fidelerinin büyüdüğünü gözlemlemişlerdir. Ayrıca, kumarin uygulamasının tuz stresi altındaki bitkilerin sürgünlerinde K^+/Na^+ oranını belirgin şekilde arttırdığı bulunmuştur.

Saleh ve Abu El-Soud 2015'de yaptıkları araştırmada kumarinin gibberellin gibi davranıp davranmadığı hakkında veriler sunmuşlardır. Deneylerini, gibberellin biyosentez inhibitörü paklobutrazol (P) ile kombinasyon halinde farklı zaman aralıkları içinde ve farklı konsantrasyonlarda kumarin ile muamele edilmiş endospermik (embriolarından çıkarılan) ve embriyonik buğdaylar ile gerçekleştirmişlerdir. Sonuçlar, kumarin ile muamele edilmiş aleuron katmanı hücrelerinde amilaz sentezi ve sekresyonun uyarılmasına neden olduğunu göstermiştir. Paklobutrazolun ise sentezi etkilemediği belirtilmiştir. Bununla birlikte, buğday tohumlarının çimlenme yüzdesi ve fide büyümesi konsantrasyona bağlı olarak kumarin tarafından engellendiği bulunmuştur. Bu çalışma, kumarinin gibberellin benzeri bir etkiye sahip olduğunu ve çimlenme aşamasında ve fidan oluşumunda etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Asif 2015'de yaptığı araştırmada insan sağlığı açısından kumarin ve türevlerini değerlendirmiştir. Bazı doğal kumarinlerin etnofarmakolojik ve biyolojik özellikleri araştırılmıştır. Kumarinler, furanokumarinler (psoralen) ve ksantotoksinin varlığı ile anti-inflamatuar, antimikrobik, öksürük ve soğuk algınlığı ve anti-artrit özelliği göstermiştir. *Angelica archangelica*'dan elde edilen basit bir kumarin olan osthol, ligand-reseptör etkileşimleri ve reseptör aracılı hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonları ile ilgili araştırmalar için yararlı bir bileşik olduğu açıklanmıştır. Kumarinlerin, doğal biyolojik kontrollü antipatojenik bileşikler olarak bitkiler için ve hiperproliferatif cilt hastalıklarına karşı ilaç olarak insanlar için yararlı olabileceği belirtilmiştir.

Araniti ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada yabancı otları öldürücü bileşiklerin araştırılmasında üç sentetik kumarinin türevinin *Amaranthus retroflexus* ve *Echinochloa crus'ın* çimlenmesi ve kök gelişimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Ayrıca sentetik kumarinlerin muhtemel fizyolojik etkilerini belirlemek için *Arabidopsis thaliana* model türlerinde deneye dahil etmişlerdir. Sentezledikleri tüm kumarin türevleri her iki yabancı tohum çimlenmesini ve kök gelişimini etkilemiştir.

Sentetik kumarinlerin yabancı ot çimlenmesine etkisinin, 50-115 μM arasında değişen ED50 değerlerinde olduğu belirtilmiştir. Sentetik kumarinlerin tümü *Arabidopsis* sürgününde ve kök gelişiminde kuvvetli bir fitotoksik potansiyele sahip olup, taze ağırlıkta (ED50 değerleri $\leq 60 \mu\text{M}$) güçlü bir azalmaya neden olmuş, yaprak gelişimi ve pigment içeriğinde de azalma meydana gelmiştir. Ayrıca, kök gelişiminde (ED50 değerleri $\leq 170 \mu\text{M}$) güçlü bir değişikliğe ve kök uç anatomisinde morfolojik değişimlere neden olmuştur. Sonuçlar birlikte ele alındığında, bu bileşiklerin umut verici potansiyel herbisit etkinliğinin olabileceği vurgulanmıştır.

Niro ve diğ. 2016'da yaptıkları çalışmada, farklı dozlardaki kumarinin (0, 100, 200, 300 mg kg⁻¹ kuru toprak) bir yabancı ot (yulaf yulafı), ekin (buğday) ve mikrobik topluluk üzerindeki etkilerini doğal toprak koşullarında incelemiştir. Sonuçlar, kumarinin sürdürülebilir tarımda önemli bir potansiyele sahip doğal herbisit olduğunu ve en iyi hasar-fayda oranının 100-150 mg kg⁻¹ kuru toprak aralığındaki dozlarda gözlemlendiğini ortaya koymaktadır.

Grana ve diğ. (2017) yaptıkları araştırmada kumarin grubuna ait doğal bir bileşik olan skopoletin etki mekanizması ve fitotoksik potansiyelini ayrıntılı olarak değerlendirmişlerdir. Işık ve elektron mikroskopisi ile yapılan analizler ile hücre çeper deformasyonları, çok çekirdekli hücreler, anormal çekirdekler ve doku düzensizliği gibi köklerde hücre ve doku anormallikleri göstermiştir. Doğal bileşik skopoletin ve auxin herbisidi 2,4-D'nin yapısal benzerliklerini araştırmışlar ve skopoletin *Arabidopsis* köklerine auxin herbisidi 2,4-D gibi davrandığını bulmuşlardır.

Saleh ve Kebeish 2017'de yaptıkları araştırmada kumarin ve türevlerinin hücresel, doku ve organ seviyeleri üzerinde çeşitli fizyolojik etkileri sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada kumarinin hormonal benzeri davranışlarla ilgili ve fitormonların aktivitesi ile olan etkileşimi hakkında araştırma yapmışlardır. Ayrıca kumarinin buğday tohumlarının aleuron katmanlarında redoks homeostazına etkisi araştırılmıştır. Aleuron katmanları, tek başına ve 5 μM abscisik asit (ABA) ile ayrıca 1000 μM kumarin ve 5 μM gibberelik asit (GA3) içinde inkübe edilmiştir. Sonuçlar hem kumarin hem de GA3 uygulamalarının α -amilaz üretimini indüklediğini, ancak süperoksit dismutaz, katalaz ve askorbat peroksidaz aktivitelerini inhibe ettiğini

ortaya koymuştur. Kumarin ve GA3 tarafından antioksidan enzimlerin downregülasyonu hem H₂O₂ hem de malondialdehitin önemli birikimine sebep olmuştur. Bu çalışma ile kumarinin gibberellin benzeri aktivitesi gösterebileceği belirtilmiştir.

Lupini ve diğ. 2014'de yaptıkları çalışmada kumarinin, bitki-bitki etkileşimleri ve iletişimde anahtar rol oynayan oldukça aktif bir allelopatik bileşik olarak tanımlamışlardır. Kumarinler kök büyümesini ve birçok türün gelişimini etkilemektedir, ancak etki tarzı henüz açıklığa kavuşmamıştır. Oksinin kök sistemi üzerindeki kumarin kaynaklı etkilere aracılık edebileceği hipotezini ileri sürmüşlerdir. *Arabidopsis thaliana*'da kök sisteminin geliştirilmesinde kumarin ve oksin arasındaki etkileşim araştırılmıştır. Ayrıca, kumarin ilavesi, yanal kök oluşumunun inhibisyonuna neden olan iki oksin transport inhibitörü olan TIBA ve NPA'nın olumsuz etkilerini artırmıştır. Bu sonuçlar, *A. thaliana*'daki kök gelişiminde kumarin ve oksinin arasında fonksiyonel bir etkileşim olduğunu ortaya koymuştur.

Taşdemir ve diğ. 2017'de yaptıkları çalışmada sıçanlarda lipid düşürme etkisi açısından kumarin ve bazı kumarin türevlerini (esculetin, skoparon ve 4-metilumbelliferon) araştırmışlardır. Deney grubuna 12 saatlik aralıklarla kumarin ve kumarin türevleri eskümin (35 mg / kg), skoparon (35 mg / kg), 4-metilumbelliferon (35 mg / kg) veya kumarin (30 mg / kg) uygulanmıştır. Hayvanlar, toksik CCl₄ dozu verilmeden önce esculetin, scoparone veya 4-methylumbelliferone türevlerini kullanmışlardır. CCl₄ ile muamele edilen grupta serum total kolesterol (TK), trigliserid (TG), çok düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (VLDL-C) ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-C) değerleri anlamlı olarak artmıştır, (p <0,05, p < 0,01, p <0,01 ve p <0,05), serum HDL-K düzeyleri düşmüştür (p <0,01).

Born ve diğ., (2003) ve Demiralay (2005) yaptıkları araştırmalarda kumarin türevi olan kalanolidin HIV virüsüne karşı inhibitör olarak kullanıldığını, bir başka kumarin türevi olan clemincosin A.'nın, tümörleri durdurucu etkiye sahip olduğu bulmuşlardır. Amino kumarinler ve bazı kumarin türevlerinin antibakteriyel etkisi ve biyolojik aktivitesi olduğunu saptamışlardır.

Traykova ve Kostova, 2005'de ve Wu ve diğ., 2007'de yaptıkları araştırmalarda kumarinin reaktif oksijen türlerinin oluşumunda ve bunların süpürülmesinde rol

olarak, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı kontrol altına aldıklarını belirtmişlerdir. Kumarinin ayrıca DNA onarımında, hasar görmüş SOD, CAT, GPx enzimlerinin aktivitelerinin düzenlenmesinde, immün savunmada yer alan kinon oksiredüktaz, glutatyon- s transferaz, glutatyon sentetaz gibi enzimlerin aktivitesini arttırmada ve ksantin oksidaz enziminin aktivitesini düşürerek, O₂^{•-} üretimini azaltmada rol oynadığını rapor etmişlerdir.

Turan 2005’de yaptığı çalışmada fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerini; lipit köklerini kararlı bileşikler haline dönüştürerek zincir tepkimesini kırarak gösterdiğini belirtmiştir. Doğa içinde geniş bir şekilde yayılmış olan fenolik bileşenlerin antioksidan aktivitelerinin, bunların konjuge olmuş halka yapıları ve hidroksil gruplarıyla ilgili olduğunu ileri sürülmüştür. Orto- veya para- pozisyonunda ikinci bir hidroksil grubunun bulunmasının ek rezonans stabilizasyonu ve o-kinon veya p-kinon oluşumundan dolayı antioksidan aktiviteyi artırdığı bildirilmiştir.

Traykova ve Kostova 2005’de yaptıkları çalışmada kumarin türevlerinin antioksidan özelliklerinin iskelet yapılarına göre değişkenlik gösterdiklerini belirtmişlerdir. Antioksidan aktivite özellikleri flavonoid halkasındaki -OH gruplarının varlığında artarken, -OCH₃ gruplarının varlığında azaldığını belirlemişlerdir. Kumarin alımından sonra lipit peroksidasyonunun, MDA miktarının azaldığı da gözlenmiştir. 3-hidroksikumarin, 3-asetilaminokumarin , 3-aminokumarin, ve 3-kumarin karbonik asit ile çalışıldığında fonksiyonel gruplarına göre tüm kumarin türevlerinin de MDA miktarında azalma sağladıkları belirtmişlerdir.

Rodriguez ve diğ. 2011’de hidroksikumarin gibi fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi, o bileşikte bulunan -OH gruplarının varlığına, yer aldığı konuma ve halkadaki konjugasyon ve rezonans etkisine bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Bu tür fenolik bileşiklerin eşleşmemiş elektrona sahip serbest radikale kendi H• atomunu aktararak, serbest radikalleri ortamdaki uzaklaştırdığını rapor etmişlerdir.

Lin ve diğ. (2011) ve Traykova ve Kostova (2005) yaptıkları çalışmada dihidroksikumarinlerin monohidroksikumarinlere göre daha iyi antioksidan aktivite gösterdiklerini belirtmişlerdir. -OH gruplarının pozisyonunun da önemli olduğunu, -OH gruplarının kumarinin iskelet yapısında, C6 ve C7’de yer almasının o kumarinin mantar kaynaklı tirozinaz enzimini inhibe etmesinde önemli bir role sahip olduğunu

bulduğunu açıklamışlardır. 6,7-dihidroksi-4-metilkumarin bileşiğinin de çok iyi bir radikal giderici olduğunu bulmuşlardır. Dihidroksikumarinde eğer iki -OH grubu orto pozisyonda yer alıyorsa, o kumarinin $O_2^{\cdot-}$ ve ROO^{\cdot} radikallerini gidererek lipid peroksidasyonunu engellediği gözlenirken, Fe^{3+} iyonunun varlığında bu bileşiğin OH^{\cdot} üretimine yardım ettiği ve dolayısıyla bir oksidan olarak davrandığını gözlemişlerdir. Dolayısıyla kumarinlerin yapısına ve oksidatif stresin kaynağına bakarak, kumarinlerin hem antioksidan olarak hem de oksidan olarak rol oynadığı rapor etmişlerdir.

Ferguson ve diğ., 1985'de ve Sanyal ve diğ., 1997'de yaptıkları araştırmalarda tannik asit, kumarin, vanilin, kafein ve sinamik aldehit gibi fenolik bileşiklerin memeli hücrelerinde mutajenik etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Stopper ve diğ. 2005'de yaptıkları çalışmada fenolik bileşiklerin yüksek dozlardaki genotoksik etkilerini DNA interkalasyonu, DNA topoizomeraz II hasarı, serbest radikal üretimi ve anahtar enzimlerin inhibisyonu gibi mekanizmalarla gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir.

Hopa 2010'da yaptığı çalışmada biyolojik aktivite potansiyeli yüksek birçok türeve sahip yeni kumarin türevleri ve şu an ilaç sanayiinde kullanılan ve insanlar tarafından kolay ulaşılabilen etken maddesi varfarin sodyum kumarin türevi olan ilacı; insan eritrositlerindeki G6PD enziminin aktivitesi üzerindeki inhibisyon veya aktivasyon üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Buldukları sonuçlara göre yeni kumarin türevlerinin G6PD enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Danış (2003) ve Greaves (2005) yaptıkları araştırmalarda kumarinlerin K vitamini döngüsünden sorumlu olan vitamin K epoksit redüktaz enzimini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Mueller (2004) kumarin tedavisinin tekrarlanan venöz tromboemboliyi önlemede % 90'ın üzerinde etkili olduğunu göstermiştir.

Verilen bilgilerden de anlaşılacağı gibi, bitkisel kaynaklı metabolitlerin geçmişten günümüze farklı amaçlarla kullanıldığı görülmektedir. Özellikle yaşamımızın hemen her alanına girmiş ve farklı biyolojik aktiviteye sahip sekonder bileşikler birçok bitkiye karşı allelopatik etki gösterirken (Kobayashi ve diğ., 2008; Mutlu ve Atici, 2009) bunun yanı sıra bazı organizmalara karşı da antioksidan (Gkinis ve diğ., 2010;

Güllüce ve diğ., 2007), antibakteriyel (Güllüce ve diğ., 2007; Shafaghat, 2011), nematod öldürücü (Ntalli ve diğ., 2010) ve repellent (kovucu) (Kim ve diğ., 2010) etki oluşturabilmektedir. Model canlı olarak ökaryotik bitkilerin seçilmesi, toksik dozların miktarını belirlemenin yanı sıra, sitotoksisite, genotoksisite ve çeşitli fizyolojik parametrelerin ölçülmesini kolaylaştıracaktır.

Her ne kadar herbisit, insektisit ve fungusit gibi ekolojik rollere sahip oldukları düşünülen bu allelokimyasallara karşı insanoğlunun ilgisi, sentetik pestisitlerin olumsuz etkilerine bağlı olarak artmışsa da (Sampietro ve diğ., 2009) özellikle bu tür bitkilerden elde edilen bu doğal bileşiklerin etki ettiği organizmanın genetik yapısında nasıl bir hasar meydana getirdikleri tam olarak bilinmemektedir. Ancak sentetik herbisitlerin sebep olduğu gibi kalıcı hasarlarla karşılaşmamak için bu amaçla kullanılacak allelopatik etkiye sahip kimyasalların etki mekanizmalarının araştırılıp açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

Yoğun ve bilinçsiz bir şekilde kullanılan kimyasalların yararlarından ziyade insanlar ve diğer hayvanlar için pek çok potansiyel zarar oluşturduğu bilinmektedir. Bu kimyasallar ekolojik sistem içinde önce hava, su ve toprağa geçerek oradan da buralarda hayatlarını sürdüren diğer canlıları etkilemekte ve dönüşüme uğramaktadır. Çevreye salınan kimya maddelerinin etkisi kısa ya da uzun süreli ve geçici ya da kalıcı olabilir. Bunların ayrıca ekonomik, sosyal ve çevresel zararları da olacaktır. Kimyasalların kolaylıkla biyolojik ayrışmaya uğramayan yapısı, uygulandıkları ve taşındıkları çevrede dirençli olarak kalmalarına neden olur. Bu bazen çeşitli hastalıkları kontrol etmede avantaj olarak algılansa bile, kimyasal maddelerin çevrenin diğer kısımlarına çeşitli zararları bulunmaktadır. Bu bize kimyasal maddelerin olumlu olarak etkilediği organizmaların dışındaki diğer canlılara ve çevreye olumsuz etkilerinin olduğu gerçeğini unutmamız gerektiğini hatırlatır.

Bitkide savunma elemanı olarak kullanılan ve allelopatik etkiye sahip olan bu bileşiklerin, günümüzde tarım, gıda, kozmetik, tıp gibi birçok alanda aktif olarak kullanımları, etki mekanizmalarının açıklanmasını gerektirmiştir. Sekonder bileşiklerin allelopatik ve toksik etkilerinin tam olarak anlaşılması için sitolojik, genetik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerin beraber yürütülmesinde fayda vardır. Bu çalışmada bitkilerde sekonder bileşik olan kumarinin etkisinin *L.culinaris*

üzerinde oluşturacağı sitotoksik, biyokimyasal ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi sağlayacağından daha sonra yapılacak araştırmalar için önemli bir veri kaynağı olacaktır. Bu çalışmada, kumarin maddesinin model organizma olarak seçilen *L. culinaris* Medik. üzerindeki etki mekanizmalarının ortaya çıkarılması amaçlandı. Bunu gerçekleştirmek için hücre bölünme frekansını yansıtan ve büyüme gelişme oranını belirlemede önemli bir parametre olarak kullanılan MI testi (Gönen, 2007) ve kromozom anormalliklerinin belirlenmesi sitolojik ölçümler için kullanıldı. Genetik toksikoloji ölçümleri için, son zamanlarda sıkça kullanılan RAPD tekniğı (Cenkçi ve diğ., 2009; Pamidimarri ve diğ., 2009; Kanchanaketu ve diğ., 2012) kumarinin neden oldukları genetiksel değışimleri belirlemek için kullanıldı. Farklı kimyasallarla muamele sonucunda bitki genotipinde polimorfizm meydana gelebileceğı için RAPD tekniğı ile polimorfizm oranlarıyla genomik kararlılıkları ölçüldü. Genotoksik kimyasalların etkilerinin direk olarak DNA'dan ölçülmesinin avantajı; yüksek duyarlılık ve toksik kimyasallara yanıtın kısa sürede olmasıdır. Ayrıca örneklerin çözümler protein konsantrasyonları ile SDS-PAGE profilleri de belirlendi. Ayrıca MDA, Prolin ve H₂O₂ miktarları ölçüldü. Alfa amilaz, katalaz ve süperoksit dismutaz enziminin aktivitelerine bakıldı. Katalaz, Cu/Zn SOD ve Mn SOD genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR kullanılarak belirlendi.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, Eskişehir Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden mercimek (*L. culinaris* medik cv. Sultan) tohumları ticari olarak temin edildi. Kumarin ayrıca ticari olarak satın alındı. Öncelikle probit analizi ile kumarinin *L.culinaris* üzerindeki EC50 ve 2xEC50 değerleri belirlendi. EC50 ve 2xEC50 değerlerinin *L.culinaris*'de sitolojik incelemeler için kök uzaması, mitotik indeks, çimlenme yüzdeleri, kromozom anormallikleri araştırıldı. Biyokimyasal incelemeler için total protein miktarlarında meydana gelen değişime, SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi) ile protein bant profillerinin ve moleküler ağırlıklarının değişimlerine bakıldı. Alfa amilaz, katalaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin aktivelerindeki değişim ve MDA, prolin ve H₂O₂ miktarlarının değişimleri saptandı. Genotoksik incelemelerde EC50 ve 2xEC50 değerleri uygulanmış *L.culinaris*'de kök uçlarından genomik DNA izolasyonu yapıldı ve RAPD-PZR yöntemi ile polimorfizmin saptandı. Ayrıca stresör enzimlerinden katalaz, Cu/Zn SOD ve Mn SOD enzimlerinin RT-PZR uygulamaları ile mRNA ekspresyon seviyeleri belirlendi. Kumarin Hoagland çözeltilisinde de çözülerek sıvı formda kullanıldı.

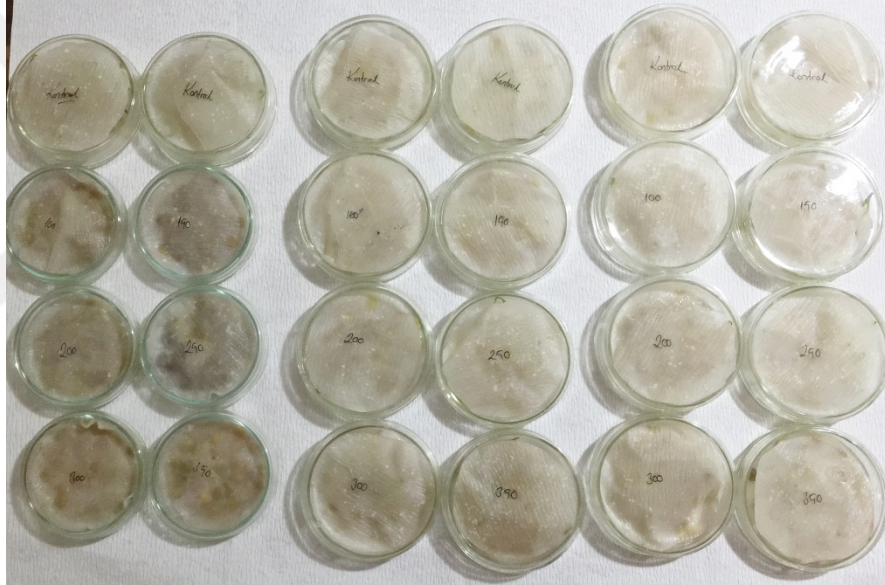
3.1. Bitkisel Materyalinin ve Etken Maddenin Eldesi

Bitkisel materyal olarak seçilen *L. culinaris* Medik. cv. Sultan tohumları ticari olarak Eskişehir Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi. Kumarin katı halde ticari olarak (Sigma) temin edildi.

3.2. EC50 Belirleme

Kumarinin farklı konsantrasyonlarının *L.culinaris* üzerinde, 72 saatlik EC50 değeri, probit analiz metodu uygulanarak hesaplandı. Kumarin Hoagland ile seyreltilerek kullanıldı. Seyreltme işlemi, US EPA tarafından önerildiği gibi en az 6 farklı ve birbirlerinin katları olan konsantrasyonlar hazırlanarak yapıldı. Her bir etken maddeden x/4, x/2, x, 2x, 4x, 8x konsantrasyonlarının hazırlanması Hoagland besi

yeri kullanılarak yapıldı. Yirmişer adetlik gruplar halinde seçilen tohumlar önce %20'lik etil alkol çözeltisinde 5 dakika, daha sonra %5'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 5 dakika bekletilerek yüzeysel sterilizasyon yöntemi (Ellis ve diğ., 1988) ile üzerlerine yapışmış bakteri ve mantarlardan temizlenerek distile su ile yıkandı. 20x14x6 cm boyutlarında petri kapları kullanıldı. Petrilere alınan tohumlar 10 ml'lik etken maddeler içinde konularak bir hafta boyunca en az üç tekrarlı olarak ön denemeler gerçekleştirildi (Şekil 3.1). Kontrol olarak sadece Hoagland besiyerinde çimlendirme yapıldı. 0,5 cm ve üzerindeki kök uçları çimlenmiş olarak değerlendirildi. EC50 değeri belirlendikten sonra, uygulama çözeltileri olarak EC50 ve 2xEC50 olmak üzere iki farklı konsantrasyon kullanılarak deneylere devam edildi. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarında EC50 ve 2x EC50 değeri belirlenirken kurulan deney düzeni

Probit analiz yöntemi, multidisipliner alanlarda doz-yanıt deneylerinin ve iki değişkenli deneylerin analizi için kullanılan bir regresyon türüdür. Probit tabloları oluşturularak, probit formülü ile veya SPSS istatistik analiz programları aracılığıyla hesaplanabilir (Vincent, 2010).

Zehir-ölüm etkisinin araştırıldığı çalışmalarda %50 ölümle sonuçlanan uyarıcı seviyesinin değerli bir istatistik olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu etki düzeyine LD50 (deney materyalinin yarısını öldüren) denilmiştir. Uyarıcının seviyesinin ölüme neden olup olmadığı deneylerde EC50 (%50'sini etkileyen seviye) tanımlaması

yapılmıştır (Finney, 1971). Probit analizi, SPSS istatistik programı içerisinde çalıştırılmaktadır. Veri girişleri % inhibisyon, tohum sayısı kullanılan konsantrasyonlar gibi verilerle olmaktadır. Program; girilen veri türünü istatistiksel olarak hesaplayıp, % 1 den % 99'a kadar etkin konsantrasyonu tahmin etmektedir. Program çıktısına ait örnek EK 1'de gösterildi.

3.3. Sitolojik Analizler

3.3.1. Çimlenme yüzdesi ve kök uzunlukları değerleri

Çalışmamızda 24, 48 ve 72 saat muamele edilen *L.culinaris* tohumlarının kumarinin farklı konsantrasyonları ile muamelesi sonucunda, çimlenme yüzdesindeki değişime göre kök uzunluklarına ait ortalama ve standart hata değerleri hesaplandı. SPSS 18 programında yapılan istatistik analizleri ile sonuçlar değerlendirildi. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi

3.3.2. Mitotik indeks ve kromozom anormalliğinin belirlenmesi

Kumarin uygulaması sonrasında gelişen kök uçlarından 1-2 cm uzunluğunda kesilen örnekler Carnoy fiksatifine (3 birim % 95' lik etil alkol:1 birim glasiyal asetik asit) alınarak 24 saat +4°C'de bekletildi. Bu işlem sonunda kökler % 70' lik etil alkol içerisine alınarak kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi. Bütün kök uçları aynı gün sabah saat 8:30'da alındı. Mitoz bölünmenin incelenmesi amacıyla %2'lik aseto-orsein ile ezme preparasyon yapıldı. Meristem dokusu hücrelerinin ayrılıp kolay görüntülenebilmesi için hidroliz işlemi uygulandı. %70'lik etil alkol içerisinden alınan kök uçları 1 N HCl' de saat camında, bek aleviyle hidroliz edildi. Boyama için stok olarak hazırlanmış olan %2'lik aseto-orsein yarı yarıya seyreltilerek kullanıldı. %1'lik boyanın kullanımından önce örnekler 9:1 (aseto-orsein:HCl) oranında 1 N HCl bulunan saat camına alındı. Bunun amacı, saat camı içerisinde ve bek alevinin üzerinde boyama yapılırken, aynı zamanda hidrolizi de sağlamaktır. Saat camı içerisinde boyanmış ve hidroliz edilmiş olan kökler lam üzerine alınarak %1'lik aseto-orseinle tekrar boyanarak biraz bekletildi. Üzerine lamel kapatılarak ezme-yayma preparat tekniği uygulandı. Sitolojik incelemelerde bilgisayara görüntü aktarma ve floresans ataçmanına sahip olan Olympus BX51 marka araştırma mikroskobu kullanıldı. Hazırlanan ezme preparatların her birinden en az 5000'er hücre sayılarak, mitotik indeks hesaplandı (Denklem 3.1). Bölünen

hücre sayısının toplam hücre sayısına bölünerek 100 ile çarpılmasıyla mitotik indeks yüzdesi belirlendi;

$$\text{Mitotik indeks (\%)} = (\text{Bölünen Hücre Sayısı}) / (\text{Toplam Hücre Sayısı}) \times 100 \quad (3.1.)$$

Mitoz bölünmenin değişik safhalarındaki hücreler incelenerek; kromozomlardaki anormallik çeşitleri (mikronukleus, kalın kromozom, kromozom köprüleri, c-mitoz, polarite, v.b.) ve frekansları araştırıldı. SPSS 18 programında yapılan istatistik analizleri ile sonuçlar değerlendirildi. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.4. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler, toplam protein analizi, SDS- PAGE tayini, prolin, lipid peroksidasyonunun ölçülmesi, hidrojen peroksit tayini, α -amilaz, katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinin ölçülmesi olarak gerçekleştirildi. Deney sonuçlarının belirlenmesi için 3 biyolojik ölçüm alındı. Sonuçlar belirlendikten sonra deney grupları arasındaki farklılığın istatistiksel analizi, SPSS 18.0 programında ANOVA testi ile yapıldı.

3.4.1. Toplam protein analizi

3.4.1.1. Reaktif hazırlanması

50 mg coomassie brilliant blue G-250, 25 mL % 95'lik etanolde çözüldü. Daha sonra 50 mL orto fosforik asit eklendi. Son hacim saf suyla 500 mL' ye tamamlandı. Çözelti filtre kağıdıyla süzülerek kullanıma hazırlandı.

3.4.1.2. Protein standardının hazırlanması

Mercimek tohumlarının protein içeriği Bradford'a (1976) göre gerçekleştirildi. Buna göre stok çözelti Bovine Serum Albumin (BSA)'den hazırlandı. Bu amaçla 4 mg/mL' lik stok ampul BSA' dan 0,4, 0,8 mg/mL, 1,6 mg/mL, 2,4 mg/mL, 3,2 mg/mL ve 4 mg/mL alınarak deney tüplerine aktarıldı (Tablo 3.1). Hacim 100 μ L oluncaya kadar PBS (Phosphate Buffered Saline) tampon çözeltisi ilave edildi. Deney tüplerinin üzerine 5' er mL coomassie brillant blue G-250 eklendi. Karışım vortekslendikten 10 dakika sonra spektrofotometrede 595 nm' de köre karşı okundu

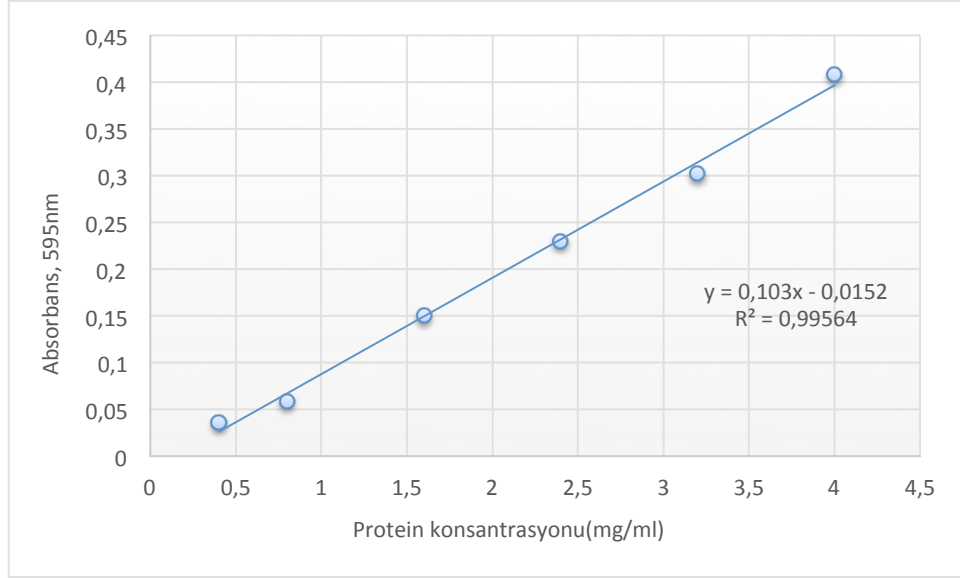
(Tablo 3.2). K r  zelti tek kullanımlık protein k vetinde, k vete PBS konularak hazırlandı. Okunan absorbands değerlerinden protein standart grafiği oluşturuldu (Şekil 3.2). Doğrunun denklemi $y= 0,103x-0,0152$, regresyon katsayısı $R^2 = 0,9956$ 'dır.

Tablo 3.1. Protein standardı oluşturma d zeneği

| T p no | BSA | Tampon  zelti | Reaktif |
|---------------|------------|----------------------|----------------|
| 1. | 0,4 mg/mL | 90  l | 5 ml |
| 2. | 0,8 mg/mL | 80  l | 5 ml |
| 3. | 1,6 mg/mL | 60  l | 5 ml |
| 4. | 2,4 mg/mL | 40  l | 5 ml |
| 5. | 3,2 mg/mL | 20  l | 5 ml |
| 6. | 4 mg/mL | 0  l | 5 ml |

Tablo 3.2 Protein konsantrasyon ve absorbands değerleri

| T p no | Protein konsantrasyonu | Absorbans |
|---------------|-------------------------------|------------------|
| 1. | 0,4 mg/mL | 0,036 |
| 2. | 0,8 mg/mL | 0,059 |
| 3. | 1,6 mg/mL | 0,151 |
| 4. | 2,4 mg/mL | 0,23 |
| 5. | 3,2 mg/mL | 0,302 |
| 6. | 4 mg/mL | 0,408 |



Şekil 3.2. Konsantrasyonları bilinen BSA çözeltilerinin 595 nm dalga boyundaki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik

3.4.1.3. Bitki örneklerinin spektrofotometrede protein içeriklerinin ölçülmesi

48-72 saat süresince kumarin uygulanmış mercimek tohumlarından 0,5-0,6 gramlık tohum örnekleri tartılarak üzerine protein izolasyon tamponu (Tablo 3.3) konuldu. Homojenize edilmiş bitki örnekleri 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Tüpler 15 dakika 70°C'de inkübasyonu yapıldıktan sonra maksimum hızda +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 1,5 ml'lik steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve elde edilen bu protein örnekleri -20°C'de saklandı. Analizler için tohumdan izole edilen protein örnekleri -20° C' den alındıktan sonra buz üzerine konuldu. Uygulama grupları ve kontrol grubu için ayrı olarak kullanılan kuvartz küvete 100 µl protein örneği ve protein reagent brilliant blue G-250'den 3 ml eklendi. Hazırlanan örnekler 10 dakika bekletildikten sonra 595nm' de ölçüm yapıldı. Bulunan absorbans değerleri standart grafikte yerlerine konularak tohum ekstraktı içerisindeki protein miktarı hesaplandı. Tüm deneyler üç tekrarlamalı olarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.3. Toplam protein izolasyon tamponunun içeriği

| | |
|--|--|
| Toplam Protein İzolasyon Tamponu (10 ml) | 56 mM Na ₂ CO ₃ , 56 mM 2-merkaptoethanol, 2mM EDTA, %12 Sukroz, % 2 SDS |
|--|--|

3.4.2. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)

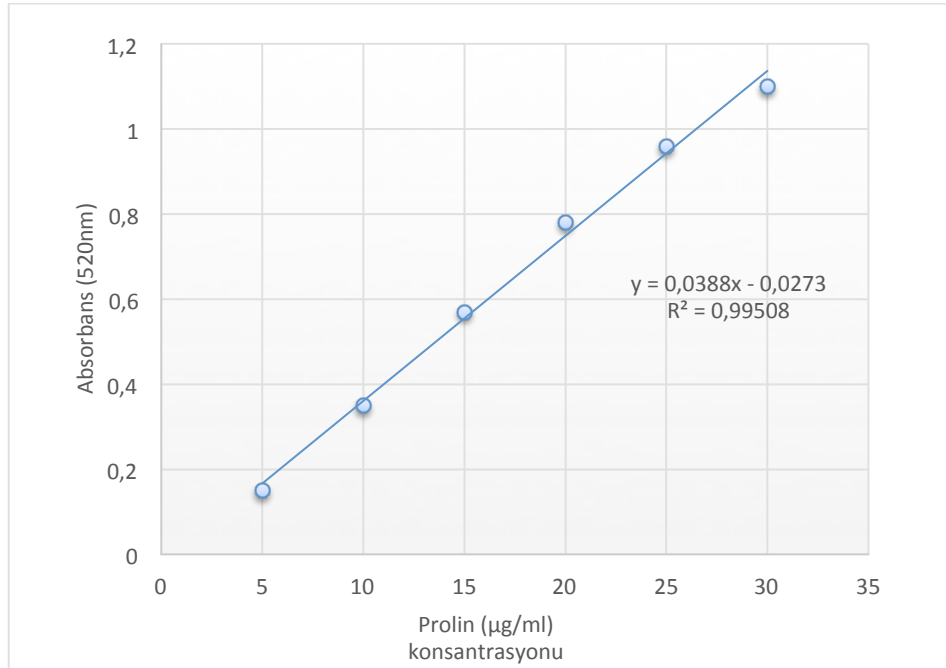
SDS-PAGE için ayırma ve yükleme jelleri olarak iki farklı jel kullanıldı (Laemmli, 1970). %12'lik ayırma jeli poliakrilamid jel Tablo 3.4'deki gibi hazırlandı. Üzerine %4 lük ön ayırma poliakrilamid jel hazırlanıp (Tablo 3.4) döküldü. Dökme işleminden sonra jelde örneklerin yüklenebileceği boşluklar oluşturmak amacıyla tarak yerleştirildi ve 1 saat bekletildi. Jel donduktan sonra tarak çıkarıldı ve iki cam arasındaki jel elektroforez tankına yerleştirildi. Analiz için 48 ve 72 saatlik kumarin uygulaması sonucunda mercimek tohumundan izole edilen protein örnekleri -20°C'den alındıktan sonra buz üzerine konularak steril distile su ile 1:10 oranında sulandırıldı ve üzerlerine 3 µl yükleme boyası konuldu. 1,5 ml lik santrifüj tüplerindeki örnekler 100° C' deki ısıtıcı blok içinde 5 dakika süreyle bekletildi ve buz üzerine alındı. Bu sürenin sonunda protein örnekleri yükleme jelindeki kuyucuklara yüklendi. Belirteç olarak Thermo Unstained Protein MW marker kullanıldı. Jelin yürümesi için güç kaynağı 180 V ve 55 dakika olarak ayarlandı. Yürüme işlemi sonlandırıldıktan sonra jel fiksasyon çözeltisinde tutularak proteinlerin jele iyice yapışması sağlandı. Jel, boyama çözeltisine alındı ve bir gece boyunca çalkalanarak bekletildi. Gece boyunca boyanan jeldeki boyama çözeltisi dökülerek jel 1 saat boyunca yıkama (Tablo 3.4) çözeltisinde çalkalandı. Yıkama işlemi sona erdikten sonra jel üzerindeki bantların moleküler ağırlıklarının hesaplanması için jelin jel görüntüleme cihazı ile fotoğrafı çekildi. Daha sonra bu jel saf su içinde +4°C'de buzdolabında saklandı. Tüm deneyler üç tekrarlamalı olarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.4. SDS-PAGE için kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanışı

| Çözelti | İçerik ve hazırlanışı |
|---|--|
| 1.5 M Tris Tamponu (pH 8.8) (100 ml) | 18,16 g tris base 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Filtre kağıdı ile filtre edildi. Otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı |
| 1 M Tris Tamponu (pH 6.8) (100 ml) | 12,11 g tris base 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Filtre kağıdı ile filtre edildi. Otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı. |
| %10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (50 ml) | 5 g SDS distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında karanlıkta saklandı. |
| %10 APS (Amonyumpersülfat) (1 ml) | 0,1 g APS distile su ile 1 ml'ye tamamlandı. Kullanımdan hemen önce hazırlandı. |
| %12 Ayırma jeli (10 ml) | 2,3 ml distile su, 5 ml Akrilamid/ Bis akrilamid(%30), 2,5 ml 1.5 M Tris (pH 8.8), 100 µl %10 SDS, 100 µl %10 APS, 4 µl TEMED |
| % 4 Yükleme jeli (5 ml) | 3,4 ml distile su, 830 µl Akrilamid/Bis akrilamid (%30), 630 µl 1 M Tris (pH 6.8), 50 µl %10 SDS, 50 µl %10 APS, 5 µl TEMED |
| 5 X Koşurma tamponu (pH 8.3) (250 ml) | 3,75 g tris base, 18 g glisin, 5 g SDS distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. +4 °C'de saklandı |
| Boyama çözeltisi (1 L) | 1 g coomassie brillant blue, 500 ml metanol, 100 ml glasial asetik asit distile su ile 1 litreye tamamlandı. Filtre kağıdıyla süzüldü. Karanlıkta oda sıcaklığında saklandı. |

3.4.3. Prolin tayini

Prolin içeriği Bates ve arkadaşları (1973) tarafından belirlenen metoda göre spektrofotometrede absorbansın ölçülmesiyle tayin edildi. 72 saatlik kumarın uygulanmış mercimek köklerinden 0,2'şer gr alınıp sıvı azotta ezildi. % 3'lük sülfosalisilik asit solusyonunda homojenize edilip 14 000g de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant alınıp üzerine 0,2 ml asit ninhidrin (Asit ninhidrin çözeltisinin hazırlanışı: 1.25 g ninhidrinle 30 ml glasiyel asetik asit ve 20 ml 6 M fosforik asidin birbiri içinde çözülene kadar çalkalanmasıyla hazırlandı) eklendi. 24 saat durağan kalan bileşen soğukta +4 °C'de buzdolabında korundu ve 0,2 ml glasiyel asetik asit ve 0,1ml sülfosalisilik asit eklenerek 96 °C'de 1 saat bekletildi ve daha sonra buz banyosuna transfer edilerek, örnekler soğuyuncaya kadar tutuldu. Örneklerin üzerine 1 ml toluen eklenerek vorteksle 20 sn karıştırıldı. Elde edilmek istenen absorbans değerleri ultraviyole spektrofotometresinde (Shimadzu UV mini-1240 spectrophotometer) 520 nm dalga boyunda okundu. Prolin konsantrasyonu prolin standart eğrisi oluşturularak $\mu\text{mol/g}$ taze ağırlık olarak hesaplandı. 5, 10, 15, 20, 25, 30 $\mu\text{g/ml}$ prolin içeren standartlar hazırlanmıştır (Şekil 3.3). Doğrunun denklemi $y = 0,0388x - 0,0273$ regresyon katsayısı $R^2 = 0,9951$ 'dür.



Şekil 3.3. Prolin içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart eğri grafiği

Şekil 3.3’de çizilen standart eğri grafiğinden prolin miktarları hesaplandı.

$[(\mu\text{g prolin/ ml toluen}) / 115,5\mu\text{mol}] / [(g \text{ örnek}) / 5]= \mu\text{mol prolin/g materyalin taze ağırlığı}$ (Bates ve diğ., 1973).

3.4.4. Lipid peroksidasyonu

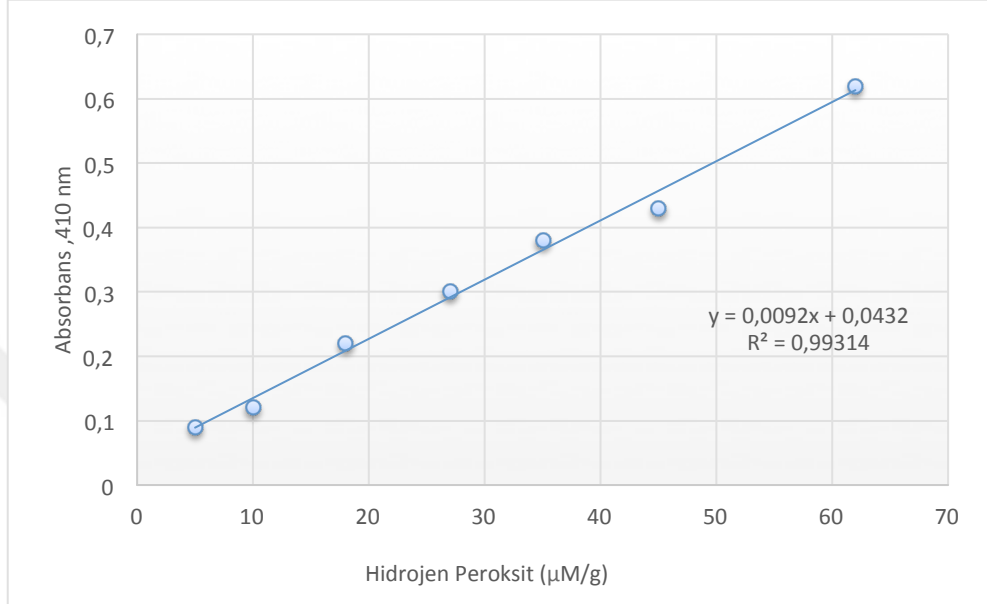
Örneklerdeki lipid peroksidasyonun ölçümü, Ohkawa ve diğ.’nin (1979) uyguladığı metoda göre malondialdehid (MDA) içeriğinin ölçümü yapılarak saptandı. Bu metoda göre lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak MDA yı kabul eden tiyobarbitürik asit testi (TBA) kullanıldı. Bitkilerde lipid peroksidasyonu malondialdehit (MDA) içeriği olarak ifade edilmistir. TBA reaksiyonu sonucu oluşan malondialdehid (MDA) içeriğinin oluşumu lipid peroksidasyonunun bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir. 0,2 gr’lık kök örnekleri sıvı azot ile ezildi ve daha sonra 1 ml % 5 trikloroasetik asit (TCA) içinde süspanse edildi. Homojenatlar eppendorf tüplerine transfer edildi ve oda sıcaklığında 15 dakika boyunca 12000 rpm’de santrifüj edildi. Yeni hazırlanan % 20 TCA içinde % 0,5 tiyobarbitürik asit (TBA) ve süpernatant eşit hacimlerde eppendorf tüpleri içine alındı ve 96° C’de 25 dakika inkübasyonu sağlandı. Tüpler, inkübasyondan sonra oda sıcaklığına ulaşınca kadar buzda bekletildi ve daha sonra 5 dakika boyunca 10000 rpm’de santrifüje tabi tutuldu. TBA (tiyobarbitürik asit), MDA ile reaksiyona girerek asidik kırmızı bir bileşik oluşumuna sebep oldu. 532 ve 600 nm de süpernatantın absorbanı okundu, 600 nm deki spesifik olmayan absorban çıkarıldı. Kırmızı renkli MDA-TBA kompleksinin miktarından lipid peroksidasyon değişimleri hesaplandı, ($\epsilon=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Kör olarak % 20’lik TCA içinde % 0,5’lik TBA kullanıldı.

1 ml çözeltideki MDA (nmol/g): $[(A532-A600)/155000] \times 10^6$ formülüyle hesaplandı. Sonuçlar MDA nmol/gram doku şeklinde verildi (Ananieva ve diğ., 2002).

3.4.5. Hidrojen peroksit (H₂O₂) tayini

Hidrojen peroksit içeriği Jana ve Choudhuri (1981) tarafından önerilen metoda göre belirlendi. Uygulama görmüş ve kontrol olarak kullanılan mercimek bitkilerinin kökleri 0,3 gr olarak tartılıp 1,5 ml 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 6.5)

homojenize edildi ve 10000 g de 25 dk santrifüjlendi. Çözelti alındı üzerine % 1'lik titanium (IV) klorid (V/V) eklendi, vorteksle karıştırıldı ve 10 000 g de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatantın 410 nm deki absorbansı ölçülerek hidrojen peroksit konsantrasyonu standart grafiğinden hesaplandı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Hidrojen peroksit içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği

Hidrojen peroksit içeriğinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

50 mM, pH 6,5 Fosfat Tamponu;

1,7408 g K_2HPO_4 ve 1,3616 g KH_2PO_4 250 ml distile suda çözüldü ve 1 M NaOH ile pH 6,5'a ayarlandı.

% 1 lik titanium (IV) klorid;

1ml titanium (IV) klorid 25 ml 50 mM, pH 6.5 fosfat tamponu içinde çözüldü, derişik sülfirik asit ilave edildi ve aynı tamponla 100 ml ye tamamlandı.

3.4.6. α -Amilaz aktivitesinin ölçülmesi

Örneklerdeki α -amilaz aktivitesi “dekstrinleyici yöntem” uygulanarak saptandı. α -amilaz aktivitesini ölçmek için kör, kontrol ve örnek tüpleri hazırlandı. Kör tüpü spektrofotometrenin kalibrasyonunun yapılması için kullanıldı. Kontrol tüpü

başlangıçtaki nişastanın miktarını 620 nm’de optik dansite cinsinden belirlemek amacı ile hazırlandı (Wilson ve diğ., 1982). Örnek tüpü ise enzimim aktivite gösterdiği tüp olarak hazırlandı. Çimlenen tohumlardan radikula ve koleoptiller çıkartıldı. Elde edilen örnek miktarının 5 katı malat tamponu (pH 5,2 50 mM NaCl 2mM CaCl₂) eklendi. 5 dk havanda homojenize edildi ve de homojenat eldesi 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 5000 rpm 8 dk. santrifüj yapıldı ve elde edilen üst kısım enzim kaynağı olarak kullanıldı. Substrat çözeltisi olarak %0,1 g lık nişasta çözeltisi kullanıldı. 48 ve 72 saatlik kumarin uygulanması sonucunda alfa amilaz değerleri belirlendi.

Hazırlanan tüplerin içeriği şu şekildedir;

Kör tüpün içeriği: 9 ml malat tamponu, 0,1 ml enzim

Kontrol tüpün içeriği: 7 ml malat tamponu, 2 ml substrat çözeltisi, 0,1 ml enzim çözeltisi

Örnek tüpün içeriği: 7 ml malat tamponu, 2 ml substrat çözeltisi, 0,1 ml enzim çözeltisi

Hazırlanan tüm tüpler 30 °C’de 4 dk inkübe edildi ve inkübasyon sonunda örnek tüplerine 1N HCl çözeltisinden 0,9 ml konuldu. Tüm tüplere 1 ml iyot eklendi.

Hazırlanan tüm tüplerin absorbans değerleri 620 nm’ye ayarlanmış spektrofometrede kör tüpüne karşı okundu. Kontrol tüplerinin verdiği OD değerinden, örnek tüplerin verdiği OD değerleri çıkartılarak fark OD yani enzim tarafından parçalanmış nişastanın (kaybolan nişastasının) OD değeri bulundu. Kaybolan nişasta miktarı bulunarak mg’a ve daha sonrada ünite/ml’ye dönüştürüldü.

Bir ünite α- amilaz aktivitesi, dakikada 0,1 mg nişastayı 30 °C’de parçalayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

Enzim ünitesi aşağıdaki denkleme göre hesaplandı (Denklem 3,2 ve 3,3) (342,30 g/mol nişastanın MW).

$$U/L = \mu\text{mol/dk/L} = A/\text{min} \times V_t \times 10^6 (\mu\text{mol/mol}) / \epsilon \times V_s \times l \quad (3.2)$$

A/min = dakikadaki absorbans değisiimi,

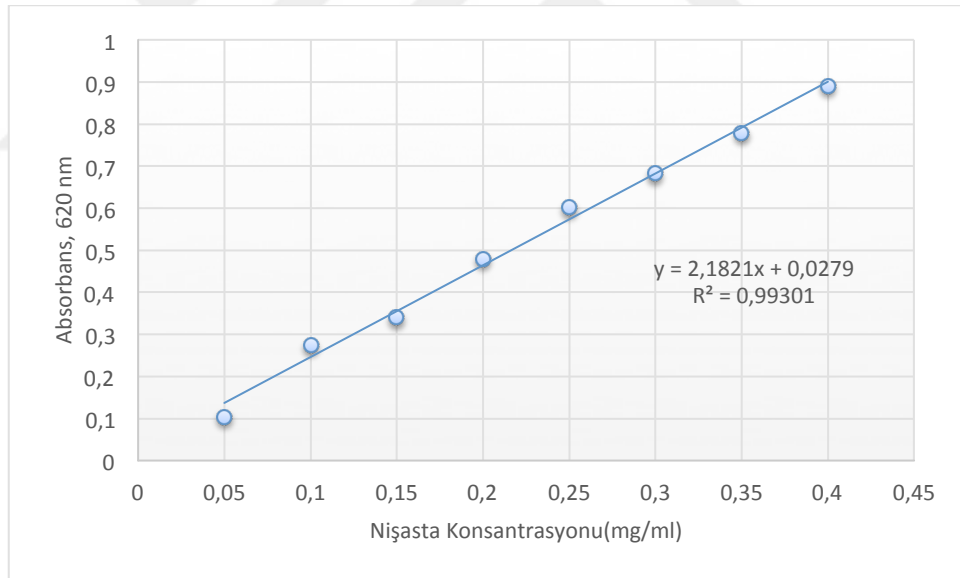
V_t = toplam reaksiyon hacmi = örnek + reaktif + dilüent

V_s = örnek hacmi

ϵ = ekstinksiyon katsayısı

$$A = \epsilon \times l \times c \quad (3.3)$$

Standart grafiğini hazırlamak için nişastanın farklı konsantrasyonlardaki (0.05, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.3, 0.35, ve 0.4 mg/ml) çözeltiler hazırlandı. Nişasta miktarı, spektrofotometrik olarak ölçüldü. Daha sonra, konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi (Şekil 3.5). Konsantrasyonu bilinmeyen örneğin nişasta miktarı elde edilen doğrunun denklemi kullanılarak hesaplandı. Doğrunun denklemi $y=2,1821x + 0,0279$ regresyon katsayısı $R^2 = 0,993$ 'dür. Kör olarak 5 ml iyot çözeltilisi kullanıldı.



Şekil 3.5. Alfa amilaz aktivitesini belirlemede kullanılan nişasta standart grafiği

3.4.7. Katalaz aktivitesinin ölçülmesi

Mercimek bitkisinin ham ekstraktları enzim analizleri için hazırlandı. Bitkinin kök dokuları, sıvı azot ile havanda toz haline getirildi. 0,1 – 0,3 g tartılarak eppendorf'a aktarıldı ve daha sonra 1 ml 50 mM potasyum fosfat tamponu ile homojenizasyonu

yapıldı. Homojenat 13000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi elde edilen süpernatant enzim analizleri için kullanıldı.

Bitki doku homojenatlarında katalaz (EC 1.11.1.6.) aktivite tayini Aebi'ye (1984) göre yapılmıştır. Bu metoda göre H₂O₂, ışık spektrumunun ultraviyole alanda dalga boyunun düşmesiyle yükselen bir absorpsiyon verir. H₂O₂'nin parçalanıp ortamdan uzaklaştırılmasıyla oluşan absorbans azalması 240 nm de takip edildi. Absorbansta gözlenen azalma hızı katalaz aktivitesi ile orantılıdır. Deneyde 50 mM, pH 7,0 fosfat tamponu ve H₂O₂ (Merck) kullanıldı. Fosfat tamponu içinde H₂O₂ bulunan çözeltiliye belirtilen miktarlarda numune konularak, köre karşı 240 nm dalga boyunda spektrofotometrede 120 sn boyunca ölçüm alındı. Bir enzim ünitesi dakikada 1 µmol H₂O₂ parçalayan enzim miktarı olarak hesaplandı (H₂O₂ nin ekstinksiyon katsayısı 39,4 mM⁻¹cm⁻¹).

3.4.8. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçülmesi

Kontrol ve işleme tabi tutulmuş bitkilerden alınan kök dokular 0,3 gr olarak tartıldı ve sıvı azot kullanılarak homojen hale getirildi. Üzerine 2 mM EDTA içeren pH 7,5'te 0.2 M sodyum fosfat tamponu ilave edildi. Süspansiyonlar +4 ° C'de 10000 rpm'de 30 dk. santrifüje edildi ve SOD aktivite tayini için süpernatantlar kullanıldı.

Örneklerin SOD aktivitesi Beauchamp ve Fridovich (1971) yöntemine göre fotokimyasal olarak belirlendi. Bu yöntemine göre riboflavin ve L metionin ışık varlığında O² oluşturur. NBT (nitrobluetetrazolium), O² ile reaksiyona girerek mavi renkli formazan kristalleri oluşturur. Ekstraktaki bulunan ve antioksidan enzimlerden biri olan SOD, O² radikallerini ortamdan uzaklaştırarak formazan oluşumunu inhibe eder. SOD aktivitesi, NBT'den formazan oluşumunun inhibisyonu ile belirlenir. Sonuçta, ışık etkisiyle mavi-mor renk oluşumu, SOD enziminin aktivitesi ile ters orantılıdır. SOD aktivitesinin belirlenmesi için, 200 µl ekstrakt, 3 ml substrat tamponu (Tablo 3.5) ile karıştırılıp tüplerde renk değişimi görülünceye kadar 15 W'lık floresan ışık altında bekletildi. Sürenin sonunda örneklerin üzeri, karanlık ortamın sağlanması için alüminyum folyo ile kapatıldı ve örneklerin 560 nm dalga boyundaki absorbansı (A₅₆₀) spektrofotometrede ölçüldü. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de, ışık altında bekletilen NBT'nin % 50'sinin indirgenmesi için gerekli olan enzim miktarı olarak tayin edildi.

Tablo 3.5. SOD miktarının belirlenmesinde kullanılan substratın içeriği

| Bileşenin adı | Karışımındaki bileşenlerin Konsantrasyonu | Miktarı (ml) |
|-----------------------|---|--------------|
| 50 mM Na-P tamponu | 50 mM | 2,35 |
| EDTA. Na ₂ | 0,66 mM | 0,20 |
| L-Methionine | 10 mM | 0,30 |
| NBT | 33µM | 0,10 |
| Riboflavin | 0,0033 mM | 0,05 |
| Toplam hacim | | 3,0 ml |

Pozitif kontrolü oluşturacak örneğe, ekstrakt yerine 200 µl 50 mM fosfat tamponu (pH 7,8) eklendi. Pozitif kontrol de örnekler ile beraber ışıkta bekletildi. Pozitif kontrol, SOD içermediği için inhibe olmamış reaksiyon olarak kabul edildi ve reaksiyon değeri 100 olarak alındı. Negatif kontrolü oluşturacak örneğe de ekstrakt yerine 200 µl 50 mM fosfat tamponu (pH 7,8) eklendi. Negatif kontrol, örneklerin ve pozitif kontrolün ışıkta bekletildiği süre kadar karanlıkta tutuldu ve kör örnek olarak kullanıldı.

Örneğin A560 değerinden, kör örneğin absorbansı çıkarıldıktan sonra kalan değer, aşağıdaki formülde yerine konarak, örnekteki % inhibisyon değeri hesaplandı.(Denklem 3.4)

$$\% \text{ inhibisyon} = (\text{Kontrol A560} - \text{Örnek A560}) / (\text{Kontrol A560} \times 100) \quad (3.4)$$

50% inhibisyon =1 Unit SOD

SOD =unit/mg

NBT'den formazan oluşum reaksiyonunu %50 oranında inhibe eden SOD miktarı 1 ünite olarak kabul edilir.

3.5. Moleküler Analizler

3.5.1. RAPD PZR analizleri

RAPD tekniğinin ucuz olması, basit olması, kısa zamanda sonuç vermesi, polimorfizmin belirlenmesi için bütün organizmalarda başarıyla kullanılması ,aynı anda birkaç yüz DNA parçasının PZR' da çoğalması, az miktarda ve düşük kalitede DNA'nın yeterli olması ve DNA baz sırasına ilişkin ön bilgiye gereksinim duyulmaması bu tekniğin avantajları arasındadır (Williams ve diğ., 1990; Wolf ve diğ., 2004). RAPD tekniğinin dezavantajı ise tekrarlanabilirliğinin düşük olması ve dominant markörler vermesidir (Atienzar ve Jha, 2006).

3.5.1.1. Genomik DNA izolasyon protokolü

Kumarin uygulaması sonrasında gelişen kök uçlarından 200-300 mg alınıp DNeasy plant mini kit (Qiagen) kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı. Bu yöntemde ilk önce alınan kök ucu örnekleri havan kullanarak sıvı azot içinde parçalandı ve üzerine 400 µl tampon AP1 ve 4 µl RNase A eklendi ve 65°C' de bir buçuk saat boyunca inkübe edildi. Karışımlar ara ara vortekslendi. Bu karışıma 130 µl tampon AP3 eklenip karıştırılarak 7 dakika boyunca -20°C' de bekletildi. 14,000 rpm (>20,000 xg)' de 5 dakika boyunca santrifüj sonrası üst sıvı mor santrifüj tüpüne (QIA Shredder mini spin column) pipetlendi ve 14,000 rpm (>20,000 xg)' de 2 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra elde edilen sıvı yeni 1,5 ml' lik santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 1,5 katı tampon AW1 pipetlenerek karıştırıldı. Karışım beyaz santrifüj tüpüne (DNeasy mini spin column) transfer edilerek 8,000 rpm (>6,000 xg)'de 1 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre yeni toplama tüpüne geçirilip üzerine 500 µl tampon AW2 eklendi ve 8,000 rpm (>6,000 xg)'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen sıvı atılarak filtrenin üzerine tekrar 500 µl tampon AW2 eklendi ve 14,000 rpm (>20,000 xg)' de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Filtrat 1,5 ml' lik yeni santrifüj tüpüne geçirildi ve filtrenin üzerine 100 µl Buffer AE eklenip 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 8,000 rpm (>6,000 xg)' de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu aşamada filtreden DNA ayrıldı ve genomik DNA (gDNA) elde edildi. İzole edilen gDNA'lar, kullanılacağı zamana kadar -20° C' de saklandı.

3.5.1.2. DNA Miktarı ve Kalitesinin Tayini

İzole edilen gDNA'ların gözlemlenmesi için %1'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. Agaroz jel hazırlanırken; 0,5 g agaroz tartıldı ve 50 ml 1 X tris-asetat-EDTA tamponu (TAE, Sigma) içinde mikrodalga fırında ısıtılarak çözünmesi sağlandı. Karışım 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine 3 µl syber safe eklendi. Önceden tarak yerleştirilen kasete jel döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra kasetten tarak dikkatlice çıkarıldı. Hazırlanan jel, yatay elektroforez tankına yerleştirildi ve üzeri kapanıncaya kadar 1xTAE tamponu ile 4 µl dH₂O, 1 µl örnek gDNA ve 1 µl yükleme boyası karıştırılarak jelde oluşturulan kuyulara mikro pipet yardımı ile yüklendi. İlk kuyucuğa DNA standardı (Fermantas 1kb) yüklendi. Örnekler 90 voltta yaklaşık 1 saat yürütüldü. Elektroforez sonucunda oluşan bantlar UV jel görüntüleme cihazı (UVP-GelDoc-it) yardımıyla gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi. İzole edilen gDNA'ların miktar ve saflık tayini Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer cihazı ile hesaplandı.

3.5.1.3. RAPD PZR da kullanılan primerler

Bu çalışmada toplam 10 adet oligonükleotit primer (QIAGEN Operon) kullanıldı. Kullanılan primerler, sekansları ve GC içerikleri Tablo 3.6'da listelendi.

Tablo 3.6. Çalışmada kullanılan OPA serisi RAPD primerlerinin dizileri, T_m değerleri, G+C içerikleri

| Primer Sayısı | Primer | Sekans 5'--3' | T _m (°C) | G+C (%) |
|---------------|--------|---------------|---------------------|---------|
| 1 | OPA 01 | CAGGCCCTTC | 36,4 | 70 |
| 2 | OPA 02 | TGCCGAGCTG | 40,7 | 70 |
| 3 | OPA 03 | AGTCAGCCAC | 34,3 | 60 |
| 4 | OPA 04 | AATCGGGCTG | 35,1 | 60 |
| 5 | OPA 05 | AGGGGTCTTG | 32,6 | 60 |
| 6 | OPA 06 | GGTCCCTGAC | 32,6 | 60 |
| 7 | OPA 07 | GAAACGGGTG | 33,2 | 60 |
| 8 | OPA 08 | GTGACGTAGG | 31,1 | 60 |
| 9 | OPA 09 | GGGTAACGCC | 37,4 | 70 |
| 10 | OPA 10 | GTGATCGCAG | 33,1 | 60 |

3.5.1.4. RAPD PZR karışımı hazırlama ve RAPD PZR döngü optimizasyonunun belirlenmesi

Her bir PZR reaksiyonu 0,2 ml ince cidarlı ependorf tipi tüplerde toplam 25 µl toplam solüsyon içerisinde gerçekleştirildi. 20 ng/µl genomik DNA ve 20 ng/µl primer kullanıldı. Distile su oranları izole edilen DNA miktarlarına göre farklılık gösterdi. (Tablo 3.7). PZR reaksiyonu bileşenleri ön denemelerde optimize edildi (Tablo 3.8). PZR döngüleri, Bio RAD CFX Connect™ marka ısı-döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. PZR örnekleri bekletilmeden veya -20°C saklandıktan sonra agaroz jel elektroforezinde yürütüldü.

Tablo 3.7. RAPD PZR tekniğinde kullanılan bileşenler

| RAPD-PZR Bileşenleri | Miktar | Konsantrasyon |
|----------------------|----------|---------------|
| Buffer (1X One Taq) | 12,5 µl | 1X |
| Distile su | Değişken | Değişken |
| MgCl ₂ | 0,5 µl | 25 mM |
| Primer | 1 µl | 20 ng |
| Taq DNA Polimeraz | 0,5 µl | 1 U |
| gDNA | 1 µl | 20 ng |
| Toplam | 25 µl | |

Tablo 3.8. Optimize edilen RAPD PZR döngüsü

| RAPD PZR Aşaması | Sıcaklık(°C) | Süre | Döngüler |
|------------------|--------------|-----------|----------|
| Ön Denatürasyon | 94 | 4 dakika | 1 |
| Denatürasyon | 94 | 1 dakika | } 48 |
| Bağlanma | 50 | 30 saniye | |
| Uzama | 72 | 2 dakika | |
| Son Uzama | 72 | 9 dakika | 1 |
| Saklama | +4 | - | - |

3.5.1.5. Agaroz jel elektroforezi

1 x TAE (Tris-asetat EDTA) (242 g Tris base, 57,1 ml glasiel asetik asit, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)) %2'lik agaroz jele DNA örnekleri 50 bp DNA ladder (Thermo Scientific) ile birlikte yüklendi. DNA örnekleri yürütücü tampon çözeltisi (1xTAE) bulunan jel tankı içerisinde 60 voltta 70 dk yürütüldü. PZR ürünleri için %2 agaroz; genomik DNA'ların analizi için %1 agaroz kullanıldı.

3.5.1.6. RAPD PZR ürünlerinin rakamsal analizi

RAPD profillerindeki belirgin değişiklikler (kontrole göre yeni bantların ortaya çıkması ve/veya mevcut bantların kaybolması) değerlendirildi. Değerlendirmesi güç olan veya tüm örnekler için monomorfik DNA bantları üreten primerler değerlendirmeye alınmadı. Her bir primer için çoğaltılmış olan bantların varlığı "1" ve yokluğu "0" belirlendi (Ouzounidou ve diğ., 1997). Uygulama grupları arasındaki genetik benzerlik katsayıları Nei (1978)'nin taraflı ölçüm metoduna göre Past programı kullanılarak hesaplandı. Kümeleme analizi gerçekleştirildi ve genetik benzerlik katsayısı deney çiftlerinin ağırlıksız aritmetik ortalamaları (UPGMA) kullanılarak Past programında bir dendogram oluşturuldu.

3.5.1.7. Genomik kalıp kararlılığının (GKK, %) hesaplanması

RAPD profillerinde gözlenen her bir değişikliğe (mevcut bantların kaybolması ve yeni bantların oluşması) +1 sayısı verildi ve test edilen tüm primerler için her bir deneme grubu için ortalama hesaplandı. RAPD profillerinde değişikliğin belirlenmediği veya sayılması güç skorlar üreten primerler genomik kalıp kararlılığı hesaplanmasına katılmadı. Genomik kalıp kararlılığı değerlendirilmesi ise denklem (3.5)'e göre;

$$\%GKK = (1 - a/n) \times 100 \quad (3.5)$$

hesaplandı.

Formüldeki "a" her bir primer için DNA profillerindeki değişiklik gösteren ortalama DNA bant sayısını, "n" ise kontrol grubu profilinde aynı primer için belirlenen toplam DNA bant sayısını ifade etmektedir (Atienzar ve diğ., 1999; Liu ve diğ.,

2007). Her bir deneme grubu için tüm primerlerle hesaplanan GKK değerlerinin ortalamaları hesaplandı. Jel fotoğrafları üzerinden görüntülenen PZR ürünlerine ait bantların okunmasında sadece net görünen bantlar değerlendirilmeye alındı. Her bir parametrenin hassaslığını karşılaştırmak için, bu parametrelerdeki değişimler kontrollerine (%100'e sabitlenerek) göre yüzde değişim olarak hesaplandı (Cenkçi ve diğ., 2009).

3.5.2. Real Time PZR analizleri

Kantitatif gerçek zamanlı PZR (Real Time PZR); reaksiyon sırasında her döngü sonucunda meydana gelen ürün miktarının, boya ya da problemlerin ilgili hedef bölgeye hibridize olması ile oluşan ışımının (floresans) kamera ile görüntülenmesiyle gerçek zamanlı olarak bilgisayar ekranından izlenmesini sağlayan bir analiz yöntemidir. (Kubista ve diğ., 2006)

3.5.2.1. Total RNA izolasyonu

Kontrol grubu ve kumarin uygulamaları sonrasında alınan tüm bitki örnekleri, RNA izolasyonu işlemi yapılana kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı. Çalışmamızda her bir uygulama grubu için 3 biyolojik tekrar yapıldı. Bitki örneklerinden RNA izolasyonu QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit protokolüne göre gerçekleştirildi. RNA miktarı spektrofotometrik ölçümlerle Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer cihazında belirlendi. Real-Time PZR döngüleri, Bio RAD CFX Connect™ marka ısı-döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Bitki kökü örnekleri sıvı azot içerisinde ezildi ve her örnekten 0,1 g alınarak 2 ml' lik tüplere aktarıldı. Her örneğin üzerine 450 µl Buffer RLT solüsyonundan eklendi. RLT solüsyonu kullanılmadan önce üzerine 4,5 µl β-Merkaptoetanol (β-ME) eklendi. Ardından vorteks yardımıyla karıştırıldı. Tüpler buz üzerinde arada vorteksenerek bekletildi. Lizat 2 ml'lik QIAshredder spin tüpüne aktarıldı ve yüksek hızda 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatant yeni tüplere aktarıldı. Süpernatant üzerine 0,5 hacimde etanol (% 96-100) ilave edildi ve karıştırılarak pipetaj yapıldı. Numune 2 ml'lik RNeasy spin column tüpüne aktarıldı. 15 saniye boyunca $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10.000 \text{ rpm}$)'de santrifüjlendi. RNeasy spin column üzerine

700 µl Tampon RW1 eklendi ve $\geq 8000 \times g$ 'de (≥ 10000 rpm / dak) 15 s boyunca santrifüjlendi. Ardından aynı işlemler iki kere 500 µl tamponu RPE eklenerek yapıldı. RNeasy spin column 1.5 ml toplama tüpüne aktarıldı ve üzerine 30-50 µl RNaz içermeyen ddH₂O eklendi. Kapağı kapatılıp 1 dakika süreyle $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edilerek RNA elde edildi. Bu aşama iki defa yapıldı. Örnekler -80 °C' de saklandı. RNA miktarı spektrofotometrik ölçümlerle Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer cihazında belirlendi. RNA izolasyonu 3 tekrar şeklinde çalışıldı. En yüksek miktarda ve en kaliteli örneklerle çalışılmaya devam edildi.

3.5.2.2. cDNA (Komplementer DNA) sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi first-strand cDNA sentez kiti (ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit) kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 3.9).

RNA numunesi ve primer d (T)₂₃VN steril RNaz içermeyen tüplerde karıştırıldı.

Tablo 3.9 cDNA sentez prosedürü

| Total RNA | 1–6 µl (10 ng–1 µg) |
|--------------------------------|---------------------|
| d(T) ₂₃ VN (50 µM) | 2 µl |
| nuclease-free H ₂ O | Değişken |
| Total Volume | 8µl |

Tablodaki bileşenler ile hazırlanan örnekler 70 ° C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı ve vorteksenerek buzun üzerine alınarak üzerine 10 µl M-MuLV Reaction Mix ve 2 µl M-MuLV Enzyme Mix bileşenleri eklendi.

20 µl cDNA sentez reaksiyonu 42 ° C'de bir saat inkübe edildi. Üzerlerine toplam hacim 50 µl olacak şekilde ddH₂O eklendi. Elde edilen cDNA'lar Real time PZR reaksiyonu gerçekleştirilene kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklandı.

3.5.2.3. Real-Time PZR da kullanılan primerler

Bitki köklerinden izole edilen RNA örneklerinde, CAT (Katalaz), Mn SOD (Mangan süperoksit dismutaz) ve Cu/Zn SOD(Bakır çinko süperoksit dismutaz) genlerinin anlatımı, Real Time PZR ile analiz edildi (Tablo 3.10). Genlerin dizileri *Lens*

culinaris hakkında daha önce hazırlanmış olan Aksoy (2008)'den alındı. Tüm örneklerin ve standartların Real Time PZR'ı, hata oranını azaltmak için üç biyolojik tekrarlı yapıldı. Primerlerin özgünlüğünü test etmek için Real Time PZR'ın döngüleri tamamlandıktan sonra erime eğrisi analizi gerçekleştirildi. Elde edilen veriler ile Relative expression software tool (REST©) programı kullanılarak gen ifade düzeyleri belirlendi. Sonuçların istatistiksel analizi ANOVA ile yapıldı.

Tablo 3.10. Real-Time PZR primer dizileri

| Primer | Sekans (5'→3') | Primer uzunluğu (bç) | Tm (°C) | GC içeriği (%) |
|----------------------|-----------------------|----------------------|---------|----------------|
| CAT F* | CCTGTCATTGTGCGTTTCTC | 20 | 47 | 50 |
| CAT R** | CTCCCACCTTAATGGCCTCT | 20 | 49 | 55 |
| Mn-SOD F | GGCGGAGGTCATATTAACCA | 20 | 49 | 50 |
| Mn-SOD R | AAGCCACACCCATCCAGAC | 19 | 48 | 58 |
| Cu/Zn-SOD F | GCTTCCATATCCATGCCTTG | 20 | 47 | 50 |
| Cu/Zn-SOD R | AGCTACTCTGCCACCAGCAT | 20 | 49 | 55 |
| Lens- GAPDH F | TGTTGAGGGTCTCATGACCA | 20 | 47 | 68 |
| Lens- GAPDH R | CGCTGGGAATGATGTTAAATG | 21 | 45 | 43 |

(*F: Forward/İleri, **R: Reverse/Geri)

3.5.2.4. Real-Time PZR reaksiyonu

Uygun miktar ve kalitede cDNA sentezi yapıldıktan sonra çalışmamızda taraması yapılacak hedef genler CAT, Mn SOD ve Cu/Zn SOD ve housekeeping olarak seçilmiş Lens-GAPDH (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) genlerinin reaksiyon optimizasyonları ve ön denemeleri yapıldı. Real-Time PZR çalışmaları Bio RAD CFX Connect™ marka ısı-döngü cihazı ile SYBR Green I Master boyası kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.6). GoTaq® qPZR master mix kullanılarak gerçekleştirilen deneyler ile PZR'ın etkinliğini saptamak ve herhangi bir dimer oluşumu olup olmadığını belirlemek için Erime eğrisi grafiklerine bakıldı.



Şekil 3.6. Bio RAD CFX Connect™ (Real-Time PZR Detection System) marka ısıl-döngü cihazı

Yapılan çalışmalarda en iyi uygun ve kaliteli sonuçların çıkması için ön denemeler yapıldı. Yapılan reaksiyon denemelerinde uygun primer (0,2 μ M ile 0,9 μ M arasında tarandı. Aynı zamanda reaksiyon kiti tarafından tavsiye edilen değerler) ile cDNA konsantrasyonları tarandı ve en uygun olanları seçildi. Real time PZR çalışmalarında en erken Cq (quantification cycle) değerini veren reaksiyon koşulları optimizasyona uygun koşullar olarak belirlendi. Aşağıda verilen koşullarda RT-PZR reaksiyonları gerçekleştirildi (Tablo 3.11 - 3.12).

Tablo 3.11. Real-Time PZR çalışmasında optimize edilen ve kullanılan protokol

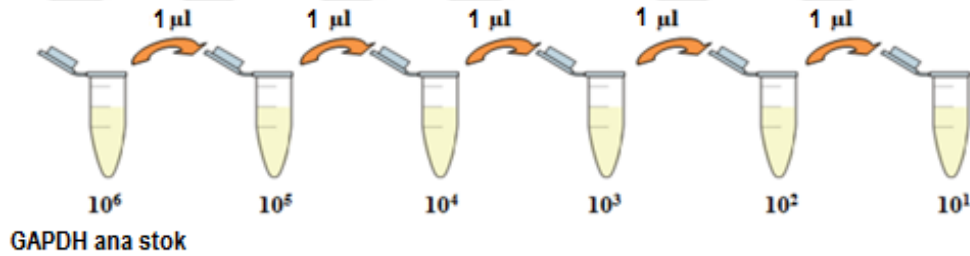
| Bileşen | Miktar | Son Konsantrasyon |
|------------------------|------------|-------------------|
| cDNA | Değişken | 1000ng |
| Forward Primer | 5 μ l | 0,5 μ M |
| Reverse Primer | 5 μ l | 0,5 μ M |
| GoTaq® qPZR Master Mix | 25 μ l | 1X |
| ddH ₂ O | Değişken | Değişken |
| Toplam hacim | 50 μ l | |

Tablo 3.12. Real Time PZR reaksiyonunun gerçekleştirildiği program

| Program | Sıcaklık | Süre | Döngü Sayısı |
|----------------------|-----------|---------------|--------------|
| Ön denatürasyon | 95 °C | 2 dk | 1 |
| Denatürasyon | 95 °C | 15 sn | 40 |
| Bağlanma | | | |
| Uzama | | | |
| Erime Eğrisi Analizi | 60- 95 °C | Sürekli okuma | 1 |

Real Time PZR çalışması sonrasında her üç gen için de, uygulama yapılmış ve yapılmamış örneklerde polimeraz zincir reaksiyonu eş zamanlı olarak izlendi ve pik profili olarak kaydedildi. Cq değeri polimeraz zincir reaksiyonuna ait pik profilinde logaritmik artış fazına geçilen döngü noktası (ilk noktayı) olarak tanımlanır. Cq değerleri pik profilleri ile belirlendi.

Cihazın kalibrasyonunun sağlanması için Lens-GAPDH geninin cDNA seri dilüsyonları kullanılarak oluşturulan standart eğri grafiği çizildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. cDNA seri dilüsyonlarının oluşturulması

Doğru bir standart eğri grafiği elde edebilmek için oluşturulan grafik en az 3 cDNA dilüsyonuna karşılık gelen logaritmik konsantrasyon değerinden geçecek şekilde hazırlandı (Büyük, 2014).

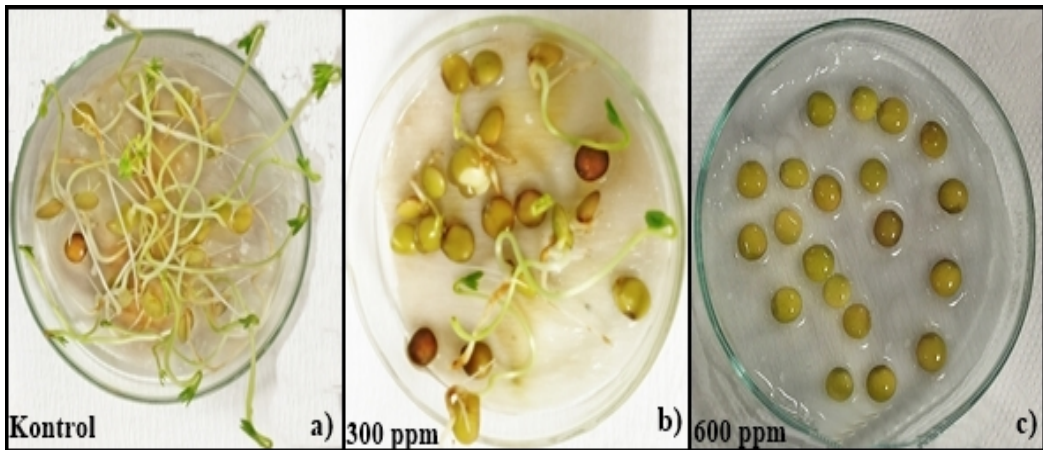
Farklı miktarlarda kumarin uygulanmış bitkilerde CAT, Mn SOD ve Cu/Zn SOD genlerine ait transkript profilleri ve kontrol profilleri karşılaştırıldı. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi One Way ANOVA ile yapıldı. Bu verilerin ortalama, standart sapma, standart hata ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri istatistik programı SPSS 18.0 ile hesaplandı. Böylelikle kumarin stresi altında yetiştirilmiş olan örneklerde CAT, Mn SOD ve Cu /Zn SOD genlerine ait mRNA ifade seviyeleri tespit edildi.

4. BULGULAR

Araştırmamızda elde edilen bulgular tablolar ile ayrıntılı olarak gösterildi ve farklılıkların daha iyi anlaşılabilmesi için grafiklerle de desteklendi. Kontrol grubuna göre artan kumarin konsantrasyonları istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Böylece kumarin stresine karşı *L.culinaris* bitkisinde meydana gelen sitogenetik ve genotoksik değişimler ortaya konuldu.

4.1. EC50 Belirleme

72 saatlik deney sonucunda probit analizine göre kumarin için EC₅₀ değeri 278,868 ppm olarak bulundu (Tablo 4.1). Verilerin detaylı bilgileri Ek 1 de verildi. Ölçümlerin ve hesaplamaların daha kolay yapılabilmesi için alt ve üst sınır aralığında bulunan 300 ppm değeri EC₅₀ değeri olarak alındı ve çalışmalara bu değer üzerinden devam edildi. Saptanan EC₅₀ değeri ve 2xEC₅₀ değeri olmak üzere iki farklı konsantrasyon ve kontrol grubu olarak Hoagland çözeltisi ile deneyler yapıldı (Şekil 4.1). Yapılan deneyler sonucunda elde edilen sayım ve ölçüm ile ilgili verilerin varyans analizleri SPSS paket programı kullanılarak yapıldı ve konsantrasyonlara ait çimlenme yüzdesi grafiği oluşturuldu.

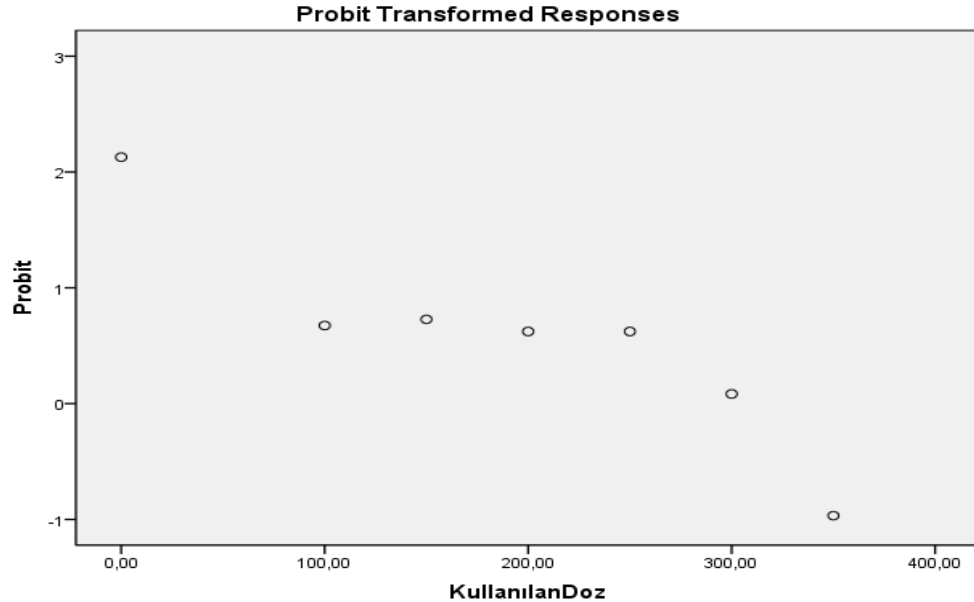


Şekil 4.1. EC₅₀ değeri belirlendikten sonra a) kontrol grubu, b) EC₅₀ ve c) 2xEC₅₀ kumarin konsantrasyonları ile kurulan deney düzeneği

Tablo 4.1. Kumarinin *L.culinaris* bitkisine etkisinin EC değerleri

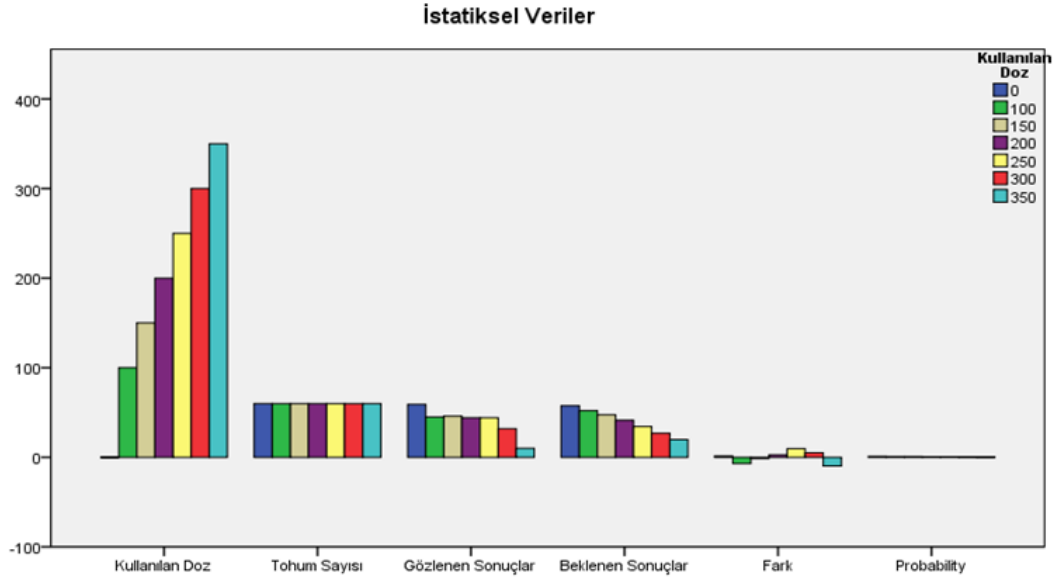
| % 95 Kumarin için güven aralığı (ppm) | | | | |
|---------------------------------------|-------------|----------------|----------------|----------------|
| | | EC | | |
| | Olasılık | Değerleri | Alt Sınır | Üst Sınır |
| | ,010 | 651,672 | 474,331 | 1472,819 |
| | ,050 | 542,460 | 406,023 | 1159,692 |
| | ,100 | 484,240 | 368,874 | 993,500 |
| | ,250 | 386,957 | 304,041 | 718,558 |
| PROBIT | ,500 | 278,868 | 216,517 | 428,569 |
| | ,850 | 112,776 | -115,352 | 180,343 |
| | ,900 | 73,495 | -222,873 | 150,671 |
| | ,950 | 15,275 | -385,939 | 110,395 |
| | ,990 | -93,937 | -696,604 | 39,626 |

Tablo 4.1’de görüldüğü üzere SPSS üzerinden yapılan Probit analizlerinde yüzde 50 olasılığa karşılık gelen EC değeri 278,86 ppm dir. Tablo 4.1’de başlıca tüm olasılıklara karşılık gelen EC değerleri sunuldu. Şekil 4.1’in farklı dozların 72 saatlik probit değerleri ve regresyon analizleri sunuldu (Şekil 4.2). Regresyon analizine göre artan konsantrasyonlarda azalan grafik elde edildi.



Şekil 4.2. *L.culinaris* bitkisinde kumarin için hesaplanan 72 saatlik probit değerleri ve regresyon grafiği (Kullanılan doz: ppm)

Şekil 4.3’de SPSS programından elde edilen *L.culinaris* bitkisinde kumarin için hesaplanan 72 saatlik farklı dozlara ait çeşitli istatistiksel değerler sunuldu. İstatistiksel verilerde kullanılan doz, tohum sayısı, gözlenen sonuçlar, beklenen sonuçlar ve bunların ikisi arasındaki fark verileri elde edildi. Bu grafik probit analiz programının kendi oluşturduğu grafikdir.



Şekil 4.3. *L.culinaris* bitkisinde kumarin için hesaplanan 72 saatlik farklı dozlara ait çeşitli istatistiksel değerler

4.2. Sitolojik Analizler

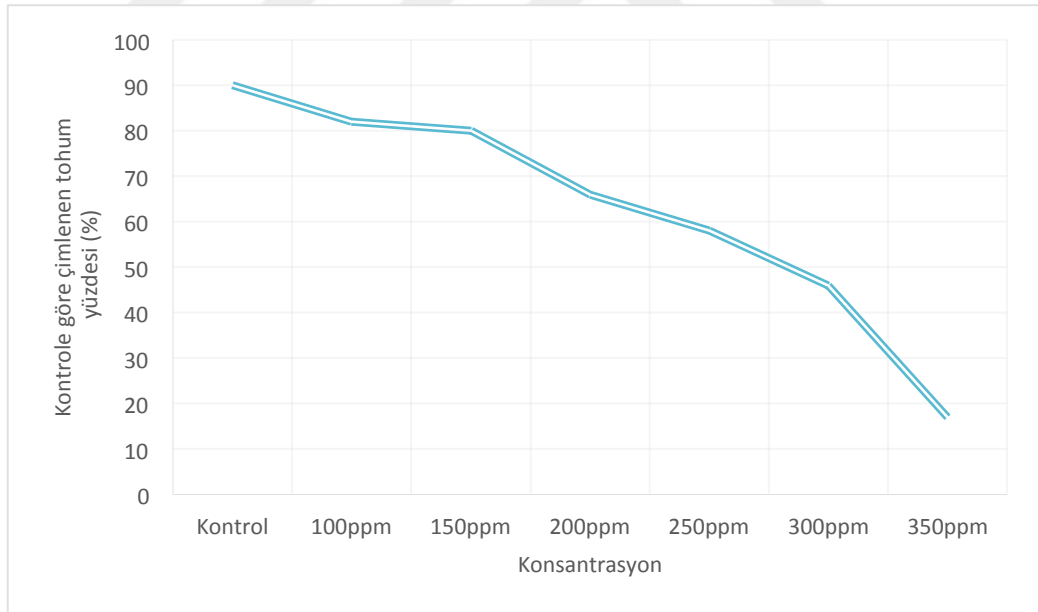
4.2.1. Çimlenme yüzdesi ve kök uzunlukları değerleri

EC50 değeri belirlenirken artan konsantrasyonlarda 6 farklı kumarin konsantrasyonu ve Hoagland çözeltisi ile hazırlanmış kontrol grubu kullanıldı (Tablo 4.2). Bu sonuçlara göre her bir petri kabında 20 adet tohum çimlendirildi deneyler 3 tekrar olacak şekilde yapıldığından kullanılan tohum sayısı 60 olarak girildi. Çimlenen tohum sayısının artan kumarin konsantrasyonlarında gittikçe düştüğü gözlemlendi. 300 ppm konsantrasyondaki çimlenen tohum sayısında yarı yarıya düşüş ve probit verileri birbirleriyle uyumlu olarak gözlemlendi.

Tablo 4.2. EC50 değeri belirlenirken kumarinin farklı konsantrasyonlarının *L.culinaris* tohumlarının çimlenme sayıları üzerine etkileri (72h)

| | Kullanılan doz sayısı | Kullanılan doz (ppm) | Kullanılan tohum sayısı | Çimlenen tohum sayısı | Beklenen sonuçlar |
|--------|-----------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------|
| PROBIT | 1 | 0 | 60 | 59 | 57,545 |
| | 2 | 100 | 60 | 45 | 52,069 |
| | 3 | 150 | 60 | 46 | 47,361 |
| | 4 | 200 | 60 | 44 | 41,321 |
| | 5 | 250 | 60 | 44 | 34,289 |
| | 6 | 300 | 60 | 32 | 26,853 |
| | 7 | 350 | 60 | 10 | 19,714 |

Çalışmamızda *L.culinaris* tohumlarının kumarinin farklı konsantrasyonları ile muamelesi sonucunda, kontrol grubunda 72 saat sonunda %90 olan çimlenme yüzdesinin kumarin konsantrasyon artışına paralel olarak sırasıyla düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Kontrol grubu ve artan kumarin konsantrasyonlarının *L. culinaris* tohumları üzerindeki kumarin uygulaması sonucunda çimlenme yüzdesi değerleri

Hoagland çözeltisi uygulanan kontrol grubu ile kumarinin farklı konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat muamele edilen *L.culinaris* tohumlarındaki çimlenme yüzdesindeki değişime göre kök uzunluklarına ait ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4.3'de verildi. 24 saat muamele edilen *L.culinaris* tohumlarındaki kök uzunluğu

ortalamaları kontrol ve kumarin konsantrasyonlarına (0, 100, 150, 200, 250, 300 ve 350 ppm) göre kök uzunluklarındaki azalmalar tespit edildi. 48 saat muamele edilen *L.culinaris* tohumlarındaki kök uzunluğu ortalamaları kontrol ve artan kumarin konsantrasyonlarına göre en düşük 0,053 cm ve en yüksek 1,13 cm olarak tespit edildi. 72 saat muamele edilen *L.culinaris* tohumlarındaki kök uzunluğu ortalamaları kontrol ve artan kumarin konsantrasyonlarına göre en düşük 0,15 cm ve en yüksek 2,13 cm olarak tespit edildi. 350 ppm konsantrasyonundaki azalma kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu.(Tablo 4.3 ve Tablo 4.4). Şekil 4.5’de bu veriler grafik ile gösterildi.

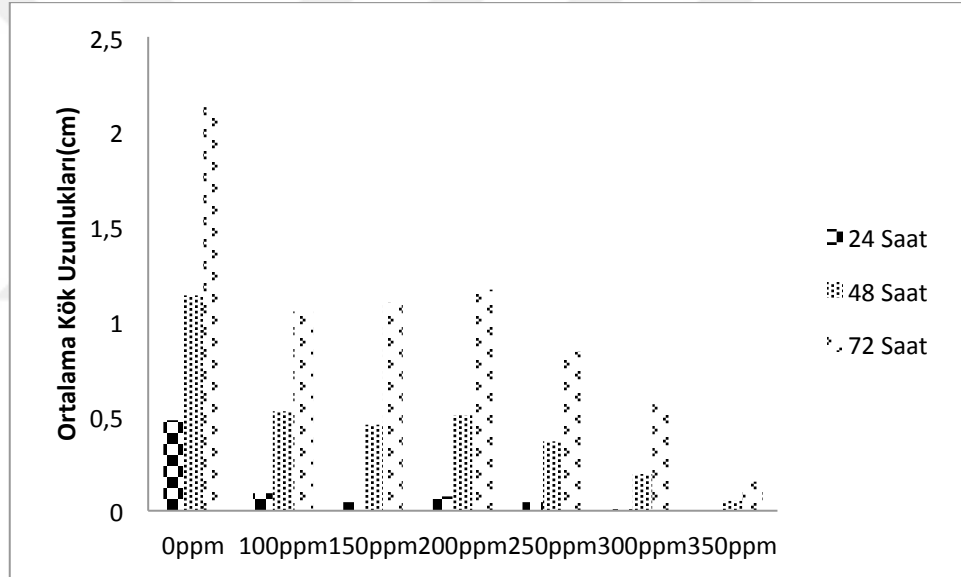
Tablo 4.3. Kullanılan doza göre farklı saatlerdeki kök uzunluklarının ortalama ve standart sapmaları

| Saat | Kullanılan doz | Kök ortalama uzunluğu | Deney ortamındaki tohum sayısı | Standart sapma | Saat | Kullanılan doz | Kök ortalama uzunluğu | Deney ortamındaki tohum sayısı | Standart sapma | Saat | Kullanılan doz | Kök ortalama uzunluğu | Deney ortamındaki tohum sayısı | Standart sapma |
|------|----------------|-----------------------|--------------------------------|----------------|------|----------------|-----------------------|--------------------------------|----------------|------|----------------|-----------------------|--------------------------------|----------------|
| 24 | 0 | ,47 | 60 | ,46 | 48 | 0 | 1,1 | 60 | ,82 | 72 | 0 | 2,13 | 60 | 1,16 |
| | 100 | ,09 | 60 | ,19 | | 100 | ,52 | 60 | ,50 | | 100 | 1,05 | 60 | ,91 |
| | 150 | ,04 | 60 | ,09 | | 150 | ,45 | 60 | ,43 | | 150 | 1,09 | 60 | ,74 |
| | 200 | ,07 | 60 | ,15 | | 200 | ,50 | 60 | ,44 | | 200 | 1,16 | 60 | ,84 |
| | 250 | ,04 | 60 | ,12 | | 250 | ,36 | 60 | ,36 | | 250 | ,83 | 60 | ,65 |
| | 300 | ,00 | 60 | ,04 | | 300 | ,19 | 60 | ,30 | | 300 | ,56 | 60 | ,64 |
| | 350 | ,00 | 60 | ,00 | | 350 | ,05 | 60 | ,15 | | 350 | ,15 | 60 | ,34 |
| | Total | ,10 | 420 | ,25 | | Total | ,46 | 420 | ,56 | | Total | ,99 | 420 | ,97 |

Tablo 4.4. Kullanılan doza göre toplam kök uzunluklarının ortalama ve standart sapmaları

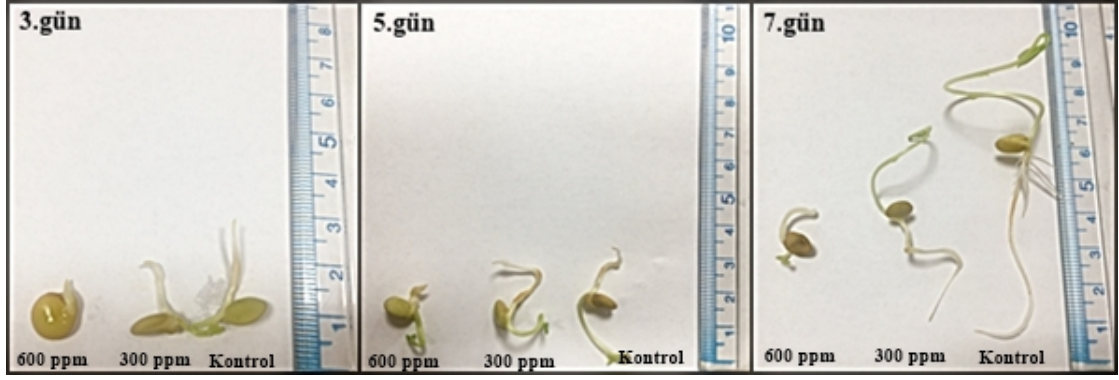
| Saat | Kullanılan doz | Kök ortalama uzunluğu | Deney ortamındaki tohum sayısı* | Standart sapma |
|--------|----------------|-----------------------|---------------------------------|----------------|
| Toplam | 0 | 1,24 | 180 | 1,09 |
| | 100 | ,55 | 180 | ,72 |
| | 150 | ,53 | 180 | ,66 |
| | 200 | ,58 | 180 | ,71 |
| | 250 | ,41 | 180 | ,54 |
| | 300 | ,25 | 180 | ,47 |
| | 350 | ,06 | 180 | ,22 |
| | Total | ,52 | 1260 | ,761 |

*Her bir deney grubu sonucu 60 bireyden oluşan 3 tekrara aittir.



Şekil 4.5. Kontrol ve kumarin uygulaması sonucunda doz ve zamana (24, 48, 72 saat) göre ortalama *L.culinaris*'de kök uzunluklarındaki değişimler

Çimlenme materyal ve metod kısmında anlatıldığı gibi petri ortamında gerçekleştirildi. Tohumların 3. 5. ve 7. gündeki görünüşleri Şekil 4.6'da verildi. Tohumların gelişim aşamasının 7. gününde özellikle 600 ppm kumarin konsantrasyonunda kök uzunluğu çok küçük kaldı. Şekilden de görüldüğü gibi çimlenme 3. 5. ve 7. gündeki görünüşleri kontrole göre kök gelişiminin yavaşladığını gösterdi. Sonuç olarak çimlenme aşamasında artan kumarin konsantrasyon ile kontrol grubu arasında önemli farklılıklar tespit edildi.



Şekil 4.6. Kontrol grubu ve artan kumarin konsantrasyonlarının 3., 5. ve 7. gün sonundaki *L.culinaris* kökleri üzerine olan etkileri

4.2.2. Mitotik indeks sonuçları

Mitotik indeks oranı üzerine EC50 ve 2XEC50 kumarin konsantrasyonlarında *L.culinaris* tohumları üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı ($P<0,05$) bulundu. Mitotik indeks 48 saat ve 72 saatlik periyotlarda ayrı ayrı hesaplandı. Her bir deneyde 5000 hücre tarandı ve 500 bölünen hücre sayıldı. 48 saatlik ortalama mitotik indeks oranı Hoagland çözeltilisinde çimlendirilen tohumlarda 11,54 olurken 300 ppm ve 600 ppm kumarin konsantrasyonlarında sırasıyla %8,05 ve %5,50 oldu (Tablo 4.5). 72 saatlik verilerde 48 saatlik ile paralel oldu. Kontrol grubunda ortalama mitotik indeks %10,45 iken EC50 ve 2xEC50 kumarin konsantrasyonlarında sırasıyla %4,67 ve %3,96 oldu (Tablo 4.5). Bu veriler artan kumarin konsantrasyonunun hücre bölünmesine karşı inhibisyon etkisi yaptığını göstermektedir. ANOVA tablosu da Tablo 4.6'da gösterildi.

Tablo 4.5. Farklı kumarin konsantrasyonlarının *L.culinaris* kök ucu hücrelerindeki mitotik indekse etkileri

| Süre (Saat) | Uygulanan Doz | Sayılan Hücre Sayısı \bar{X} | Bölünen Hücre Sayısı \bar{X} | Mitotik indeks $\bar{X}+SS^*$ (%) | Standart Hata | P Değeri |
|-------------|---------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------|-------------|
| 48 | Kontrol | 5154 | 595 | 11,54 ± ,220 | 0,27 | - |
| | 300 ppm | 5031 | 405 | 8,05 ± ,368 | 0,06 | 0,00 |
| | 600 ppm | 5105 | 281 | 5,50 ± ,18 | 0,10 | 0,00 |
| 72 | Kontrol | 5043 | 527 | 10,45 ± ,218 | 0,12 | - |
| | 300 ppm | 5127 | 244 | 4,67 ± ,119 | 0,21 | 0,00 |
| | 600 ppm | 5170 | 205 | 3,96 ± ,02 | 0,01 | 0,00 |

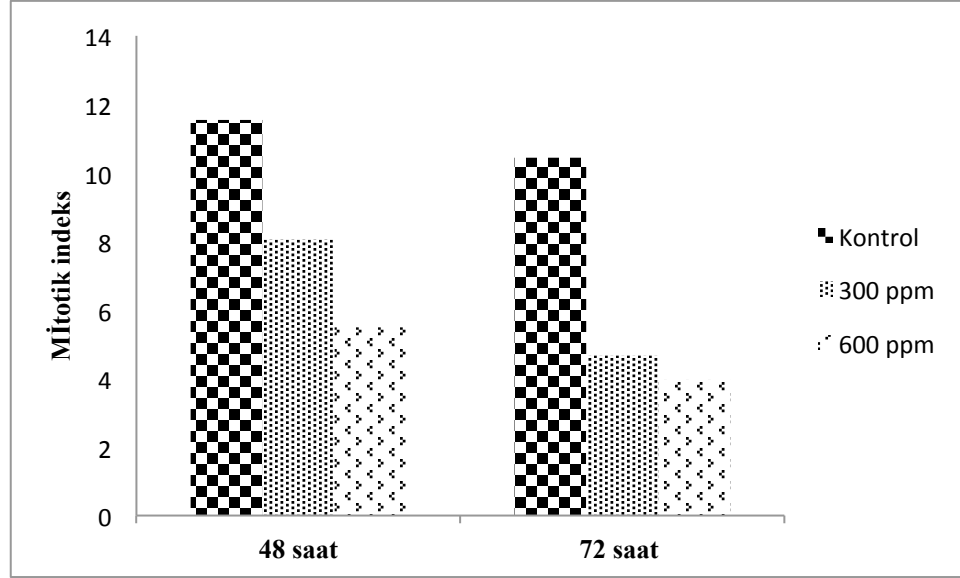
* $\bar{X}+SS^*$ (ortalamalar ± Standart Sapma) (P<0,05)

Tablo 4.6. Farklı kumarin konsantrasyonlarının *L.culinaris* kök ucu hücrelerindeki mitotik indeks üzerindeki etkilerini gösteren ANOVA tablosu

| Süre (Saat) | Değişim Kaynağı | Serbestlik Derecesi | Kareler Toplamı | Kareler Ortalaması | F | P | Standart Sapma |
|-------------|-----------------|---------------------|-----------------|--------------------|---------|--------------|----------------|
| 48 saat | İşlem | 2 | 63,685 | 31,843 | 516,647 | ,000* | 0,248 |
| | Hata | 6 | ,370 | ,062 | | | |
| | Toplam | 8 | 64,055 | - | | | |
| 72 saat | İşlem | 2 | 54,862 | 27,431 | 308,051 | ,000* | 0,298 |
| | Hata | 6 | ,534 | ,089 | | | |
| | Toplam | 8 | 55,396 | - | | | |

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında p<0,05 düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Veriler grafiksel olarak Şekil 4.7’de verildi. Bu verilerden de görüleceği gibi artan kumarin konsantrasyonları arttıkça mitotik indeks azaldı.



Şekil 4.7. Farklı kumarin konsantrasyonlarının *L.culinaris* kök ucu hücrelerindeki mitotik indekse etkileri

4.2.3. Kromozom anormalliklerinin belirlenmesi

EC50 ve 2xEC50 kumarin konsantrasyonlarında ve kontrol grubunda *L.culinaris* bitkisinin kök ucu hücrelerinde, mitoz bölünmenin farklı evrelerinde gözlenen çeşitli kromozomal anormallikler incelendi. Normal ve anormal bölünen hücreler sayıldı ve bunların yüzdelik verileri girildi. Kontrol grubu ve farklı kumarin konsantrasyonlarının anormal bölünen hücrelerdeki mitoz bölünme yüzdelerinin ortalamaları grafik üzerinde gösterildi. Ayrıca var olan her bir kromozom anormalliği çeşidi tek tek belirlenerek yüzdelik dilimleri bulundu. Son olarak kromozom anormallerinin her bir uygulama grubunda mikroskopik görüntüleri verildi. Deneyleerde 3 tekrar yapıldı.

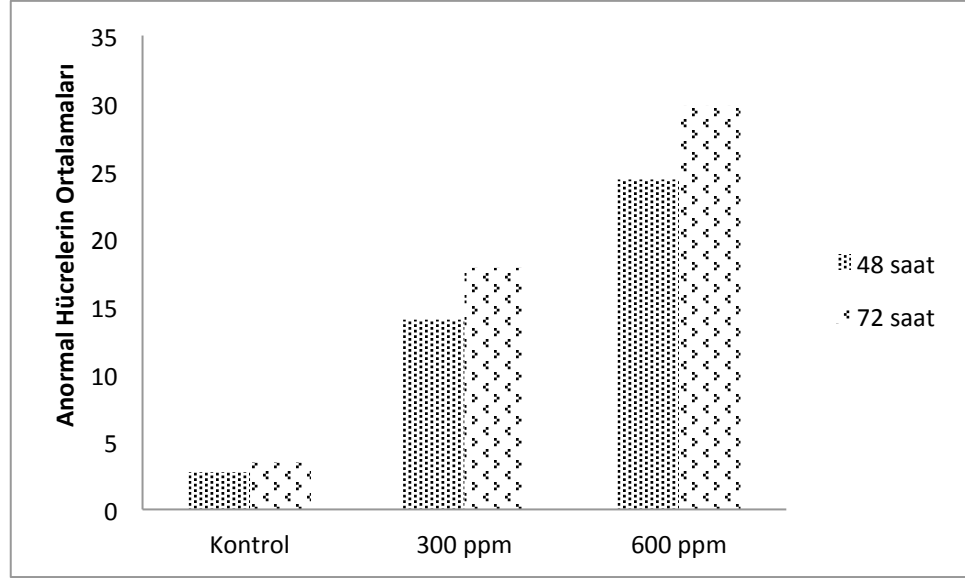
Kontrol ve farklı kumarin konsantrasyonları ile muamele edilen *L.culinaris* kök ucu hücrelerindeki mitoz bölünme evrelerine ait ortalama ve standart hata değerleri 48 ve 72 saatlik periyotlarda belirlendi (Tablo 4.7). Bu veriler incelendiğinde 48 ve 72 saatlik periyotlarda kontrol grubuna göre artan kumarin konsantrasyonlarında anormal bölünen hücrelerde artış gözlemlendi. 48 saatlik sürede kontrol grubuna göre en fazla anormal bölünen hücre 600 ppm kumarin konsantrasyonunda metafaz evresinde (31,08) gözlemlendi. Daha sonra sırasıyla yine 600 ppm de profaz (24), telofaz (21,21) ve anafaz (19,71) evrelerinde belirlendi. 72 saatlik sürede ise kontrol grubuna göre en fazla anormal bölünen hücre 600 ppm kumarin konsantrasyonunda anafaz evresinde

(48,14) gözlemlendi. Daha sonra sırasıyla yine 600 ppm de metafaz (40,74), profaz (22,32) ve telofaz (19,71) evrelerinde anormallik belirlendi. Bu veriler artan kumarin konsantrasyonlarının her bir bölünme evresinde anormal bölünen hücre miktarlarını arttırdığını gösterdi.

Tablo 4.7. Kontrol ve farklı kumarin konsantrasyonlarının *L.culinaris* kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme evrelerine ait ortalama sayıları ve yüzdeleri verileri (N:Normal bölünen hücreler, A;Anormal bölünen hücreler, %;yüzdeleri verileri)

| Süre (saat) | Uygulanan Doz | Profaz | | | Metafaz | | | Anafaz | | | Telofaz | | |
|-------------|---------------|--------|----|--------------|---------|----|--------------|--------|----|--------------|---------|----|--------------|
| | | N | A | % | N | A | % | N | A | % | N | A | % |
| 48 | Kontrol | 232 | 3 | 1,27 | 133 | 5 | 3,6 | 143 | 5 | 3,37 | 95 | 4 | 4,04 |
| | 300ppm | 119 | 20 | 14,38 | 98 | 16 | 14,03 | 84 | 13 | 13,40 | 86 | 14 | 14 |
| | 600ppm | 122 | 40 | 24 | 51 | 23 | 31,08 | 57 | 14 | 19,71 | 52 | 14 | 21,21 |
| 72 | Kontrol | 206 | 4 | 1,9 | 111 | 6 | 5,1 | 107 | 4 | 3,66 | 105 | 5 | 5,6 |
| | 300ppm | 113 | 26 | 18,7 | 73 | 21 | 22,34 | 63 | 14 | 18,18 | 92 | 13 | 12,38 |
| | 600ppm | 87 | 25 | 22,32 | 32 | 22 | 40,74 | 29 | 26 | 48,14 | 57 | 14 | 19,71 |

Şekil 4.8’de kontrol grubu ve kumarinin *L.culinaris* kök ucu hücrelerindeki 48 ve 72 saatlik sürelerde mitoz bölünme evrelerine ait ortalama sayılarına ait grafik verildi. Bu grafik verilerinden de görüleceği gibi özellikle 600 ppm kumarin konsantrasyonunda anormal hücrelerin sayılarındaki artış belirgindir.



Şekil 4.8. Kontrol grubu ve kumarin uygulanan *L.culinaris* kök ucu hücrelerinde 48 ve 72 saatlik bölünme evrelerinde anormal hücrelerin ortalama sayıları

Tablo 4.8’de Kontrol grubu ve EC50 ve 2xEC50 kumarin uygulanan *L.culinaris* kök hücrelerinde 48 saatlik ve 72 saatlik sürelerde ortaya çıkan kromozom hasarı çeşitleri ve oranları verildi. En çok rastlanan hasarlar düzensiz profaz (% 17,9), nükleus deformasyonu (% 14,7) düzensiz metafaz (% 17,9) ve nükleus deformasyonu (%14,7)’dur. En az rastlanan hasarlar multipolarite (% 1,1), bölünme düzleminde değişim (% 1,4) ve tabla kayması (% 1,4) olarak belirlendi.

Tablo 4.8. *L.culinaris* kök hücrelerinde kontrol grubu ve kumarin konsantrasyonlarının etkisiyle ortaya çıkan kromozom hasarı çeşitleri ve oranları

| Süre saat | Konsantrasyon ppm | Sayılan Hücre | HDD | DP | DM | YK | YP | TK | K | GKK | KK | CM | B | M | MKI | NH | DT | NT | ND | KG | KK | BDD | DA |
|----------------------------|----------------------|------------------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|
| 48 | 0 | 500 | 0 | 3 | 4 | 2 | 0 | 0 | 2 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | 300 | 500 | 0 | 12 | 16 | 3 | 0 | 1 | 0 | 8 | 0 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 4 | 1 | 6 | 0 | 1 |
| | 600 | 500 | 7 | 25 | 19 | 4 | 7 | 1 | 2 | 4 | 3 | 5 | 6 | 1 | 3 | 29 | 5 | 1 | 15 | 3 | 6 | 2 | 0 |
| 72 | 0 | 500 | 0 | 1 | 6 | 2 | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 |
| | 300 | 500 | 12 | 21 | 11 | 2 | 2 | 1 | 0 | 9 | 3 | 1 | 2 | 2 | 2 | 5 | 2 | 1 | 9 | 1 | 5 | 0 | 2 |
| | 600 | 500 | 32 | 17 | 9 | 3 | 5 | 3 | 4 | 8 | 10 | 3 | 4 | 1 | 4 | 35 | 3 | 1 | 19 | 1 | 6 | 0 | 1 |
| Anormallik Yüzdesi % | | | 11,5 | 17,9 | 14,7 | 3,6 | 3,2 | 1,4 | 2,3 | 8,1 | 3,6 | 3,6 | 2,9 | 1,1 | 2,7 | 15,6 | 11,5 | 17,9 | 14,7 | 3,6 | 3,2 | 1,4 | 2,3 |

HDD: Hücre duvar deformasyonu, DP: Düzensiz Profaz, DM: Düzensiz Metafaz, YK: Yapışık Kromozom, YP: Yapışkan profaz, TK: Tabla Kayması, K: Köprü, GKK: Geri Kalmış Kromozom, KK: Kalın kromozom, CM: C Mitoz, B: Binukleus, M: Multipolarite, MKİ: Metafazda kromozom ipliği, NH: Nekrotik hücre, DT: Düzensiz telofaz, NT: Nükleer tomurcuk, ND: Nükleus deformasyonu, KG: Kromozom granülasyonu, KK: Kutup Kayması, BDD: Bölünme Düzleminde Değişim, DA: Düzensiz anafaz

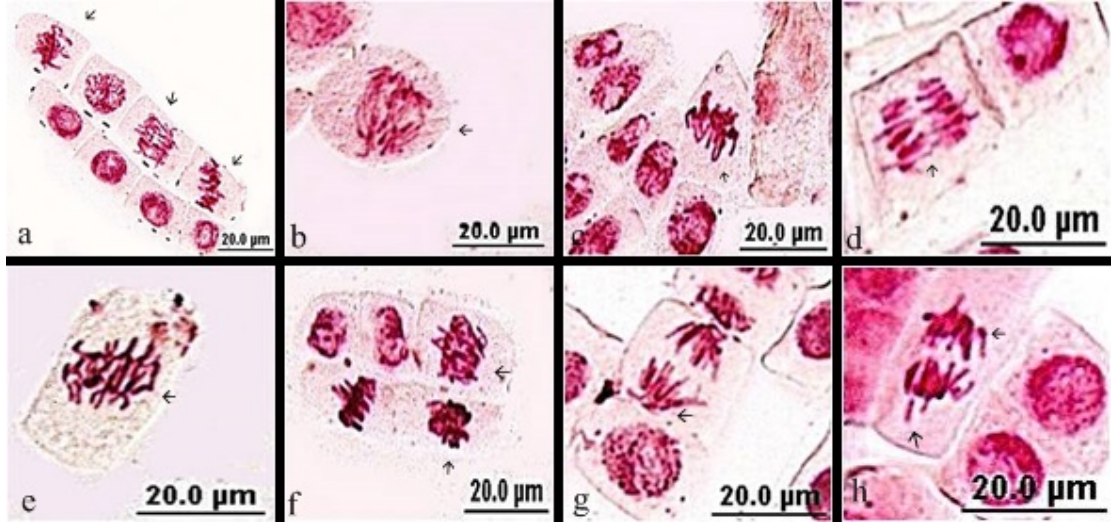
Tablo 4.9’da *L.culinaris* kök hücrelerinde farklı periyotlarda kontrol grubu ve kumarin muamelesi sonrasında mitotik indeks yüzdeleri, anormal mitoz oranları ve her bir bölünme evresindeki normal ve anormal hücre sayıları bir arada verilerek daha iyi bir kıyaslama yapabilmek olanağı sağlandı. Böylelikle kumarinin sitotoksik etkileri daha net gözlemlendi.

Tablo 4.9. *L.culinaris* kök hücrelerinde farklı sürelerde kontrol grubu ve kumarin muamelesinin etkisiyle ortaya çıkan mitotik indeks yüzdeleri, anormal mitoz oranları ve her bir bölünme evresindeki hücre sayıları

| Uygulama süresi | Uygulanan Doz | Sayılan hücre | Profaz | | Metafaz | | Anafaz | | Telofaz | | Mitotik indeks (%) | Anormal mitoz (%) |
|-----------------|---------------|---------------|--------|-------|---------|------|--------|------|---------|------|--------------------|-------------------|
| | | | Total | Anor. | Total | Anor | Total | Anor | Total | Anor | | |
| 48 | kontrol | 5154 | 232 | 3 | 133 | 5 | 143 | 5 | 95 | 4 | 11,54 | 2,74 |
| | 300 ppm | 5031 | 119 | 20 | 98 | 16 | 84 | 13 | 86 | 14 | 8,05 | 14 |
| | 600 ppm | 5105 | 122 | 40 | 51 | 23 | 57 | 14 | 52 | 14 | 5,50 | 24,39 |
| 72 | kontrol | 5043 | 206 | 4 | 111 | 6 | 107 | 4 | 105 | 5 | 10,45 | 3,46 |
| | 300 ppm | 5127 | 113 | 26 | 73 | 21 | 63 | 14 | 92 | 13 | 4,67 | 17,83 |
| | 600 ppm | 5170 | 87 | 25 | 32 | 22 | 29 | 26 | 57 | 14 | 3,96 | 29,79 |

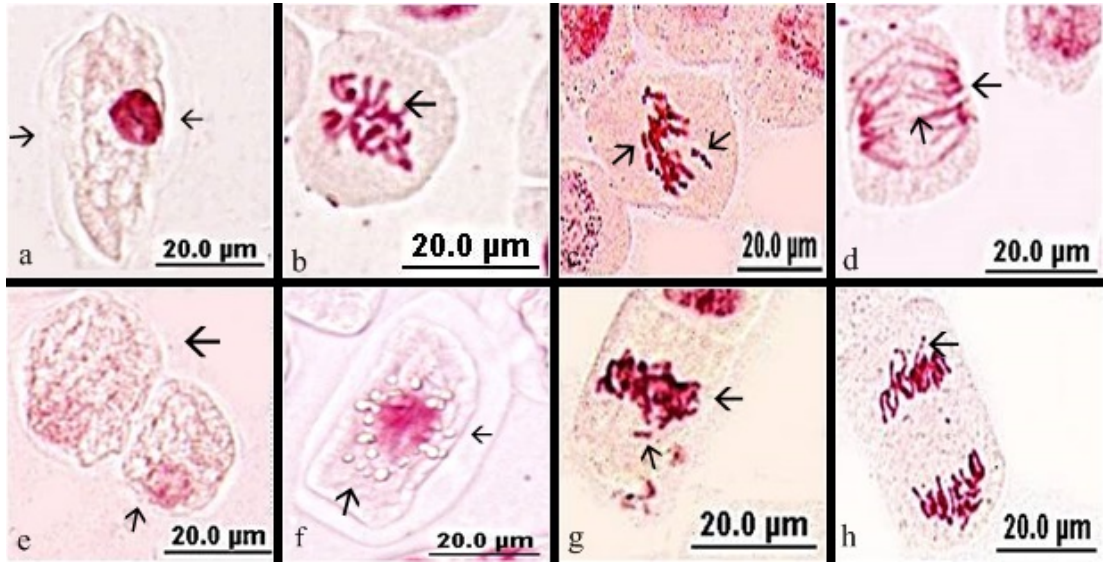
Elçi’ye (1994) göre kromozom sayımında iyi gözlem yapabilmek için, kromozomların iyi bir şekilde boyanması ve sitoplazmanın mümkün olduğunca daha az boyanmış olması gerekir. İlk işlem maddelerinin, boyanın, bunların oranlarının, uygulanma sürelerinin ve hidrolizinin iyi bir şekilde tespit edilmesi, kromozom sayımı ve karyotip analizi için önemlidir. Ayrıca, dokudaki hücrelerin birbirinden ayırıp daha iyi gözlemlenmesini sağlayan hidroliz için sıcaklık derecesi, kullanılan HCl’nin konsantrasyonu ve zaman çok önemli faktörlerdir.

Hoagland çözeltilinde çimlendirilen *L.culinaris* kök ucu hücrelerinde meydana gelen kromozom anormalliklerinin bazıları Şekil 4.9’da gösterildi.



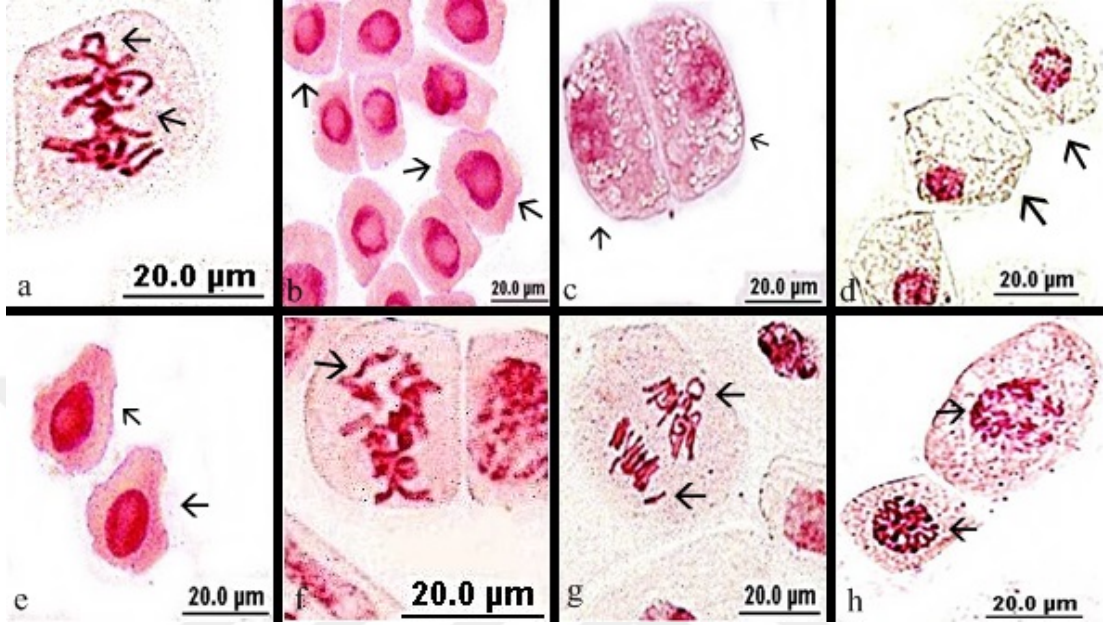
Şekil 4.9. Kontrolde (Hoagland çözeltisi) çimlendirilen *L.culinaris* kök ucu hücrelerinde kromozom anormallikleri a- kalgın kromozom, düzensiz metafaz ve metafazda ekvator düzleminde kayma, b-Yapışık kromozom c- Kromozom ipliği ve düzensiz profaz, d- Anafazda köprü oluşumu, e-Kalgın kromozom, f-Düzensiz metafaz, g-Tabla kayması, h- Kalgın kromozom

300 ppm(EC50) kumarin konsantrasyonunda çimlendirilen *L.culinaris* kök ucu hücrelerinde meydana gelen kromozom anormalliklerinin bazıları Şekil 4.10'da gösterildi.



Şekil 4.10. 300ppm (EC50) kumarin konsantrasyonunda çimlendirilen *L.culinaris* kök ucu hücrelerinde meydana gelen kromozom anormallikleri a ve f- Nekrotik hücre ve hücre duvarı kalınlaşması, b- Kromozom yapışması, c-Kalgın kromozom, d- Multipolarite ve tabla kayması, e ve f- Nekrotik hücre, g- Kalgın kromozom ve kromozom granülasyonu h- Geri kalmış kromozom

600 ppm (2xEC50) kumarin konsantrasyonunda çimlendirilen *L.culinaris* kök ucu hücrelerinde meydana gelen kromozom anormalliklerinin bazıları Şekil 4.11'de gösterildi.

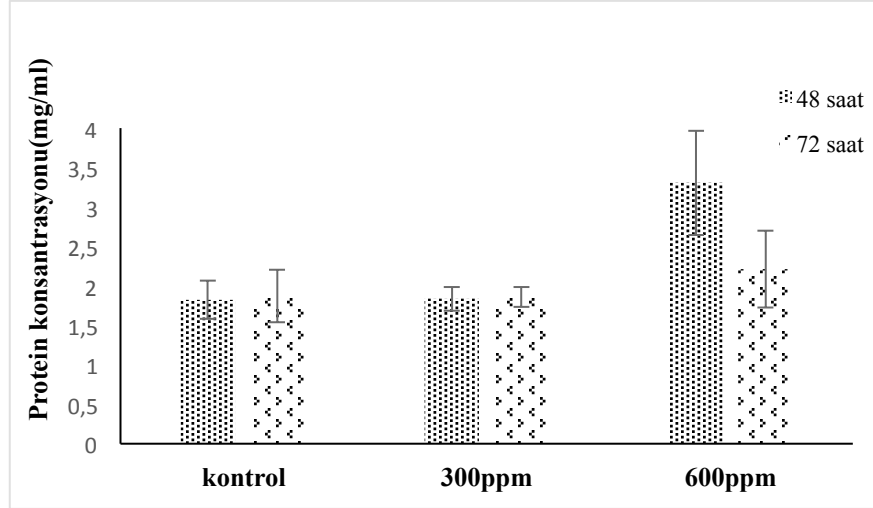


Şekil 4.11. 600 ppm (2xEC50) kumarin konsantrasyonunda çimlendirilen *L.culinaris* kök ucu hücrelerinde kromozom anormallikleri a ve f- C-mitoz, b-Hücre duvar deformasyonu, c ve d- Nekrotik hücre, e- Hücre duvar deformasyonu, g- Kromozom ipliği ve kalgın kromozom, h-Kromozom granülasyonun

4.3. Biyokimyasal Analizler

4.3.1. Toplam protein analizi

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarındaki 48. ve 72. saat sonrasında total protein miktarlarının belirlenmesinde tüm gruplar 3 kere çalışıldı ve sonuçların ortalaması alınarak istatistiksel anlamlılığı SPSS 18.0 programında ANOVA testi kullanılarak belirlendi (Tablo 4.10).



Şekil 4.12. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarında 48. ve 72. saat sonrasında total protein miktarları

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarındaki 48. ve 72. saat süre sonunda ekstraktlar hazırlandı ve bu ekstraktlardaki total çözünebilir protein miktarları (mg/g taze ağırlık), Bradford (1976) yöntemine göre, standart grafik kullanılarak belirlendi (Şekil 4.12).

Tablo 4.10. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarındaki 48. ve 72 saat protein miktarlarının ortalama değerleri ve istatistiksel veriler

| Süre(saat) | Uygulanan Kumarin Dozu | mg/ml protein \bar{x} | Standart Sapma | Standart Hata | P Değeri |
|------------|------------------------|-------------------------|----------------|---------------|----------|
| 48 | Kontrol | 1,82 | 0,29 | 0,17 | - |
| | 300ppm | 1,83 | 0,18 | 0,10 | ,950 |
| | 600ppm | 3,30 | 1,17 | 0,67 | ,102 |
| 72 | Kontrol | 1,87 | 0,41 | 0,23 | - |
| | 300ppm | 1,86 | 0,15 | 0,09 | ,961 |
| | 600ppm | 2,21 | 1,08 | 0,62 | ,642 |

48 saat sonunda yapılan ölçümlerde, kontrol ve 300 ppm kumarin konsantrasyonunda protein içeriğinin (1,82 mg/ml ve 1,83 mg/ml) fazla değişmediği buna karşın 600 ppm kumarin uygulanmış örneklerde protein içeriğinin (3,30 mg/ml) belirgin şekilde

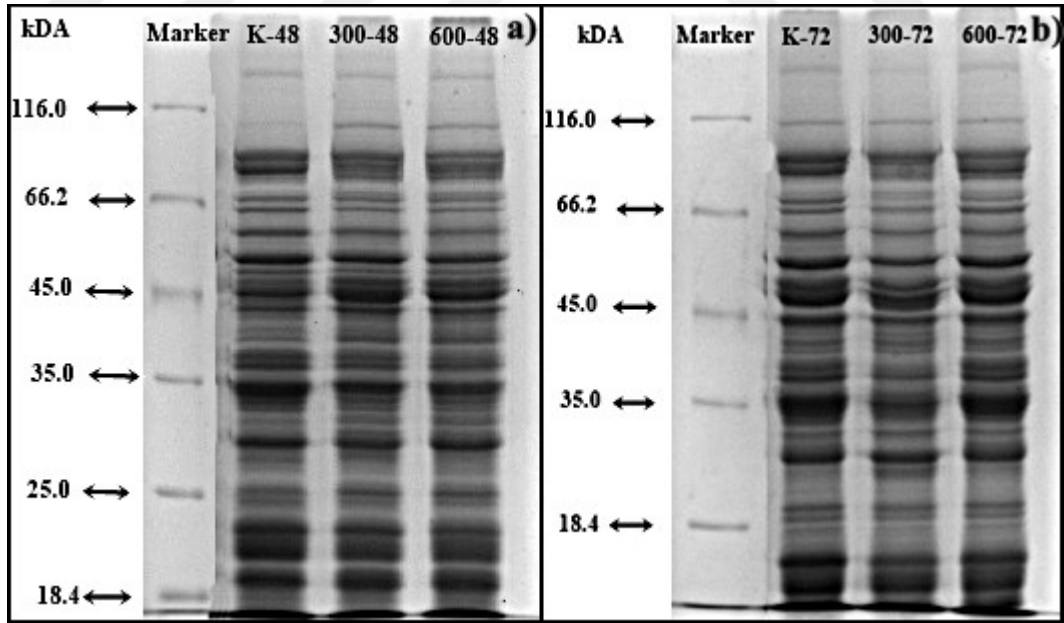
arttığı gözlemlendi. Ancak bu değerlerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi (Tablo 4.10).

72 saat sonunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde 48 saat süre sonundaki veriler ile benzer sonuçların çıktığı görüldü. Kontrol ve 300 ppm kumarin konsantrasyonunda protein içeriğinin 1,87 mg/ml ve 1,86 mg/ml fazla değişmediği, 600 ppm kumarin uygulanmış örneklerde protein içeriğinin 2,21 mg/ml olduğu gözlemlendi.

48 saat ve 72 saat sonunda elde edilen veriler karşılaştırıldığında; protein miktarının kontrol ve 300 ppm kumarin uygulamasında değişmediği 600 ppm de azalma meydana geldiği gözlemlendi.

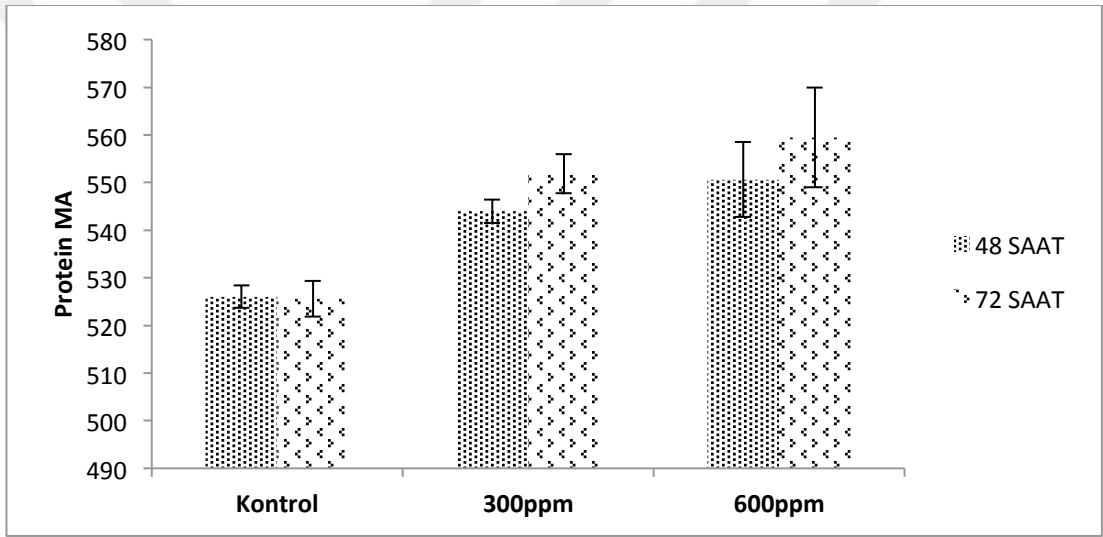
4.3.2. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi)

SDS-PAGE için hazırlanan %12'lik ayırma ve %4 yükleme jeline yüklenen protein markırı ile 48 saat ve 72 saatlik örnekler 180 V da 55 dk yürütüldükten sonra görüntülenerek fotoğrafı çekildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarındaki (a) 48.ve (b) 72. saat SDS-PAGE sonrası oluşan toplam proteinlere ait bant profilleri(K-48; Kontrol 48 saatlik, 300-48; 300 ppm kumarin 48 saatlik,600-48; 600 ppm kumarin 48 saatlik, K-72; Kontrol 72 saatlik, 300-72;300 ppm kumarin 72 saatlik, 600-72; 600 ppm kumarin 72 saatlik örnekler)

48 ve 72 saat sonunda elde edilen örneklerin SDS-PAGE analizinde; 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulamaları sonucunda örneklerin protein bant yoğunluğunun arttığı gözlemlendi. Şekil 4.14’de kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarındaki 48. ve 72. saat sonrasında SDS-PAGE ile görüntülenen toplam proteinlere ait ortalama moleküler ağırlık verileri verildi. Yapısal ve düzenleyici proteinlerdeki değişimi gözlemek için, çözümlü protein örneklerinin SDS-PAGE analizleri yapıldı. Aynı ayrı elektroforeze tabi tutulan her bir örneğin bant profilleri kontrolleriyle kıyaslanarak değerlendirildi. Artan kumarin konsantrasyonlarının *L.culinaris* tohumlarının protein profillerinde bant yoğunluklarında artış veya azalmalara neden olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.14. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarındaki 48.ve 72 saat sonrasında SDS-PAGE ile gözlenen toplam proteinlere ait ortalama moleküler ağırlık verileri

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarındaki 48. ve 72. saat sonrasında oluşan moleküler ağırlık değerlerinin ortalama ve istatistiksel verileri Tablo 4.11’de verildi. Kontrol grubu ve örneklerin protein bantlarının moleküler ağırlıkları Vision WorksLS Version 6.8 programıyla belirlendi. 48 saat sonunda elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubunun protein bantlarının moleküler ağırlıkları 526,03, 300 ppm kumarin konsantrasyonunda protein bantlarının moleküler ağırlıkları 543,90, 600 ppm kumarin uygulanmış örneklerde protein bantlarının moleküler ağırlıkları 550,6 olarak belirlendi (Tablo 4.11).

72 saat sonunda çıkan sonuçlara göre, kontrol grubunun protein bantlarının

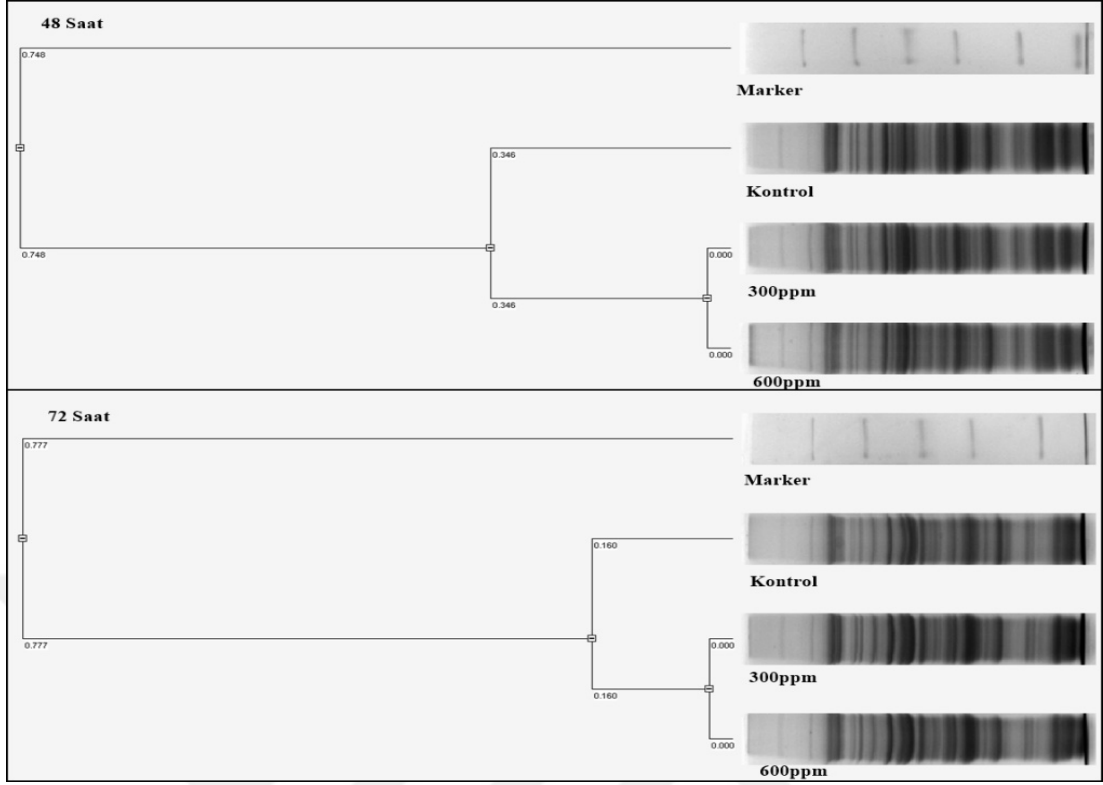
moleküler ağırlıkları 525,59, 300 ppm kumarin konsantrasyonunda protein bantlarının moleküler ağırlıkları 551,83, 600 ppm kumarin uygulanmış örneklerde protein bantlarının moleküler ağırlıkları 559,47 olarak belirlendi (Tablo 4.11). Bu verilere göre ortalama moleküler ağırlık verilerinde artan konsantrasyonla orantılı olarak artış tespit edildi. İstatiksel olarak veriler anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Tablo 4.11. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarındaki 48. ve 72. saat sonrasında oluşan moleküler ağırlık değerlerinin ortalama ve istatistiksel verileri

| Süre(saatt) | Uygulanan Doz | Protein MW \bar{x} | Standart sapma | Standart Hata | P değeri |
|-------------|---------------|----------------------|----------------|---------------|---------------|
| 48 | Kontrol | 526,03 | 2,36 | 5,61 | - |
| | 300ppm | 543,94 | 2,42 | 6,57 | 0,02* |
| | 600ppm | 550,6 | 7,87 | 7,64 | 0,013* |
| 72 | Kontrol | 525,59 | 3,74 | 2,91 | - |
| | 300ppm | 551,83 | 4,12 | 2,64 | 0,007* |
| | 600ppm | 559,47 | 10,45 | 7,39 | 0,013* |

* Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p<0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

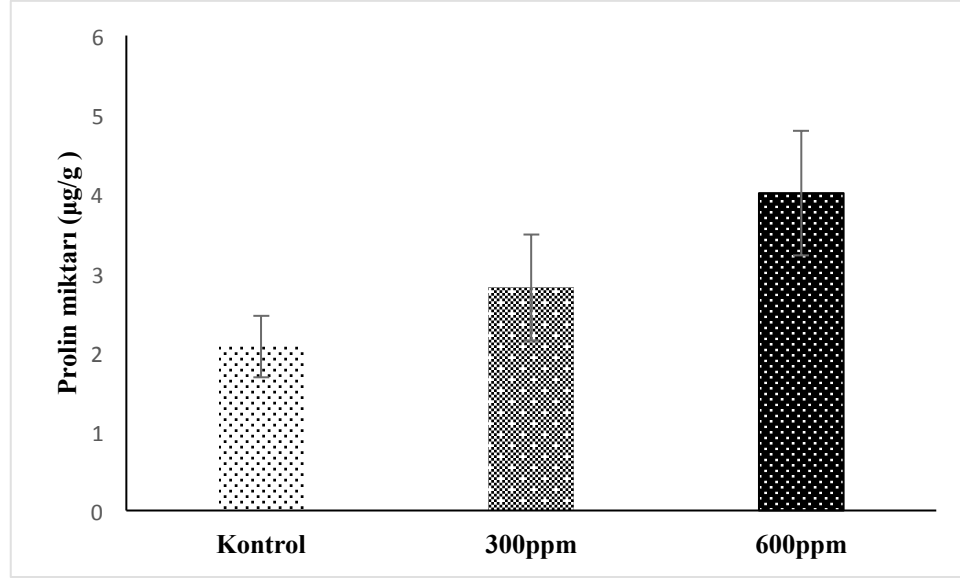
Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarındaki 48. ve 72. saat sonrasında SDS-PAGE analizi ile elde edilen protein bant profillerinin uygulama grupları için ayrı değerlendirilmesi ile elde edilen dendrogram ve uygulama grupları arasındaki uzaklık değerleri Şekil 4.15’de gösterildi. Dendrogram Past analizi sonucunda Nei (1972)’ye göre hesaplanan veriler UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) metoduna göre çizildi. Dendrogramda uygulama yapılmış ve yapılmamış tohumlar iki ana küme oluşturdu. Her iki zaman uygulaması için; 300 ppm kumarin uygulanması ve 600 ppm kumarin uygulaması kontrol grubu ayrı dallanma gösterdi.



Şekil 4.15. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarındaki 48. ve 72. saat sonrasında SDS-PAGE ile elde edilen protein bant profillerinin uygulama grupları için ayrı değerlendirilmesi ile elde edilen dendrogram

4.3.3. Prolin tayini

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerindeki 72. saat sonrasında oluşan prolin miktarlarının belirlenmesinde tüm gruplar 3 kere çalışıldı ve sonuçların ortalaması alınarak istatistiksel anlamlılığı SPSS 18.0 programında ANOVA testi kullanılarak belirlendi (Tablo 4.12 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerindeki 72. saat sonrasında oluşan prolin miktarları

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerinden 72. saat süre sonunda tüm deney gruplarından ayrı ayrı olmak üzere ekstraktlar hazırlandı ve bu ekstraktlardaki prolin (mg/g taze ağırlık) miktarı, standart grafik kullanılarak belirlendi (Şekil 4.16). 72. saat sonrasında ölçülen prolin miktarları değerlendirildiğinde, kontrol grubunda 2,07 µg/g prolin miktarı belirlenirken, 300 ppm kumarin konsantrasyonunda 2,81 µg/g ve 600 ppm kumarin konsantrasyonunda 4,00 µg/g olarak tespit edildi ve kontrole göre artan değerler tespit edildi (Tablo 4.12). 600 ppm kumarin uygulaması istatistiksel olarak farklı bulundu.

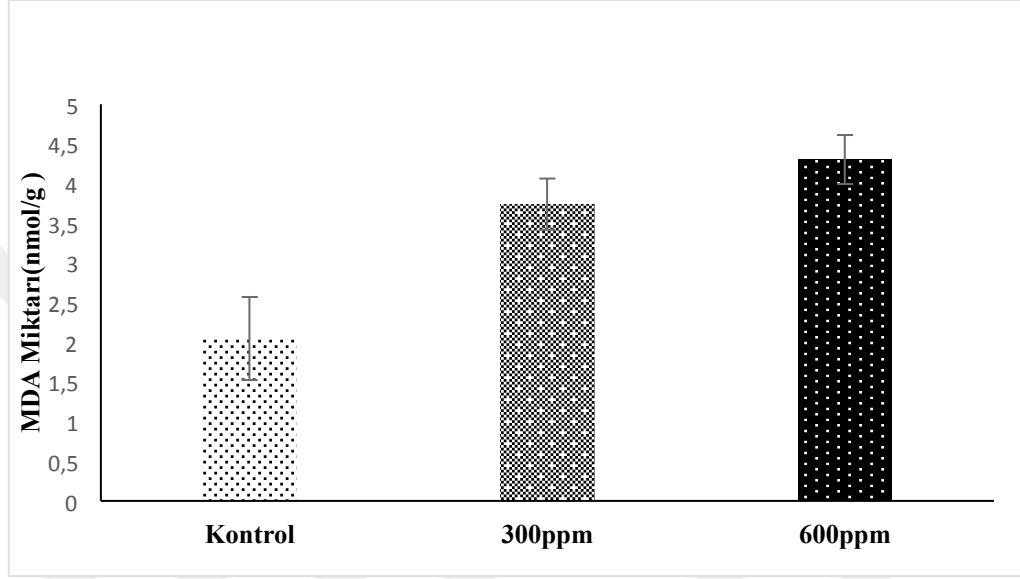
Tablo 4.12. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerindeki 72. saat sonrasında oluşan prolin miktarlarının ortalama değerleri

| Süre(saat) | Uygulanan Doz | Prolin µg/g \bar{x} | Standart sapma | Standart Hata | P değeri |
|------------|---------------|-----------------------|----------------|---------------|----------|
| | Kontrol | 2,07 | 0,39 | 0,43 | - |
| 72 | 300ppm | 2,81 | 0,96 | 0,12 | ,143 |
| | 600ppm | 4,00 | 0,98 | 0,44 | ,002* |

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

4.3.4. Lipid peroksidasyonu

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerindeki 72. saat sonrasında oluşan MDA miktarlarının belirlenmesinde tüm gruplar 3 kere çalışıldı ve sonuçların ortalaması alınarak istatistiksel anlamlılığı SPSS 18.0 programında ANOVA testi kullanılarak belirlendi (Tablo 4.13 ve Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerindeki 72. saat sonrasında ölçülen MDA miktarları

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerindeki 72. saat sonrasında tespit edilen MDA miktarları değerlendirildiğinde, kontrol grubunda 2,04 nmol/g MDA miktarı belirlenirken, 300 ppm kumarin konsantrasyonunda 3,74 nmol/g ve 600 ppm kumarin konsantrasyonunda 4,30 nmol/g olarak bulundu ve kontrole göre artan değerler tespit edildi (Tablo 4.13). 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulaması istatistiksel olarak farklı bulundu.

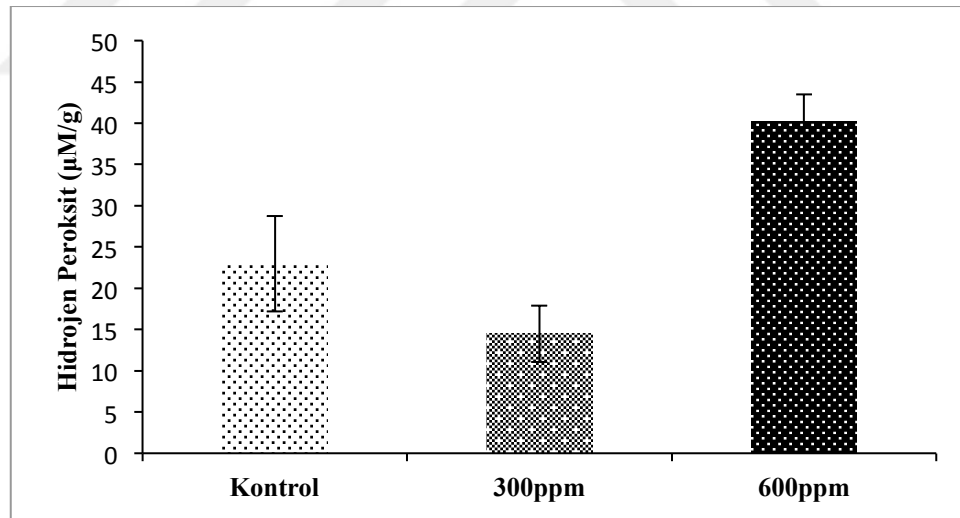
Tablo 4.13. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerindeki 72. saat sonrasında oluşan MDA miktarlarının ortalama değerleri ve istatistiksel verileri

| Süre(saat) | Uygulanan Doz | MDA nmol/g \bar{x} | Standart sapma | Standart Hata | P değeri |
|------------|---------------|-------------------------|----------------|---------------|----------|
| | Kontrol | 2,04 | 0,52 | 0,69 | - |
| 72 | 300ppm | 3,74 | 0,32 | 0,22 | ,018* |
| | 600ppm | 4,30 | 0,31 | 0,21 | ,006* |

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

4.3.5. Hidrojen peroksit (H_2O_2) tayini

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerindeki 72. saat muameleden sonra H_2O_2 miktarlarının belirlenmesinde tüm gruplar 3 kere çalışıldı ve sonuçların ortalaması alınarak istatistiksel anlamlılığı SPSS 18.0 programında ANOVA testi kullanılarak belirlendi (Tablo 4.14 ve Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerindeki 72. saat sonrasında ölçülen H_2O_2 miktarları

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerindeki 72. saat süre sonunda tüm gruplardan ayrı ayrı olmak üzere ekstraktlar hazırlandı ve bu ekstraktlerdeki H_2O_2 ($\mu M/g$ taze ağırlık) miktarı, standart grafik kullanılarak belirlendi (Şekil 3.7).

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerinde 72. saat sonrasında

kontrol grubunda 22,94 $\mu\text{M/g}$ H_2O_2 miktarı belirlenirken, 300 ppm kumarin konsantrasyonunda 14,48 $\mu\text{M/g}$ H_2O_2 miktarı, 600 ppm kumarin konsantrasyonunda ise 40,15 $\mu\text{M/g}$ H_2O_2 miktarı belirlendi. Bu değerlerle göre kontrole göre 300 ppm kumarin konsantrasyonunda H_2O_2 miktarı azalırken, 600 ppm kumarin konsantrasyonunda ise H_2O_2 miktarında artma tespit edildi (Tablo 4.14). 600 ppm kumarin uygulanması istatistiksel olarak farklı bulundu.

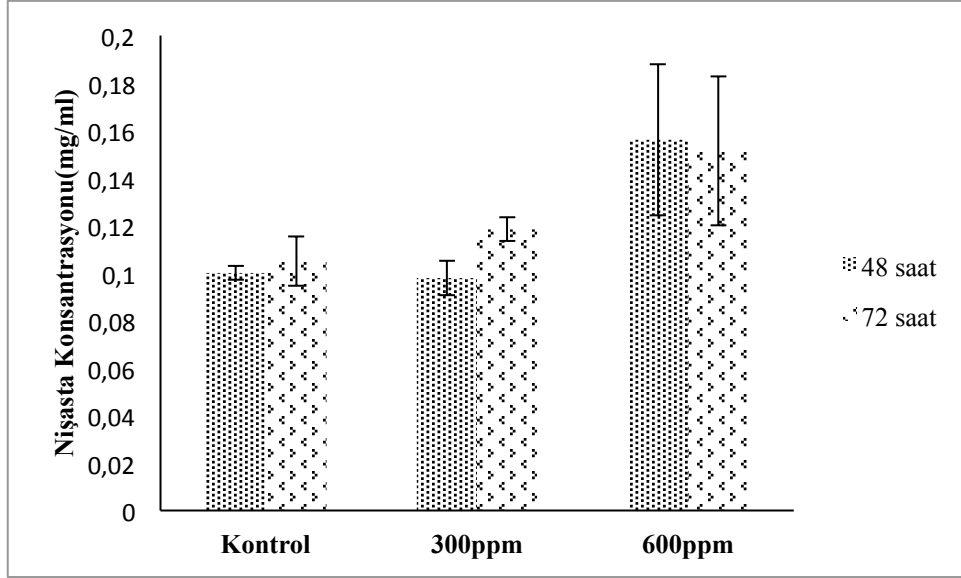
Tablo 4.14. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarındaki 72. saat sonrasında ölçülen H_2O_2 miktarlarının ortalama değerleri ve istatistiksel verileri

| Süre(saat) | Uygulanan Doz | H_2O_2 $\mu\text{M/g}$ \bar{x} | Standart sapma | Standart Hata | P değeri |
|------------|---------------|--|----------------|---------------|--------------|
| | Kontrol | 22,94 | 0,52 | 0,69 | - |
| 72 | 300ppm | 14,48 | 0,32 | 0,22 | ,150 |
| | 600ppm | 40,15 | 0,31 | 0,21 | ,022* |

* Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

4.3.6. α -Amilaz aktivitesinin ölçülmesi

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarında 48. ve 72. saat sonrasında oluşan nişasta konsantrasyonunun ve alfa amilaz aktivitesinin belirlenmesinde tüm gruplar 3 kere çalışıldı ve sonuçların ortalaması alınarak istatistiksel anlamlılığı SPSS 18.0 programında ANOVA testi kullanılarak belirlendi (Tablo 4.15 ve Şekil 4.19, Şekil 4.20).



Şekil 4.19. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarında 48. ve 72. saat sonrasında ölçülen nişasta miktarları

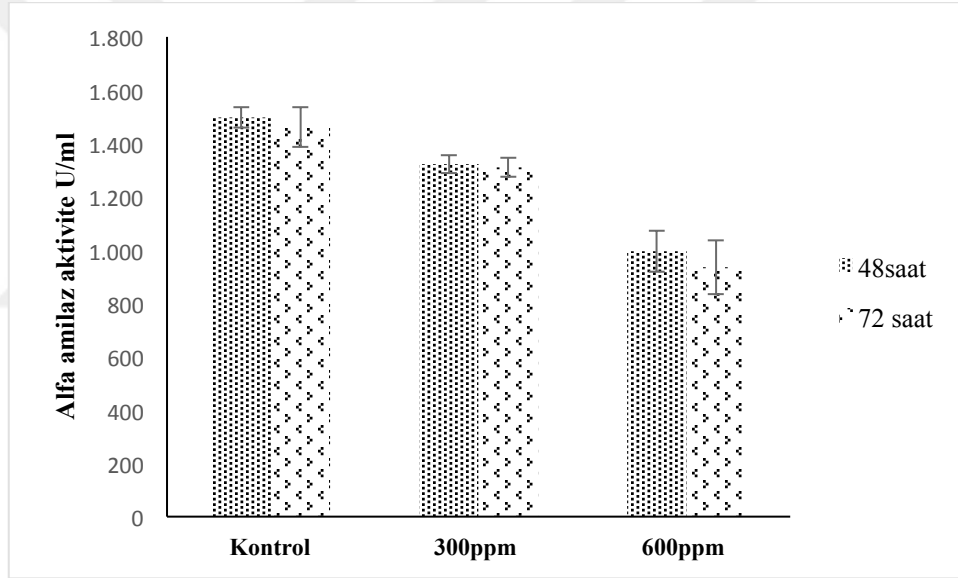
Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarında 48. ve 72. saat süre sonunda deney gruplarından ayrı olmak üzere ekstreler hazırlandı ve bu ekstrelerdeki nişasta konsantrasyonu (mg/ml) standart grafik kullanılarak belirlendi (Şekil 4.17).

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarında 48. saat sonrasında kalan nişasta konsantrasyonu miktarları değerlendirildiğinde, kontrol grubunda $0,10 \pm 0,002$ mg/ml nişasta konsantrasyonu belirlenirken 300 ppm kumarin konsantrasyonunda $0,12 \pm 0,007$ mg/ml belirlendi ve kontrole göre bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. 600 ppm kumarin konsantrasyonunda $0,15 \pm 0,031$ mg/ml olarak belirlendi ve kontrole göre artış gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.15).

72. saat sonrasında kalan nişasta konsantrasyonu miktarları değerlendirildiğinde, kontrol grubunda $0,10 \pm 0,010$ mg/ml nişasta konsantrasyonu belirlenirken 300 ppm kumarin konsantrasyonunda $0,11 \pm 0,004$ mg/ml nişasta konsantrasyonu belirlendi ve kontrole göre bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. 600 ppm kumarin konsantrasyonunda $0,18 \pm 0,031$ mg/ml olarak nişasta konsantrasyonu belirlendi ve kontrole göre artış gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.15).

48. ve 72. saat verileri karşılaştırıldığında artan kumarin konsantrasyonunda ortamda kalan nişasta miktarının arttığı gözlemlendi.

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarındaki 48. ve 72. saat sonrasında alfa amilaz aktivitesinin değerleri ortamda kalan nişasta konsantrasyonuna bağlı olarak azalma gösterdi (Şekil 4.20). Buna göre 48. saat sonrasında kontrol grubunda alfa amilaz aktivitesi 1.498 U/ml belirlenirken 300 ppm kumarin konsantrasyonunda 1.323 U/ml ve 600 ppm kumarin konsantrasyonunda 995,9 U/ml olarak belirlendi ve kontrole göre azalan değerler tespit edildi. 72. saat sonrasında 48. saate göre benzer veriler elde edildi. Kontrol grubunda alfa amilaz aktivitesi 1.461 U/ml belirlenirken 300 ppm kumarin konsantrasyonunda 1.311 U/ml ve 600 ppm kumarin konsantrasyonunda 934,81 U/ml kontrole göre azalan değerler tespit edildi (Tablo 4.15). 48 ve 72 saatlik 600 ppm kumarin uygulaması istatistiksel olarak farklı bulundu.



Şekil 4.20. Kontrol grubu ve kumarin konsantrasyonu uygulanmış *L.culinaris* tohumlarında 48. ve 72. saat sonrasında ölçülen Alfa amilaz aktivitesinin değerleri

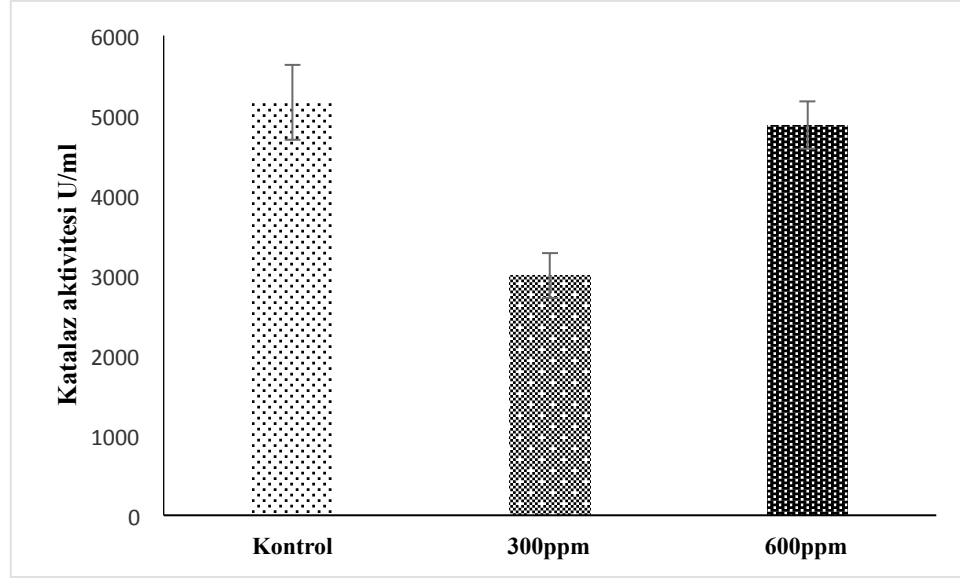
Tablo 4.15. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarındaki 48.ve 72. saat sonrasında oluşan nişasta konsantrasyonunun ve alfa amilaz aktivitesinin ortalama değerleri ve istatistiksel verileri

| Süre (saat) | Uygulanan Doz | mg/ml nişasta $\bar{x} \pm S.S$ | Alfa amilaz aktivitesi U/ml \bar{x} | Standart sapma | Standart Hata | P değeri |
|-------------|---------------|------------------------------------|---|----------------|---------------|---------------|
| 48 | Kontrol | 0,10 ± 0,002 | 1.498 | 38,38 | 27,14 | - |
| | 300ppm | 0,12 ± 0,007 | 1.323 | 34,00 | 24,04 | 0,218 |
| | 600ppm | 0,15 ± 0,031 | 995,9 | 77,59 | 54,87 | 0,003* |
| 72 | Kontrol | 0,10 ± 0,010 | 1.461 | 74,45 | 52,64 | - |
| | 300ppm | 0,11 ± 0,004 | 1.311 | 35,78 | 25,30 | ,365 |
| | 600ppm | 0,18 ± 0,031 | 934,81 | 100,74 | 71,23 | ,022* |

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

4.3.7. Katalaz aktivitesinin ölçülmesi

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerindeki 72.saat sonrasında oluşan Katalaz enziminin aktivitesi belirlendi (Şekil 4.21). Katalaz aktivitesinin belirlenmesi için yapılan deney 3 kere tekrar edildi ve örnekler arasındaki istatistiksel farklılık SPSS 18.0 programı kullanılarak analiz edildi (Tablo 4.16). İstatistiksel olarak her iki ppm uygulanan kumarin konsantrasyonları anlamlı olarak farklı bulundu.



Şekil 4.21. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerinde 72. saat sonrasında saptanan katalaz aktivitesi değerleri

72 saat sonunda örnekler arasında katalaz aktivitesinin farklılığı değerlendirildiğinde kontrol grubuna (5163,21 U/ml) göre 300 ppm kumarin uygulamasında (2998,15 U/ml) azaldığı 600 ppm kumarin uygulamasında (4878,28 U/ml) ise arttığı görüldü.

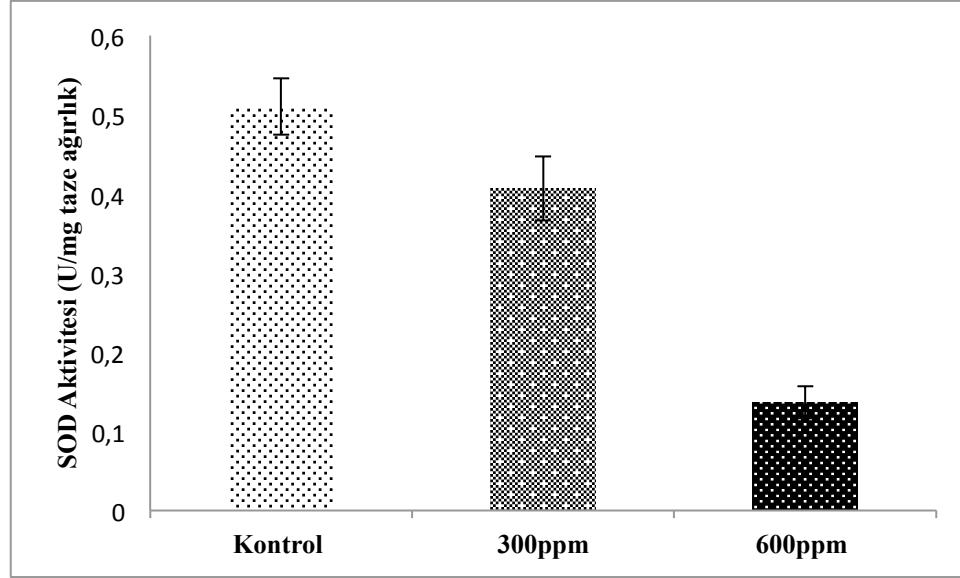
Tablo 4.16. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerinde 72. saat sonrasında saptanan katalaz aktivitesi ortalama değerleri ve istatistiksel verileri

| Süre(saat) | Uygulanan Doz | Katalaz Aktivitesi U/ml \bar{x} | Standart sapma | Standart Hata | P değeri |
|------------|---------------|--------------------------------------|----------------|---------------|---------------|
| | Kontrol | 5163,21 | 468,07 | 357 | - |
| 72 | 300ppm | 2998,15 | 282,34 | 199,6 | 0,013* |
| | 600ppm | 4878,28 | 296,27 | 209,4 | 0,038* |

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır

4.3.8. Süperoksit dismütaz (SOD; EC.1.15.1.1) aktivitesinin belirlenmesi

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerinde 72.saat sonrasında saptanan SOD aktivitesinin değerlerinin belirlenmesi için yapılan deney 3 kere tekrar edildi ve örnekler arasındaki istatistiksel farklılık SPSS 18.0 programı kullanılarak analiz edildi (Tablo 4.17 ve Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Kontrol grubu ve kumarin konsantrasyonu uygulanmış *L.culinaris* köklerindeki 72. saat sonrasında saptanan SOD aktivitesinin değerleri

72 saat sonunda örnekler arasında SOD aktivitesinin farklılığı değerlendirildiğinde kontrol grubuna (0,51 U/mg) göre 300 ppm kumarin uygulamasında (0,40 U/mg) azaldığı 600 ppm kumarin uygulamasında (0,13 U/mg) daha da azaldığı görüldü. İstatiksel olarak kumarin uygulanması anlamlı olarak farklı bulundu ve SOD aktivitesini inhibe ettiği tespit edildi.

Tablo 4.17. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerinde 72. saat sonrasında saptanan SOD aktivitesi ortalama değerleri ve istatistiksel verileri

| Süre(saat) | Uygulanan Doz | SOD Aktivitesi U/mg \bar{x} | Standart sapma | Standart Hata | P değeri |
|------------|---------------|-------------------------------------|----------------|---------------|--------------|
| | Kontrol | 0,51 | 0,03 | 0,03 | - |
| 72 | 300ppm | 0,40 | 0,04 | 0,02 | 0,05* |
| | 600ppm | 0,13 | 0,02 | 0,08 | 0,00* |

* Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

4.4. Moleküler Analizler

4.4.1. RAPD PZR analizleri

4.4.1.1. Genomik DNA ekstraksiyonu

Uygulama yapılmış ve yapılmamış çimlenmiş mercimek tohumlarının kök uçlarından yaklaşık 200-300 mg kök dokusu genomik DNA ekstraksiyonu için kullanıldı. Tablo 4.18’de uygulama grupları için Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer cihazı ile okunan değerler gösterilmektedir. İzolasyon sonucunda elde edilen örneklerin DNA kalitesini değerlendirmek için, 260/280 nm absorbans ve 260/230 nm absorbans oranları genel spektral kalite ile birlikte analiz edildi. Saf nükleik asitler için 260/280 nm spektral analiz için 1,8- 2,0 aralığındaki değerler DNA ve RNA için iyi bir saflaştırma olduğunu belirtir. 260/230 nm saflık oranı 1,8- 2,2 aralığındaki organik madde içeriği açısından saf nükleik asit değerlerini belirtirken DNA saflık değerlendirmesinin ikinci bir ölçütüdür (Thermo Fisher Scientific, 2017).

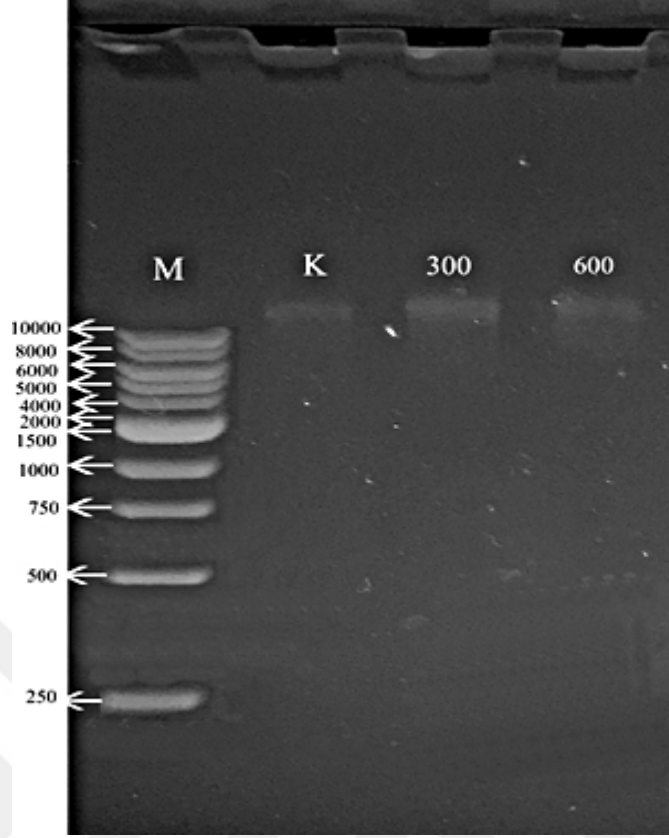
Elde edilen bulgulara göre, kumarin uygulaması yapılmış ve uygulama yapılmamış tohumların 300 mg kök dokusundan ortalama olarak 20 µg/ml genomik DNA elde edildi.

Hesaplarımıza göre, 300 mg kök dokusundan yaklaşık 30 adet PZR reaksiyonunda kullanılabilir kadar genomik DNA izole edildi. İzolasyon çalışmalarının birden fazla yapıldığı göz önünde bulundurulduğunda yeteri kadar DNA elde edildi. Elde edilen genomik DNA’ların saflığı (A260/A280) sırasıyla 1,81, 1,93 ve 1,8 olarak belirlendi (Tablo 4.18). Ayrıca organik madde kontaminasyonun bir ölçüsü olan A260/A230 oranlarının değerleri DNA’nın saflık açısından iyi olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.18. İzole edilen gDNA örneklerinin konsantrasyon değerleri ve saflık miktarları

| Uygulama | Konsantrasyon (ppm) | A ₂₆₀ (nm) | A ₂₈₀ (nm) | A _{260/A280} (nm) | A _{260/A230} (nm) | DNA ng/ml |
|----------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|-----------|
| Kontrol | 0 | 0,326 | 0,18 | 1,81 | 2,27 | 16,3 |
| Kumarin | 300 | 0,271 | 0,141 | 1,93 | 2,23 | 13,6 |
| Kumarin | 600 | 0,545 | 0,303 | 1,8 | 2,67 | 27,2 |

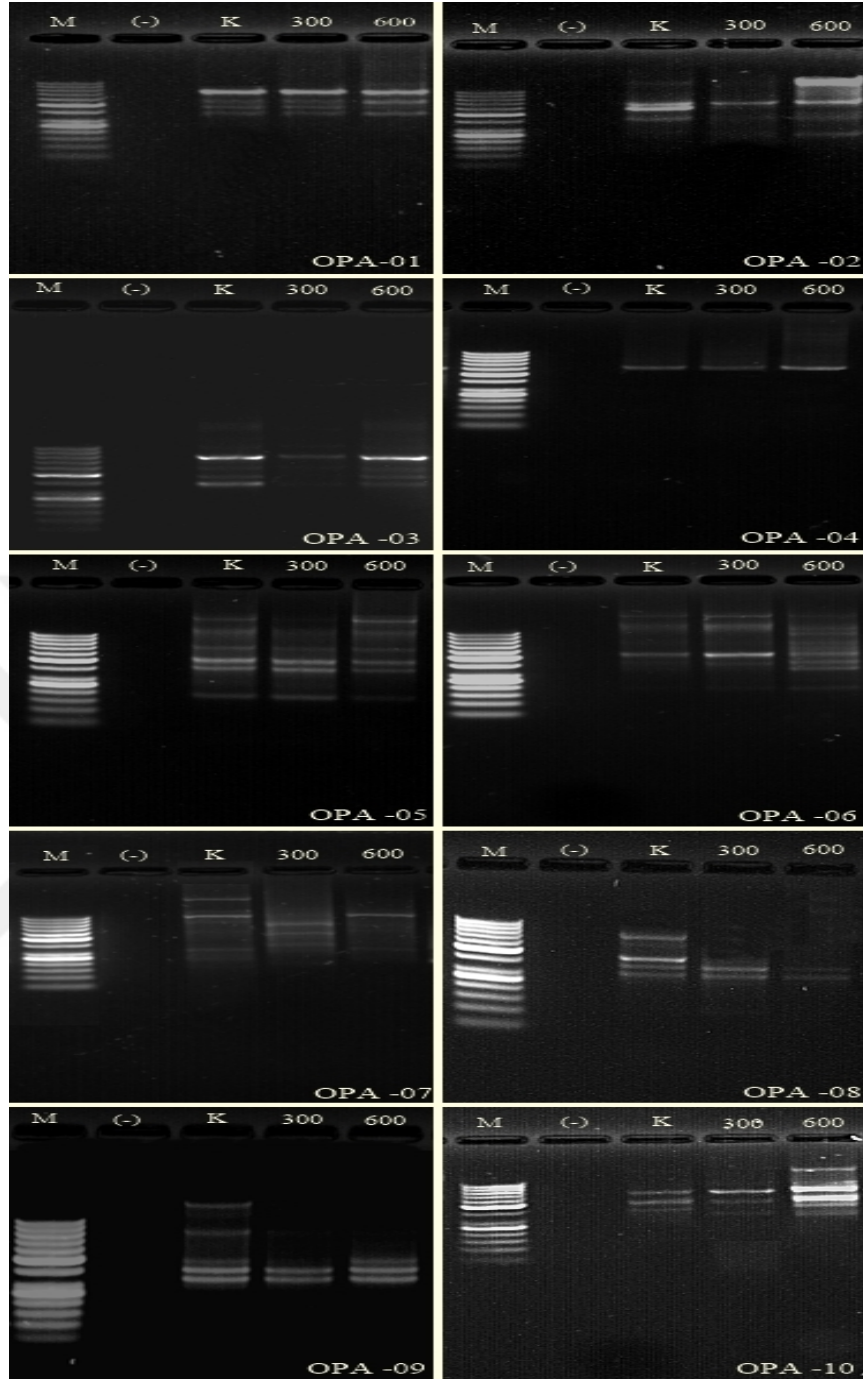
Hesaplanan genomik DNA miktarlarından yola çıkılarak, her bir çalışma örneği için genomik DNA'lar, %1'lik agaroz elektroforezde yürütüldü (Şekil 4.23). Elde edilen bulgulara göre, genomik DNA solüsyonlarının RNA'dan arındırılmış, oldukça saf olduğu belirlendi. Genomik DNA'lar 20 ng/μl konsantrasyon olacak şekilde PZR reaksiyonu kurulumunda kullanıldı. PZR öncesi stok ve çalışma genomik DNA'ları -20 °C'de derin dondurucuda saklandı. Nanodrop verileri ve agaroz jel görüntüleri değerlendirilerek, kontrol grubu ve kumarin uygulaması yapılan gruplara ait DNA'ların, RAPD-PZR deneyleri için yeterli miktarda ve saflıkta olduğuna karar verildi.



Şekil 4.23. İzole edilen gDNA örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü (M: Marker 1 kb DNA standartı, K: Kontrol(Hoagland), 300: EC50 değeri (300 ppm), 600: 2x EC50 değeri (600 ppm)

4.4.1.2. RAPD profilleri

RAPD analizi için 10 adet 10 bazlık rastgele primerler, *L.culinaris* bitkisi ile yapılan diğer RAPD çalışmalarında en çok kullanılan ve sonuç alınan primerler arasından belirlendi. Bu primerlerden elde edilen çoğaltım ürünleri değerlendirmeye alındı ve güvenilir PZR ürünleri verdiği tespit edildi. Elde edilen çoğaltım ürünleri %2 oranındaki agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Sonuçlar UVP-GelDocit jel görüntüleme cihazında incelenerek fotoğrafları çekildi. RAPD sonuçlarının analizi ve sonuçların değerlendirilmesi çekilen fotoğraflar üzerinden yapıldı. 10 primer kullanılarak uygulama yapılmış ve yapılmamış tohumların köklerinden elde edilen genomik DNA'lardan elde edilen RAPD profillerine ait jel görüntüleri Şekil 4.24'de verildi. Her bir agaroz jelin birinci hattında RAPD profillerine ait DNA bantlarının moleküler ağırlığını belirlemek için 50 bp DNA ladder markörü yürütüldü.



Şekil 4.24. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* genomik DNA'larından OPA01, OPA02, OPA03, OPA04, OPA05, OPA06, OPA07, OPA08, OPA09, OPA10 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri. [M: GeneRuler 50bp Thermo Fischer, K: kontrol (Hoagland), 300: 300 ppm (EC50) kumarin, 600: 600 ppm (2×EC50) kumarin

Tablo 4.19. Her bir uygulama örneği için 10 primerle belirlenen DNA bantların moleküler ağırlıkları ve kontrole (K) göre, 300: 300 ppm (EC50) kumarin, 600: 600 ppm (2×EC50) kumarin uygulamalarında mevcut “1” ve kayıp “0” bantlar

| Primer | Moleküler ağırlık | 300 ppm kumarin | 600 ppm kumarin |
|---------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| OPA 01 | 773 | 1 | 1 |
| | 564 | 1 | 1 |
| | 484 | 1 | 0 |
| | 400 | 1 | 1 |
| OPA 02 | 669 | 1 | 0 |
| | 589 | 0 | 1 |
| | 447 | 0 | 0 |
| OPA 03 | 832 | 1 | 1 |
| | 611 | 0 | 1 |
| | 474 | 0 | 1 |
| | 406 | 0 | 1 |
| OPA 04 | 635 | 1 | 1 |
| OPA 05 | 1524 | 0 | 1 |
| | 1134 | 0 | 1 |
| | 700 | 1 | 1 |
| | 500 | 1 | 1 |
| | 408 | 1 | 1 |
| | 170 | 1 | 0 |
| OPA 06 | 1754 | 1 | 1 |
| | 119 | 1 | 1 |
| | 552 | 1 | 1 |
| OPA 07 | 1785 | 0 | 0 |
| | 1111 | 0 | 1 |
| | 317 | 0 | 1 |
| OPA 08 | 673 | 0 | 0 |
| | 400 | 0 | 0 |
| | 330 | 1 | 1 |
| | 264 | 1 | 1 |
| OPA 09 | 1324 | 0 | 0 |
| | 848 | 0 | 0 |
| | 489 | 0 | 1 |
| | 416 | 1 | 1 |
| | 346 | 1 | 1 |
| OPA 10 | 848 | 1 | 1 |
| | 600 | 1 | 1 |
| | 457 | 0 | 1 |

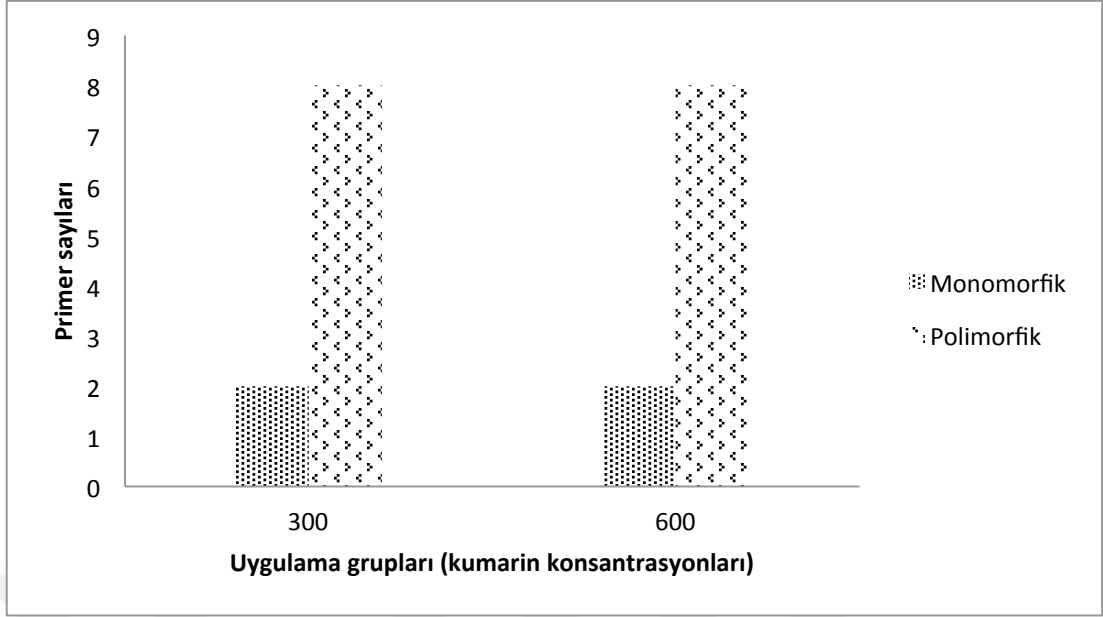
Bu 10 primerin kullanımıyla her bir uygulama grubunda elde edilen DNA bantlarının varlığı “1” ve yokluğu “0” Tablo 4.19’da matris tablosu olarak ayrıntılı bir şekilde verildi. Çoğaltım sonucunda oluşan bantların okunmasında sadece kuvvetli bantlar değerlendirmeye alındı.

Uygulama gruplarına ait DNA’lar ile yapılan PZR analizleri sonucunda kontrol grubuna göre polimorfik ve monomorfik görülen 10 adet primerin uygulama grupları arasındaki dağılımları da incelendi. Analizler sonucunda kontrole grubuna göre 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulaması için 2 adet monomorfik ve 8 adet polimorfik, bant profili gösteren primer olduğu gözlemlendi. 300 ppm kumarin uygulamaları sonucunda OPA 01,OPA 04 monomorfik diğer bantlar ise polimorfik bant gösterdi. 600 ppm kumarin uygulaması sonucunda OPA 03, OPA 04 monomorfik diğer bantlar ise polimorfik olarak gözlemlendi. Bu primerler ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin hepsi agaroz jel elektroforezi sonucunda aynı bant profili gösterdi (Tablo 4.20 ve Şekil 4.25). Polimorfik bantlar kontrol grubuna göre bant varlığı ya da yokluğuna göre değerlendirildi.

Tablo 4.20. Uygulama gruplarına göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren RAPD primerlerinin listesi. 300;300 ppm (EC50) kumarin, 600:600 ppm (2×EC50) kumarin

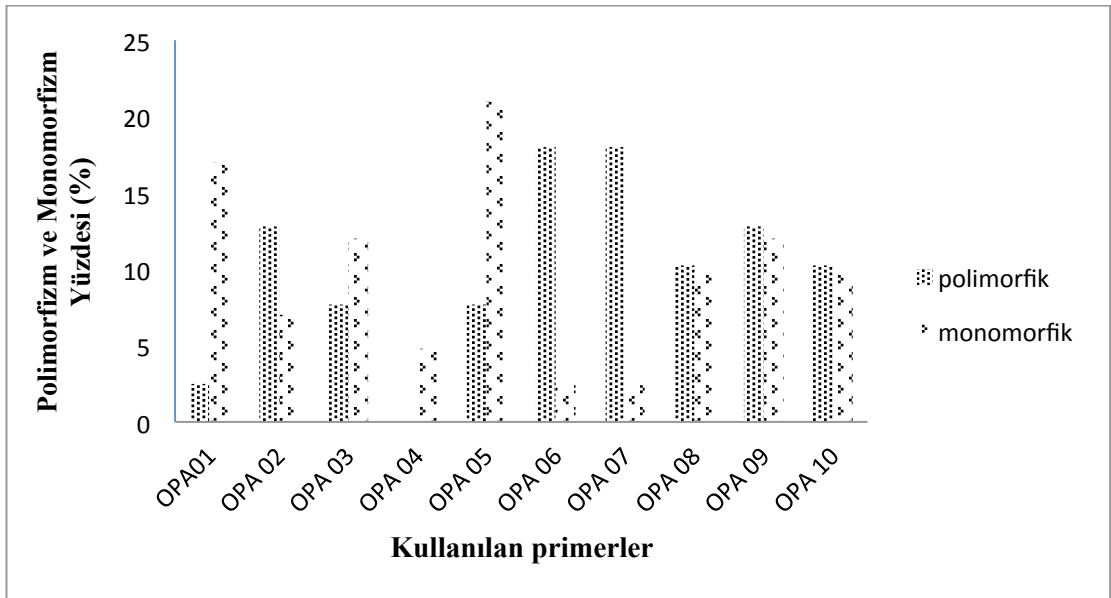
| Uygulama Grupları (Kumarin ppm) | Monomorfik Bant Yapısı Gösterenler | Polimorfik Bant Yapısı Gösterenler |
|--|---|--|
| 300 | OPA 01,OPA 04 | OPA 02,OPA 03,OPA 05, OPA 06,OPA 07,OPA 08,OPA 09,OPA 10 |
| 600 | OPA 03,OPA 04 | OPA 01,OPA 02,OPA 05, OPA 06,OPA 07,OPA 08,OPA 09,OPA 10 |

Tüm primerler ile elde edilen agaroz jel görüntüleri incelendiğinde 3 farklı uygulama grubu için belirlenen toplam monomorfik ve polimorfik primerler Şekil 4.25’de gösterildi.



Şekil 4.25. Çalışmada kullanılan primerlerle uygulama gruplarına ait elde edilen monomorfik ve polimorfik primer sayıları. 300;300 ppm(EC50) kumarin, 600:600 ppm(2×EC50) kumarin

Çalışmamızda yapılan analizler sonucunda değerlendirmeye alınan 10 RAPD primerinin her birinin ayrı ayrı polimorfizm yüzdeleri belirlendi. Bu verilere göre; en fazla polimorfik bant veren primerlerin OPA06 ve OPA07 olduğu belirlendi. OPA04 primerinin uygulama grupları için polimorfizm oranının 0 olduğu gözlemlendi (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Kullanılan RAPD primerlerinin polimorfizm yüzdeleri

Çalışılan 10 primer ile toplamda 97 DNA bandı çoğaltıldı ve bu bantların ağırlıkları 170 bp (OPA05) ve 1785 bp (OPA07) baz çifti (bç) aralığında değişti. Tüm uygulamalarda elde edilmiş DNA bandı toplam sayısı 97 olarak tespit edildi. Her bir primer 3 (OPA04) ile 16 (OPA05) arasında DNA bandı üretti. Toplamda elde edilen 97 DNA bandınının 41 tanesi monomorfik bant, geriye kalan 39 tanesi ise polimorfik DNA bandıdır. Tüm uygulama grupları için belirlenen polimorfizm ve monomorfizm yüzdeleri sırasıyla %48,75 ve %51,25 olarak belirlendi (Tablo 4.21).

Tablo 4.21. RAPD çalışmalarında kullanılan primerler, primer sekansları, her bir primerle elde edilmiş DNA moleküler ağırlıkları, toplam çoğaltılmış bant sayıları, monomorfik ve polimorfik DNA bant sayıları

| Primer adı | Primer sekansı 5'→3' | En büyük DNA bandı | En küçük DNA bandı | Toplam çoğaltılmış bant | Polimorfik DNA sayısı | Monomorfik DNA sayısı |
|--------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| OPA 01 | CAGGCCCTTC | 748 | 372 | 11 | 1 | 7 |
| OPA 02 | TGCCGAGCTG | 1484 | 250 | 8 | 5 | 3 |
| OPA 03 | AGTCAGCCAC | 832 | 392 | 9 | 3 | 5 |
| OPA 04 | AATCGGGCTG | 635 | 635 | 3 | - | 2 |
| OPA 05 | AGGGGTCTTG | 1524 | 170 | 16 | 3 | 9 |
| OPA 06 | GGTCCCTGAC | 1754 | 187 | 14 | 7 | 1 |
| OPA 07 | GAAACGGGTG | 1785 | 317 | 8 | 7 | 1 |
| OPA 08 | GTGACGTAGG | 673 | 254 | 8 | 4 | 4 |
| OPA 09 | GGGTAACGCC | 1324 | 346 | 10 | 5 | 5 |
| OPA 10 | GTGATCGCAG | 1400 | 400 | 11 | 4 | 4 |
| Toplam | | | | 97 | 39 | 41 |
| Polimorfizm | | | | %48,7 | | |
| Monomorfizm | | | | %51,2 | | |

RAPD profilleri, uygulama yapılmamış kontrol ve uygulama yapılmış (EC50 ve 2×EC50) *L.culinaris* kökleri arasında çoğaltılmış DNA bantlarının sayı ve büyüklüklerinde belirgin farklılıklar (normal bir bandın kaybolması ve/veya yeni bir bandın oluşması) gösterdi. Uygulama yapılmış *L.culinaris* köklerinin RAPD profillerinde belirlenen bu değişiklikler tüm ayrıntılarıyla birlikte Tablo 4.22'de verildi. Yeni DNA bantlarının moleküler boyutları 187 (primer OPA03) ile 1484 (primer OPA02) baz çifti aralığında değişti. Yeni bantların %85'i 1000 baz çiftinden küçüktür. Kontrol RAPD profilleri ile karşılaştırıldığında, test edilen tüm 10 primer kumarin uygulamasında 4 - 10 yeni RAPD bandı çoğaldı. OPA01, OPA04, OPA05, OPA08 ve OPA09 primerlerinde yeni bir DNA bandı belirlenmedi (Tablo 4.22). Özellikle OPA06 primerinde 600 ppm kumarin uygulamasında yeni oluşan bant sayısı arttı. Kumarin uygulamaları için OPA03, OPA06, OPA10 primerleri ile çoğalmış olan yeni bantların sayısı 300 ppm konsantrasyonuna göre 600 ppm kumarin uygulamalarında yüksek bulundu. Uygulama grupları arasında en fazla yeni DNA bandı 600 ppm (2×EC50) uygulamasında belirlendi. Yeni DNA bantlarının toplam sayısının kumarin konsantrasyonlarındaki artış ile belirgin bir şekilde arttığı gözlemlendi. Kontrol RAPD profillerinde mevcut olduğu halde uygulama gruplarında kaybolmuş bantların moleküler büyüklükleri 170 (OPA05) ve 1785 (OPA07) baz çifti aralığında belirlendi. Kaybolmuş bantların büyük bir kısmı (%80) 1000 baz çiftinden daha küçüktür. Kontrole göre 300ppm kumarin uygulamasında OPA02, OPA03, OPA05, OPA07, OPA09, OPA10 primerlerinde 600 ppm kumarin uygulamasına göre kaybolan bant sayısı fazladır. Uygulama grupları arasında en fazla RAPD bandı kaybı (16bant) 300 ppm (EC50) kumarin uygulamasında belirlendi. Yeni bant oluşumları en fazla (10 bant) 600 ppm (2×EC50) kumarin uygulamasında belirlendi. Özetle, toplamda en fazla RAPD bandı değişikliği EC50 (21 bant) uygulamasında belirlendi (Tablo 4.22).

Tablo 4.22. RAPD primerlerinin çoğaltılması sonucu kontrolde elde edilen toplam bant sayıları ve polimorfik bant veren primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantlarının moleküler büyüklüğü

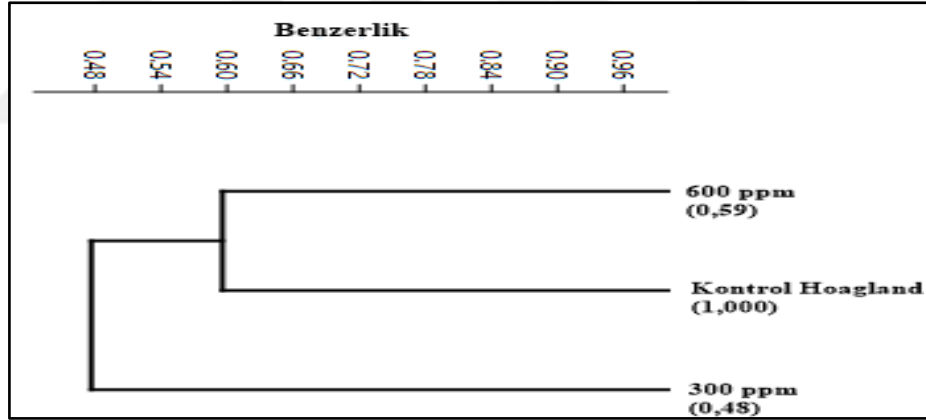
| Primer | Kontrol | | 300ppm | 600ppm |
|-------------------|---------|---|---------------|--------------------------|
| | | | | |
| OPA 01 | 4 | + | 0 | 0 |
| | | - | 0 | 484 |
| OPA 02 | 4 | + | 0 | 1484;250 |
| | | - | 589;447 | 589 |
| OPA 03 | 5 | + | 0 | 0 |
| | | - | 611;474;406 | 0 |
| OPA 04 | 1 | + | 0 | 0 |
| | | - | 0 | 0 |
| OPA 05 | 6 | + | 0 | 0 |
| | | - | 1524;1134 | 170 |
| OPA 06 | 3 | + | 447 | 1035;786;669;447;382;187 |
| | | - | 0 | 0 |
| OPA 07 | 4 | + | 873;658;430 | 0 |
| | | - | 1785;1111;317 | 1785 |
| OPA 08 | 4 | + | 0 | 0 |
| | | - | 673;400 | 673;400 |
| OPA 09 | 5 | + | 0 | 0 |
| | | - | 1324;848;489 | 1324;848 |
| OPA 10 | 3 | + | 418 | 1400;418 |
| | | - | 457 | 0 |
| Toplam | 39 | | 16(-) 5(+) | 7(-) 10(+) |
| Gen.Toplam | | | 21 | 17 |

Tüm uygulama grupları arasındaki genetik benzerlik katsayıları PAST programı kullanılarak hesaplandı. Gruplar arasındaki genetik benzerlik katsayıları Tablo 4.23'de verildi. Kontrol grubuna göre 300 ppm kumarin uygulaması genetik olarak 0,48 yakınlık gösterirken $2 \times EC_{50}$ değeri olan 600 ppm de 0,59 yakınlık bulundu. Kumarin konsantrasyonu artışı kontrol grubuna göre genetik mesafede artış gösterdi. 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulamaları genetik benzerlik farkları 0,47 bulundu (Tablo 4.23).

Tablo 4.23. RAPD bulgularına göre 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulamaları sonucunda PAST programında hesaplanmış olan (Nei, 1978) genetik benzerlik katsayıları

| Uygulamalar | Kontrol | 300 ppm | 600 ppm |
|----------------|---------|---------|---------|
| Kontrol | 1 | | |
| 300 ppm | 0,48 | 1 | |
| 600 ppm | 0,59 | 0,47 | 1 |

Past analizi sonucunda Nei (1972)'ye göre hesaplanan, UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) metoduna göre çizilen dendrogram Şekil 4.27'de verildi. Dendrogramda uygulama yapılmış ve yapılmamış kökler iki ana küme oluşturdu. 300 ppm kumarin uygulanması ve kontrol grubu aynı dallanmada yer alırken 600 ppm kumarin uygulaması ayrı dallanma gösterdi. Uygulama gruplarının kontrole göre genetik benzerliklerini gösteren değerler aynı zamanda Tablo 4.23'de gösterildi.



Şekil 4.27. 300 ppm ve 600 ppm uygulamalarının *L.culinaris* kökleri üzerinde oluşturduğu genetik polimorfizmi gösteren dendrogram (parantez içerisindeki rakamlar kontrole göre her bir uygulama grubu için hesaplanan genetik benzerlik katsayılarını göstermektedir)

RAPD profillerinde belirlenen değişikliklerin nitel bir ölçüsünü gösteren genomik kalıp DNA kararlılığı (GKK,%) değerleri test edilen 8 primer için hesaplanarak Tablo 4.24'da verildi. GKK değerlerindeki azalma 600 ppm kumarin uygulamasında %45,8 iken 300 ppm kumarin uygulamasında %48,5 olarak belirlendi. Genomik kalıp stabilitesi; DNA hasarının düzeyi, DNA tamiri ve replikasyonunun verimliliği ile ilgilidir. Bu nedenle, çok yüksek düzeyde DNA hasarı düşük düzeyde DNA değişimleriyle karşılaştırıldığında zorunlu olarak genomik kararlılığı azaltmaz, çünkü

DNA tamiri ve replikasyonu DNA hasarının yüksek sıklığıyla baskılanır (Atienzar ve Jha, 2006). Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verilere göre; kumarin grupları ile muamele sonrası ortalama genomik kalıp stabilitesinde bir düşüş gözlemlendi.

Tablo 4.24. 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulanmış *L. culinaris* tohumlarında 8 RAPD primeri için hesaplanmış genomik kalıp kararlılık değerleri (GKK, %)

| Primerler | Kontrol (%) | 300 ppm | 600 ppm |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| OPA 01 | 100 | 100 | 75 |
| OPA 02 | 100 | 33 | 0 |
| OPA 05 | 100 | 66 | 83 |
| OPA 06 | 100 | 66 | 0 |
| OPA 07 | 100 | 0 | 66 |
| OPA 08 | 100 | 50 | 50 |
| OPA 09 | 100 | 40 | 60 |
| OPA 10 | 100 | 33 | 33 |
| Ortalama | | 48,5 | 45,8 |

4.4.2. Real Time PZR

4.4.2.1. RNA ekstraksiyonu

Kontrol grubu ve kumarin stresine tabi tutulmuş örneklerden elde edilen RNA lar cDNA sentezi için kullanıldı. Gerekli RNA miktarını belirlemek üzere saflık ve miktarları Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazı ile ölçüldü. Saflaştırma sonrasında 260/280 nm absorbans oranının 1,9 – 2,1 aralığında 260/230 nm absorbans oranının ise 2,0 – 2,5 arasında olması RNA saflığının iyi olduğunun göstergesidir. RNA izolasyonu 3 tekrar şeklinde çalışıldı. En yüksek miktarda ve en kaliteli örneklerle çalışılmaya devam edildi. Tablo 4.25’de en iyi çıkan ve cDNA sentezinde kullanılan örneklerin miktarları verildi. Bu verilere göre en kaliteli çıkan sonuçlar olan kontrol grubu için 1029,5ng/ml, 300 ppm kumarin için 924,2 ng/ml ve 600 ppm için 704,4 ng/ml RNA miktarları ile cDNA sentezi çalışmaları yapıldı.

Tablo 4.25. İzolasyonu yapılan RNA 'lara ait saflık ve miktar tayinler

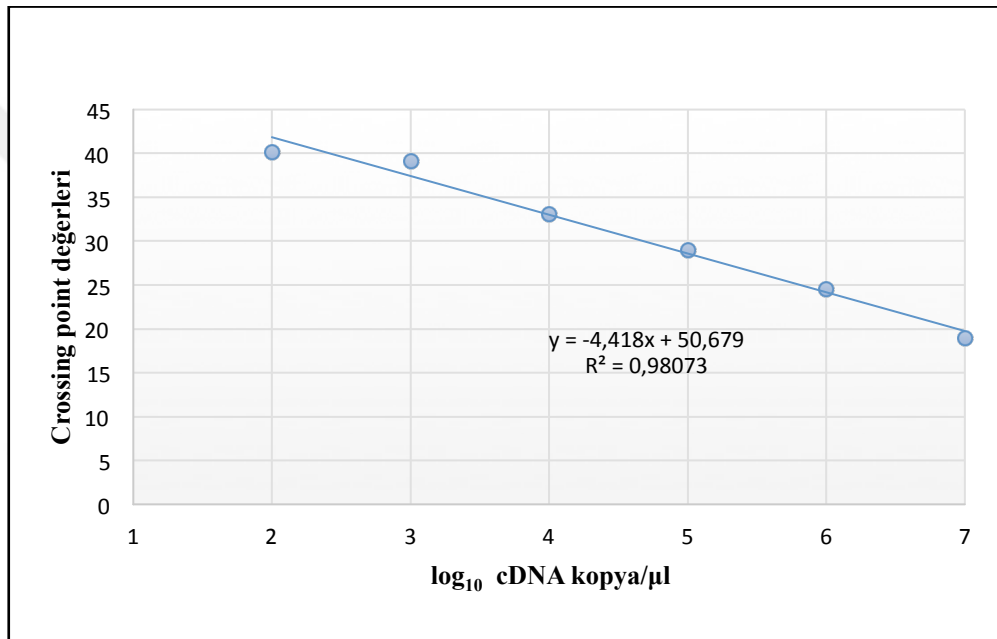
| Uygulama | Konsantrasyon (ppm) | A ₂₆₀ (nm) | A ₂₈₀ (nm) | A _{260/A280} (nm) | A _{260/A230} (nm) | RNA ng/ml |
|-----------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|-----------|
| | | 25,587 | 12,099 | 2,11 | 2,26 | 1023,5 |
| Hoagland | 0 | 9,928 | 4,679 | 2,12 | 1,3 | 397,1 |
| | | 5,325 | 2,487 | 2,14 | 1,05 | 213 |
| Kumarin | 300 | 23,105 | 11,042 | 2,09 | 2,26 | 924,2 |
| | | 19,717 | 9,359 | 2,11 | 2,26 | 788,7 |
| | | 13,808 | 6,649 | 2,08 | 1,87 | 552,3 |
| Kumarin | 600 | 17,61 | 8,367 | 2,1 | 1,99 | 704,4 |
| | | 15,234 | 7,221 | 2,11 | 1,96 | 609,4 |
| | | 15,844 | 7,464 | 2,12 | 1,83 | 633,8 |

4.4.2.2. RT PZR için standart grafiğinin çizilmesi

Cihazın doğru ölçüm yapıp yapmadığının kontrolü için housekeeping genlerinden olan GAPDH (gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz) ile standart grafiği oluşturuldu. Bunun için materyal bölümünde anlatıldığı gibi dilüsyonlar oluşturuldu. Dilüsyonlardan elde edilen Cq değerleri ve seyreltme oranları standart eğri grafiğinin oluşturulmasında kullanıldı. Doğru ve uygun bir standart eğri grafiği oluşturabilmek için oluşturulan grafiğin en az üç cDNA dilüsyonu ile çakışması gerektiği materyal malzeme bölümünde belirtildi. Bu tez kapsamında GAPDH geni standart eğrisini oluşturabilmek amacıyla 6 logaritmik konsantrasyon kullanıldı (Tablo 4.26). Şekil 4.28'de görüldüğü gibi GAPDH standart eğri grafiği kullanılabilir nitelikte bir standart eğri grafiğidir.

Tablo 4.26. Real-Time PZR testinde standart eğri grafiği oluşturmak için kullanılan cDNA sulandırma oranları ve reaksiyon sonucunda elde edilen Cq değerleri

| cDNA sulandırma oranları(μ l) | Cq Değerleri |
|------------------------------------|--------------|
| 10^{-7} | 40,18 |
| 10^{-6} | 39,12 |
| 10^{-5} | 33,13 |
| 10^{-4} | 28,99 |
| 10^{-3} | 24,49 |
| 10^{-2} | 18,86 |



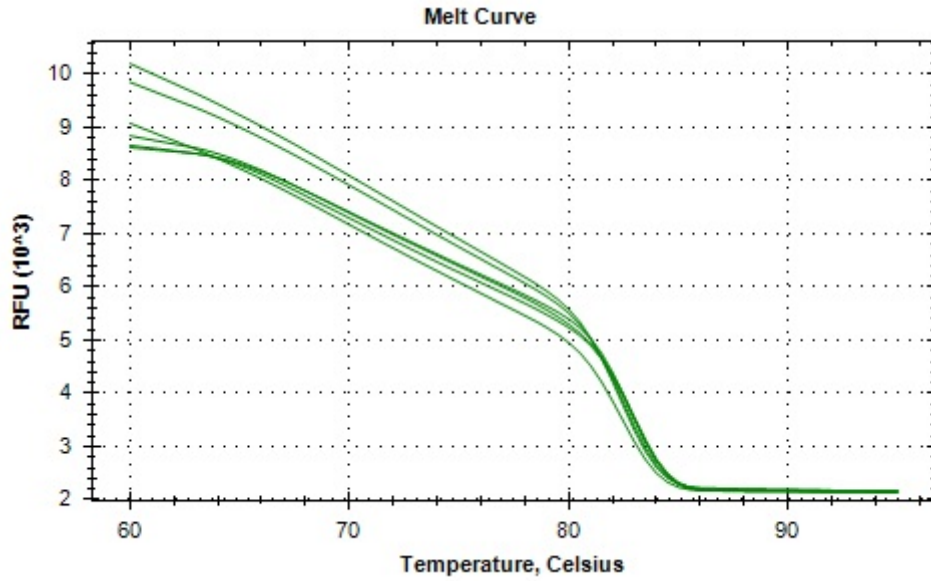
Şekil 4.28. Real Time PZR tekniğinin standart eğrisi

Hedef genler olan CAT (katalaz), Cu/Zn SOD (Bakır/çinko süperoksit dismutaz) ve Mn SOD (mangan süperoksit dismutaz) genlerinin ifadesine ait sonuçlar ve housekeeping gen olarak seçilen GAPDH genine ait veriler REST programına göre hesaplandı (Denklem 4.1). Elde edilen Cq verilerinin standart hata, standart sapmaları ve ortalama değerleri One Way ANOVA metodu kullanılarak tespit edildi. Örneklerin gen ifade düzeyi REST programı ile hesaplandı. Tüm örneklerin, kullanılan housekeeping genin ekspresyon düzeyine göre CAT, Cu/Zn SOD ve Mn SOD genlerine ait elde edilmiş Cq verilerinin ortalaması alınarak, elde edilen veriler ile CAT, Cu/Zn SOD ve Mn SOD genlerini ifade düzeyini gösteren grafikler çizildi.

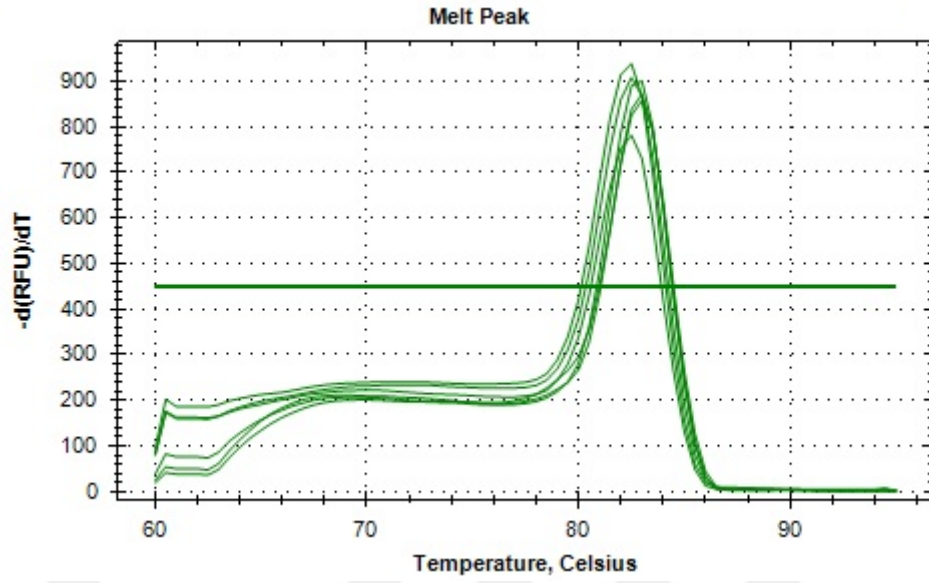
$$R = \frac{(E_{Hedef\ gen})^{\Delta Cq_{Hedef(Kontrol-Örnek)}}}{(E_{Referans\ gen})^{\Delta Cq_{Referans(Kontrol-Örnek)}}} \quad (4.1)$$

4.4.2.3. CAT geninin ifade düzeyi

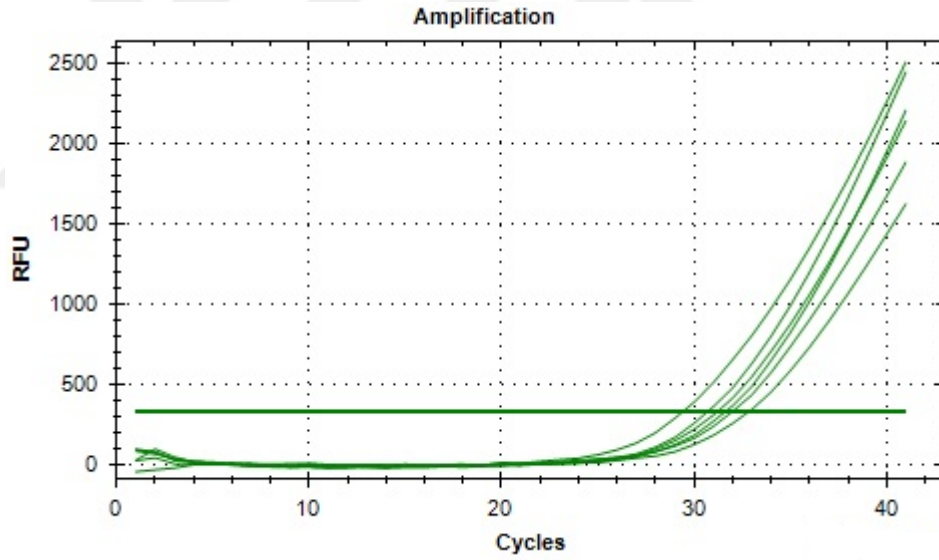
Kontrol olarak Hoagland çözeltilisinde, EC50 değeri olarak 300 ppm kumarin ve 2xEC50 olarak 600 ppm kumarin çözeltilisinde 72 saat süre ile çimlendirilen *L.culinaris* bitkisinin köklerinden alınan örneklerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Analizler kontrol GAPDH, kontrol CAT, 300 ppm GAPDH, 300 ppm CAT ve 600 ppm GAPDH ,600 ppm CAT olacak şekilde PZR reaksiyonu üçer tekrarlı olarak Real Time PZR cihazında yapıldı. Florasan ışık temeline göre reaksiyon takip edildi ve Cq değerleri belirlendi. Kontrol grubu ve kumarin stresi altında çimlendirilmiş bitkilere ait CAT RT-PZR reaksiyonu profilleri aşağıda verildi (Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31).



Şekil 4.29. Kontrol GAPDH, kontrol CAT, 300 ppm GAPDH, 300 ppm CAT, 600 ppm GAPDH, 600 ppm CAT örneklerine ait melt curve grafiği



Şekil 4.30. Kontrol GAPDH, kontrol CAT, 300 ppm GAPDH, 300 ppm CAT, 600 ppm GAPDH, 600 ppm CAT örneklerine ait melt peak grafiği



Şekil 4.31. Kontrol GAPDH, kontrol CAT, 300 ppm GAPDH, 300 ppm CAT, 600 ppm GAPDH, 600 ppm CAT örneklerine ait amplifikasyon grafiği

Uygun miktar ve kalitede cDNA sentezini takiben çalışmada taraması yapılacak hedef gen olan CAT ve housekeeping olarak seçilmiş GAPDH genlerinin reaksiyon optimizasyonları ve ön denemeleri yapıldıktan sonra SYBR Green I master boyası kullanılarak Bio RAD CFX Connect™ Real-Time PZR cihazı ile Real-Time PZR uygulamaları gerçekleştirildi. PZR'ın etkinliğini saptamak ve herhangi bir dimer

oluşumu olup olmadığını gözlemek amacıyla erime eğrisi analizi grafikleri oluşturuldu. (Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31).

CAT ve GAPDH genine ait Real-Time PZR cihazından alınan tüm Cq değerleri Tablo 4.27’de verildi.

Tablo 4.27. CAT ve GAPDH genine ait Real-Time PZR cihazından alınan tüm Cq değerleri (Çalışma 3 biyolojik tekrar içerdiği için her bir örnek için 3 adet Cq değeri bulunmaktadır)

| Süre(saat) | Uygulanan Doz | GAPDH Cq değerleri | CAT Cq değerleri |
|------------|---------------|--------------------|------------------|
| 72 | Kontrol | 38,09 | 30,65 |
| | | 35,65 | 31,44 |
| | | 36,17 | 32,27 |
| 72 | 300ppm | 35,22 | 35,31 |
| | | 35,50 | 36,57 |
| | | 38,64 | 37,63 |
| 72 | 600ppm | 35,73 | 35,45 |
| | | 38,57 | 35,72 |
| | | 36,24 | 36,21 |

Uygulamalar sonucunda elde edilen Cq değerleri ortalamaları, standart hataları, standart sapmaları ve kontrol grubuna göre anlamlı olup olmadığı Tablo 4.28’de gösterildi. Bu verilere göre kontrol grubuna göre 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulamalarının ortalama Cq değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı bulundu.

Tablo 4.28. CAT ve GAPDH genine ait Real-Time PZR cihazından alınan tüm Cq değerlerinin ortalamaları, standart sapma, standart hata ve kontrole göre olan istatistiksel analiz sonuçları

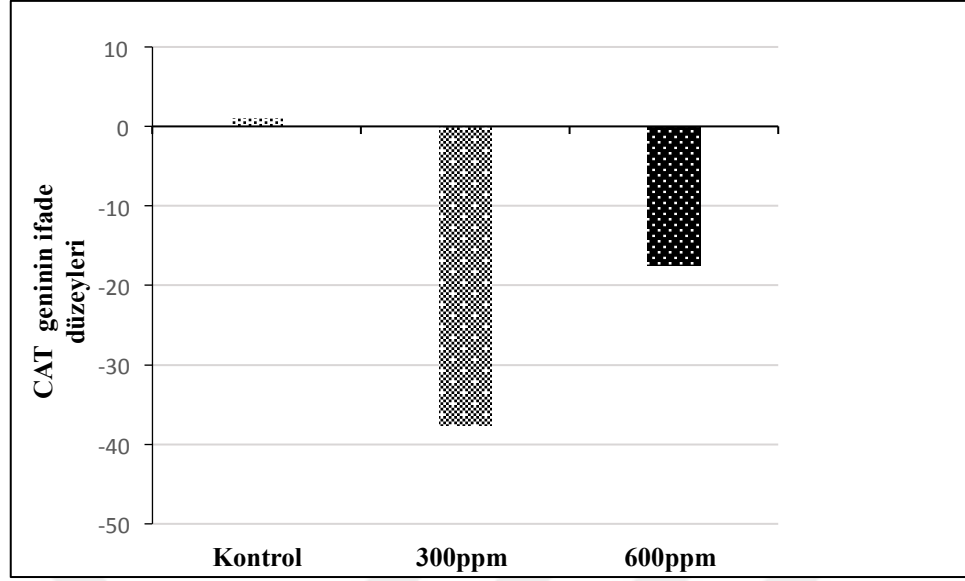
| Süre(saat) | Uygulanan Doz | Cq değerleri \bar{x} | Standart sapma | Standart Hata | P değeri |
|------------|------------------|---------------------------|----------------|---------------|---------------|
| 72 | Kontrol GAPDH | 36,63 | 1,04 | 1,98 | - |
| | Kontrol CAT | 31,45 | 0,66 | 0,46 | - |
| 72 | 300ppm GAPDH | 36,45 | 1,55 | 1,09 | 0,65 |
| | 300ppm CAT | 36,50 | 0,94 | 1,16 | 0,003* |
| 72 | 600ppm GAPDH | 36,84 | 1,23 | 0,87 | 0,79 |
| | 600ppm CAT | 35,79 | 0,31 | 0,22 | 0,001* |

* Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Kontrole göre gen ifade düzeyleri hesaplanırken kontrol grubunun ekspresyon seviyesi 1 olarak alındı. Diğer örneklerin gen ekspresyon seviyeleri 1'e göre kıyaslandı. Eksi işareti ile verilen veriler genin ifadesinin azaldığını ve pozitif olarak verilenler ise genin ifadesinin çoğaldığını belirtmektedir. REST programı ile elde edilen CAT geninin ifade düzeyi verileri Tablo 4.29 ve Şekil 4.32'de verildi. Kontrole göre CAT geninin ifade düzeyi 300 ppm kumarin uygulanmasında -37,635 kat azalırken, 600 ppm kumarin uygulanmasında ise -17,509 kat azaldı.

Tablo 4.29. REST programı ile elde edilen CAT geninin ifade düzeyi

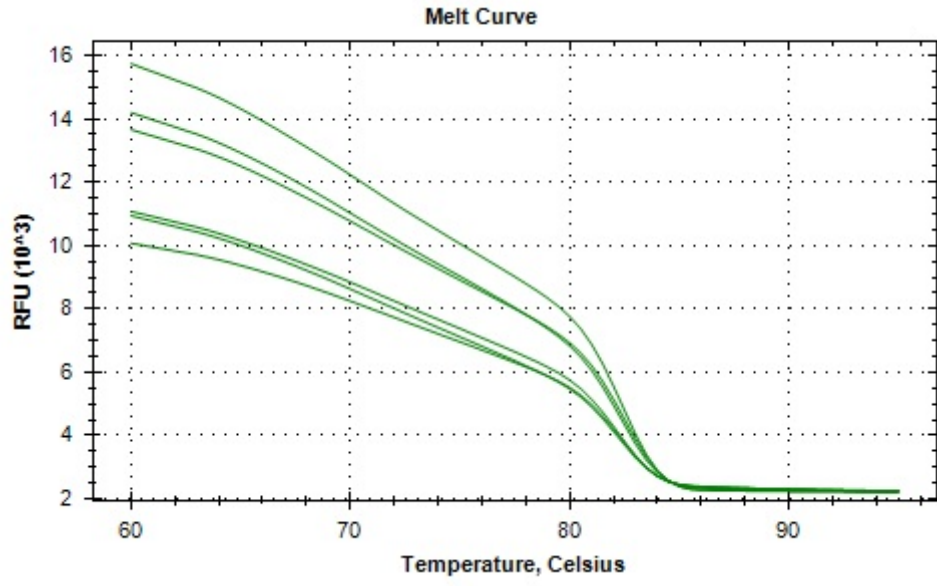
| Süre(saat) | Uygulanan Doz | CAT geninin ifade düzeyi |
|------------|-----------------|--------------------------|
| 72 | Kontrol | 1 |
| | 300 ppm kumarin | -37,635 |
| | 600 ppm kumarin | -17,509 |



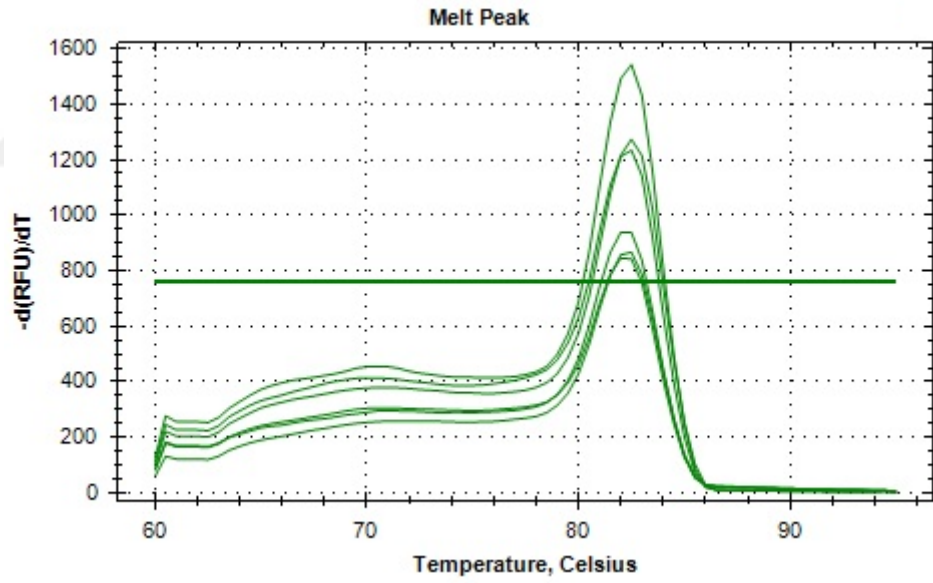
Şekil 4.32. REST programı ile elde edilen CAT geninin ifade düzeyinin grafiksel gösterimi

4.4.2.4. Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyi

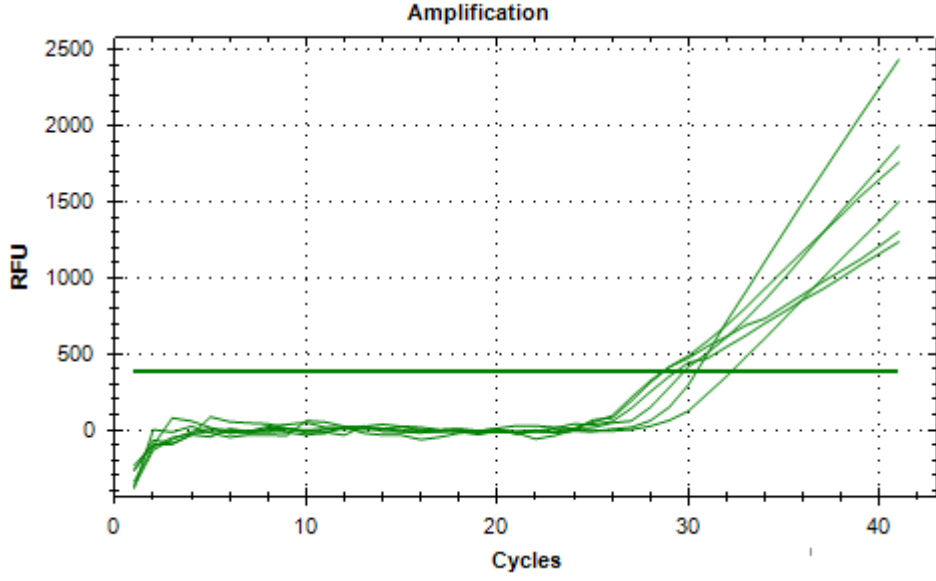
Kontrol olarak Hoagland çözeltilisinde, EC50 değeri olarak 300 ppm kumarin ve 2xEC50 olarak 600 ppm kumarin çözeltilisinde 72 saat süre ile çimlendirilen *L.culinaris* bitkisinin köklerinden alınan örneklerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Örneklerden kontrol GAPDH, kontrol Cu/Zn-SOD, 300 ppm GAPDH, 300 ppm Cu/Zn-SOD ve 600 ppm GAPDH, 600 ppm Cu/Zn-SOD olacak şekilde PZR reaksiyonu üçer tekrarlı olarak Real Time PZR cihazında gerçekleştirildi. Florasan ışık temeline göre reaksiyon takip edildi ve Cq değerleri belirlendi. Kontrol grubu ve kumarin stresi altında çimlendirilmiş bitkilere ait Cu/Zn-SOD RT PZR reaksiyonu profilleri aşağıda verildi (Şekil 4.33, Şekil 4.34, Şekil 4.35).



Şekil 4.33. Kontrol GAPDH, kontrol Cu/Zn-SOD, 300 ppm GAPDH, 300 ppm Cu/Zn-SOD, 600 ppm GAPDH, 600 ppm Cu/Zn-SOD örneklerine ait melt curve grafiği



Şekil 4.34. Kontrol GAPDH, kontrol Cu/Zn-SOD, 300 ppm GAPDH, 300 ppm Cu/Zn-SOD, 600 ppm GAPDH, 600 ppm Cu/Zn-SOD örneklerine ait melt peak grafiği



Şekil 4.35. Kontrol GAPDH, kontrol Cu/Zn-SOD, 300 ppm GAPDH, 300 ppm Cu/Zn-SOD, 600 ppm GAPDH, 600 ppm Cu/Zn-SOD örneklerine ait amplifikasyon grafiği

Uygun miktar ve kalitede cDNA sentezini takiben çalışmada taraması yapılacak hedef gen olan Cu/Zn-SOD ve housekeeping olarak seçilmiş GAPDH genlerinin reaksiyon optimizasyonları ve ön denemeleri yapıldıktan sonra SYBR Green I master boyası kullanılarak Bio RAD CFX Connect™ Real-Time PZR cihazı ile Real-Time PZR uygulamaları gerçekleştirildi. PZR'ın etkinliğini saptamak ve herhangi bir dimer oluşumu olup olmadığını gözlemlemek amacıyla erime eğrisi analizi grafikleri oluşturuldu (Şekil 4.33, Şekil 4.34, Şekil 4.35).

Cu/Zn-SOD ve GAPDH genine ait Real-Time PZR cihazından alınan tüm Cq değerleri Tablo 4.30'da verildi.

Tablo 4.30. Cu/Zn-SOD ve GAPDH genine ait Real-Time PZR cihazından alınan tüm Cq değerleri (Çalışma 3 biyolojik tekrar içerdiği için her bir örnek için 3 adet Cq değeri bulunmaktadır)

| Süre(saat) | Uygulanan Doz kumarin | GAPDH Cq değerleri | Cu/Zn-SOD Cq değerleri |
|------------|-----------------------|--------------------|------------------------|
| 72 | Kontrol | 39,39 | 36,88 |
| | | 35,27 | 36,26 |
| | | 34,76 | 35,97 |
| 72 | 300ppm | 33,89 | 36,16 |
| | | 34,33 | 36,42 |
| | | 28,61 | 32,39 |
| 72 | 600ppm | 34,79 | 35,86 |
| | | 35,13 | 36,67 |
| | | 34,93 | 37,06 |

Uygulamalar sonucunda elde edilen Cq değerlerinin ortalamaları, standart hataları, standart sapmaları ve kontrol grubuna göre anlamlı olup olmadığı Tablo 4.31’de gösterildi. Bu verilere göre kontrol grubuna göre 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulamalarının ortalama Cq değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlı bulunmadı.

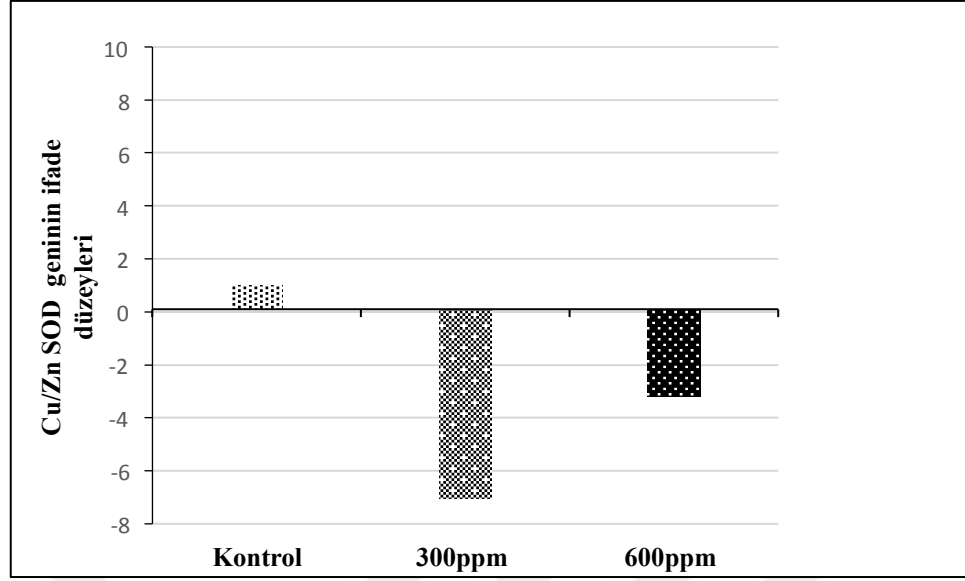
Tablo 4.31. Cu/Zn-SOD ve GAPDH genine ait Real-Time PZR cihazından alınan tüm Cq değerlerinin ortalamaları, standart sapma, standart hata ve kontrole göre olan istatistiksel analiz sonuçları

| Süre(saat) | Uygulanan Doz | Cq değerleri \bar{x} | Standart sapma | Standart Hata | P değeri |
|------------|----------------------|---------------------------|----------------|---------------|----------|
| 72 | Kontrol GAPDH | 36,47 | 2,47 | 1,46 | - |
| | Kontrol Cu/Zn-SOD | 36,37 | 0,46 | 0,26 | - |
| 72 | 300ppm GAPDH | 32,27 | 2,59 | 1,83 | 0,14 |
| | 300ppm Cu/Zn-SOD | 34,99 | 1,84 | 1,30 | 0,36 |
| | 600ppm GAPDH | 34,95 | 0,17 | 0,09 | 0,35 |
| | 600ppm Cu/Zn-SOD | 36,53 | 0,49 | 0,35 | 0,7 |

Kontrole göre gen ifade düzeyleri hesaplanırken kontrol grubunun ekspresyon seviyesi 1 olarak alındı. Diğer örneklerin gen ekspresyon seviyeleri 1'e göre kıyaslandı. Eksi işareti ile verilen veriler genin ifadesinin azaldığını ve pozitif olarak verilenler ise genin ifadesinin çoğaldığını belirtmektedir. REST programı ile elde edilen Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyi verileri Tablo 4.32 ve Şekil 4.36'da verildi. Kontrole göre Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyi 300 ppm kumarin uygulanmasında -7,042 kat azalırken, 600 ppm kumarin uygulanmasında ise -3,211 kat azaldı.

Tablo 4.32. REST programı ile elde edilen Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyi

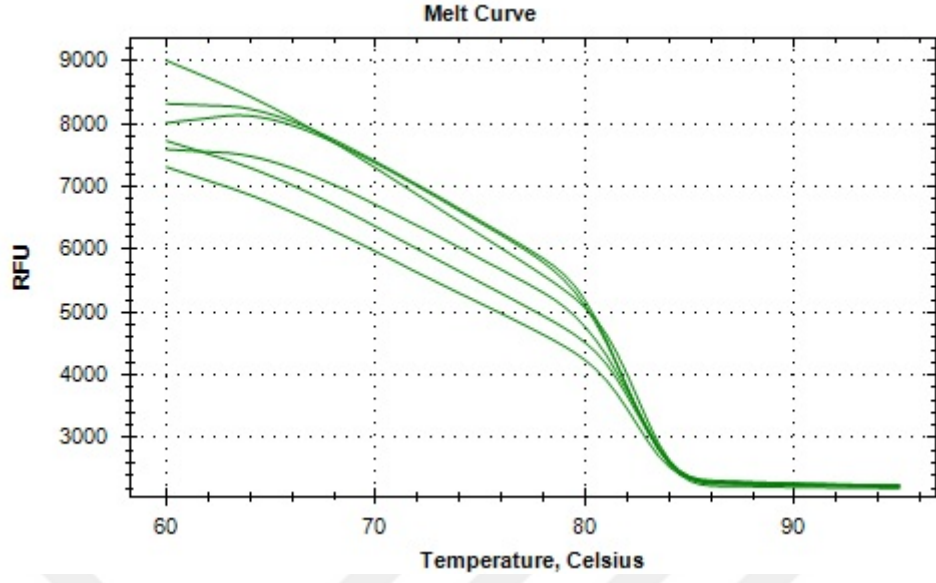
| Süre(saat) | Uygulanan Doz | Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyi |
|------------|-----------------|--------------------------------|
| | Kontrol | 1 |
| 72 | 300 ppm kumarin | -7,042 |
| | 600 ppm kumarin | -3,211 |



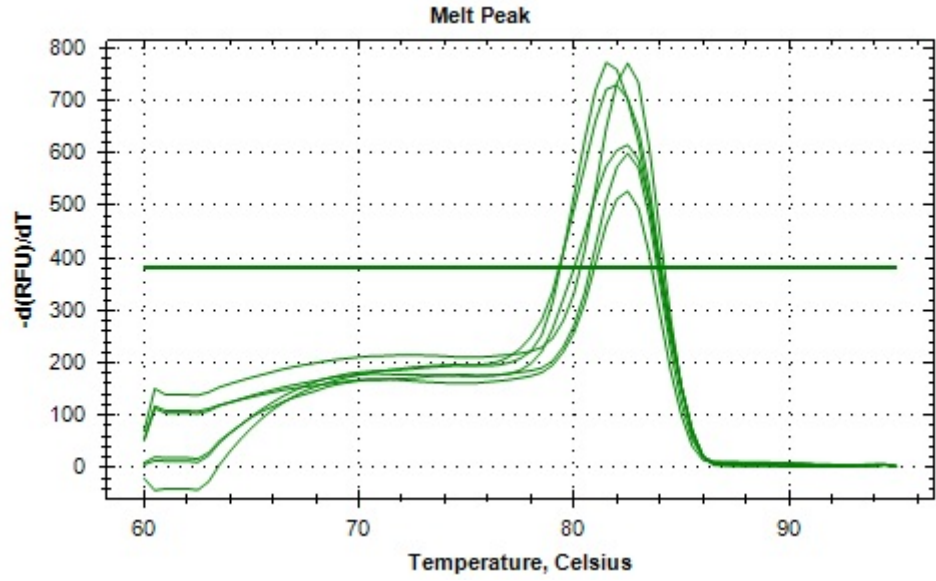
Şekil 4.36. REST programı ile elde edilen Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyinin grafiksel gösterimi

4.4.2.5. Mn-SOD geninin ifade düzeyi

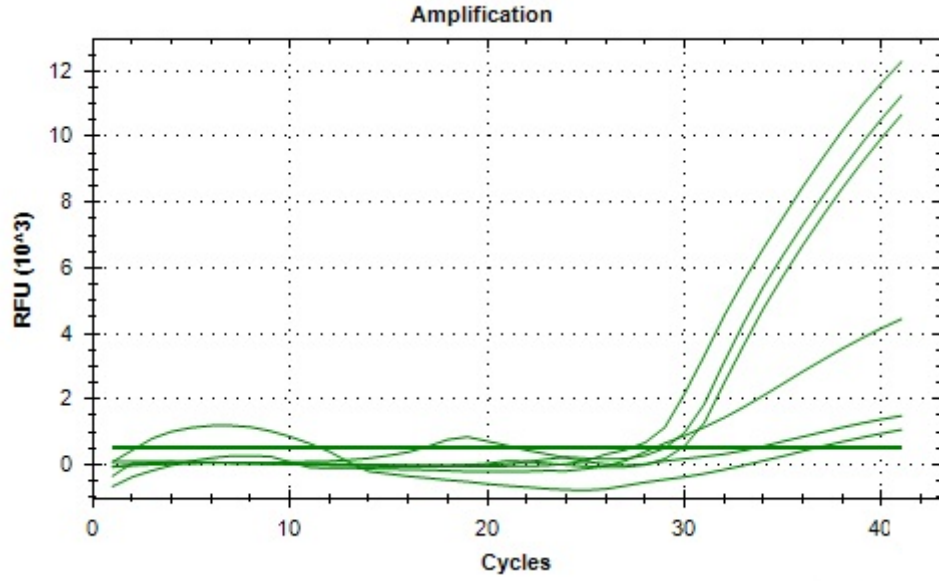
Kontrol olarak Hoagland çözeltilisinde, EC50 değeri olarak 300 ppm kumarin ve 2xEC50 olarak 600 ppm kumarin çözeltilisinde 72 saat süre ile çimlendirilen *L.culinaris* bitkisinin köklerinden alınan örneklerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Örneklerden kontrol GAPDH, kontrol Mn-SOD, 300 ppm GAPDH, 300 ppm Mn-SOD ve 600 ppm GAPDH, 600 ppm Mn-SOD olacak şekilde PZR reaksiyonu üçer tekrarlı olarak Real Time PZR cihazında çalışıldı. Floresan ışık temelinde göre reaksiyon takip edildi ve Cq değerleri belirlendi. Kontrol grubu ve kumarin stresi altında çimlendirilmiş bitkilere ait Mn-SOD RT PZR reaksiyonu profilleri aşağıda verildi (Şekil 4.37, Şekil 4.38, Şekil 4.39).



Şekil 4.37. Kontrol GAPDH, kontrol Mn-SOD, 300 ppm GAPDH, 300 ppm Mn-SOD, 600 ppm GAPDH, 600 ppm Mn-SOD örneklerine ait melt curve grafiği



Şekil 4.38. Kontrol GAPDH, kontrol Mn-SOD, 300 ppm GAPDH, 300 ppm Mn-SOD, 600 ppm GAPDH, 600 ppm Mn-SOD örneklerine ait melt peak grafiği



Şekil 4.39. Kontrol GAPDH, kontrol Mn-SOD, 300 ppm GAPDH, 300 ppm Mn-SOD, 600 ppm GAPDH, 600 ppm Mn-SOD örneklerine ait amplifikasyon grafiği

Uygun miktar ve kalitede cDNA sentezini takiben çalışmada taraması yapılacak hedef gen olan Mn-SOD ve housekeeping olarak seçilmiş GAPDH genlerinin reaksiyon optimizasyonları ve ön denemeleri yapıldıktan sonra SYBR Green I master boyası kullanılarak Bio RAD CFX Connect™ Real-Time PZR cihazı ile Real-Time PZR uygulamaları gerçekleştirildi. PZR'ın etkinliğini saptamak ve herhangi bir dimer oluşumu olup olmadığını gözlemlemek amacıyla erime eğrisi analizi grafikleri oluşturuldu. (Şekil 4.37, Şekil 4.38, Şekil 4.39).

Mn-SOD ve GAPDH genine ait Real-Time PZR cihazından alınan tüm C_q değerleri Tablo 4.33'de verildi.

Tablo 4.33. Mn-SOD ve GAPDH genine ait Real-Time PZR cihazından alınan tüm Cq değerleri (Çalışma 3 biyolojik tekrar içerdiği için her bir örnek için 3 adet Cq değeri bulunmaktadır)

| Süre(saat) | Uygulanan Doz | GAPDH Cq değerleri | Mn-SOD Cq değerleri |
|------------|---------------|--------------------|---------------------|
| 72 | Kontrol | 38,66 | 29,07 |
| | | 33,86 | 29,21 |
| | | 36,77 | 29,96 |
| 72 | 300ppm | 36,84 | 27,41 |
| | | 37,96 | 32,01 |
| | | 36,94 | 28,43 |
| 72 | 600ppm | 34,84 | 29,52 |
| | | 35,37 | 29,98 |
| | | 33,99 | 29,93 |

Uygulamalar sonucunda elde edilen Cq değerleri ortalamaları, standart hataları, standart sapmaları ve kontrol grubuna göre anlamlı olup olmadığı Tablo 4.34’de gösterildi. Bu verilere göre kontrol grubuna göre 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulamalarının ortalama Cq değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlı bulunmadı.

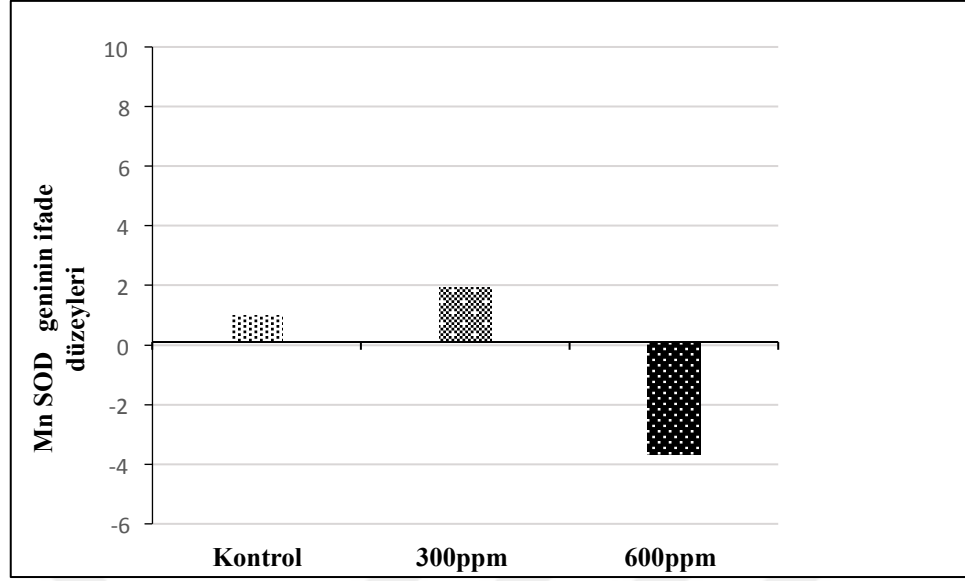
Tablo 4.34. Mn-SOD ve GAPDH genine ait Real-Time PZR cihazından alınan tüm Cq değerlerinin ortalamaları, standart sapma, standart hata ve kontrole göre olan istatistiksel analiz sonuçları

| Süre(saat) | Uygulanan Doz | Cq değerleri \bar{x} | Standart sapma | Standart Hata | P değeri |
|------------|---------------|---------------------------|----------------|---------------|----------|
| 72 | Kontrol | 36,43 | 1,97 | 1,39 | - |
| | GAPDH | | | | |
| 72 | Kontrol | 29,41 | 0,47 | 0,27 | - |
| | Mn-SOD | | | | |
| 72 | 300ppm | 37,54 | 0,50 | 0,35 | 0,61 |
| | GAPDH | | | | |
| 72 | 300ppm | 29,28 | 1,97 | 1,39 | 0,93 |
| | Mn-SOD | | | | |
| 72 | 600ppm | 34,95 | 0,17 | 0,09 | 0,35 |
| | GAPDH | | | | |
| 72 | 600ppm | 29,81 | 0,25 | 0,14 | 0,27 |
| | Mn-SOD | | | | |

Kontrole göre gen ifade düzeyleri hesaplanırken kontrol grubunun ekspresyon seviyesi 1 olarak alındı. Diğer örneklerin gen ekspresyon seviyeleri 1 e göre kıyaslandı. Eksi işareti ile verilen veriler genin ifadesinin azaldığını ve pozitif olarak verilenler ise genin ifadesinin çoğaldığını belirtmektedir. REST programı ile elde edilen Mn-SOD geninin ifade düzeyi verileri Tablo 4.35 ve Şekil 4.40’da verildi. Kontrole göre Mn-SOD geninin ifade düzeyi 300 ppm kumarin uygulanmasında 1,928 kat artarken, 600 ppm kumarin uygulanmasında ise -3,673 kat azaldı.

Tablo 4.35. REST programı ile elde edilen Mn-SOD geninin ifade düzeyi

| Süre(saat) | Uygulanan Doz | Mn-SOD geninin ifade düzeyi |
|------------|-----------------|-----------------------------|
| 72 | Kontrol | 1 |
| | 300 ppm kumarin | 1,928 |
| | 600 ppm kumarin | -3,673 |



Şekil 4.40. REST programı ile elde edilen Mn-SOD geninin ifade düzeyinin grafiksel gösterimi

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında bitkilerde sekonder bileşikler olarak ortaya çıkan kumarinin ekonomik ve besin değeri yüksek olan *L. culinaris*'in çimlenme üzerine etkisi belirlendi. Bu sonuçlar kullanılarak probit analizi ile EC50 değerleri tespit edildi. EC50, 2xEC50 kumarin konsantrasyonları ve kontrol grubu olarak kullanılan Hoagland çözeltilisinde çimlendirilen *L.culinaris* bitki köklerinin 48. ve 72. saatlik çimlendirilme sonucunda oluşan mitotik indeks ve kromozom anormalliklerinin tespiti yapıldı. Biyokimyasal çalışmalarda toplam protein miktarına, H₂O₂ konsantrasyonlarındaki değişikliğe ve alfa amilaz, katalaz, süperoksit dismutaz enzim aktivitelerine bakıldı. Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit analizleri ile lipid peroksidasyon değişimleri hesaplandı ve ayrıca yine stres koşullarında artış gösteren bir amino asit olan prolin konsantrasyonundaki değişim takip edildi. Ayrıca tohumda toplam protein miktarlarındaki değişimleri belirlemek ve Bradford yöntemi ile yapılan çözünebilir total protein miktarını desteklemek amacıyla SDS-PAGE analizi yapıldı. Genomik DNA'da oluşabilecek polimorfizmin saptanması için OPA serisi primerler ile RAPD-PZR çalışması yapıldı. Çalışmamızın en son aşamasında Real Time PZR uygulaması ile katalaz, Cu/Zn-SOD ve Mn-SOD enzimlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri belirlendi. Bu çalışma sonucunda ekonomik değeri olan ve çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılan kumarinin model organizma olan *L. culinaris* üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve biyokimyasal etkileri ilk defa araştırıldı.

5.1. EC50 Belirlenmesi

Probit analizi Finney'in 1971 yılında bulduğu bir istatistik analiz yöntemidir. Çözümleme yöntemi regresyona dayanır. Probit analizi biyoloji dahil, sağlık, tarım, kimya, endüstri gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Finney, 1971). Bu prosedür uygulanırken, diğer farklı etmenlerin arasında olan ilişki, analizde grafiklerle logaritmik olarak hesaplanır (bozuk, bozuk değil, ürün satıldı, satılmadı, sağ, ölü, vb). Bu analizde hesaplama yaparken bir popülasyonun %1'inden %99'una kadar ortamda bulunan maddenin o popülasyon üzerindeki öldürücü konsantrasyonu/dozu

hesaplanır. Letal konsantrasyon (LD50) populasyonun %50'sini öldüren etkin dozdur. Zehir-ölüm etkisinin araştırıldığı çalışmalarda % 50 öldürmeyi veren uyarıcı seviyesinin değerli bir istatistik olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Uyarıcının seviyesinin ölüme neden olmadığı deneylerde EC50 (ortalama etkili seviye) tanımlaması yapılmıştır.

Toksik ajanların miktarlarının düşük olduğu zaman organizmalarda ölüm olmayabilir ya da çok düşük konsantrasyonlarda ölüm olabilir. Toksik madde miktarları arttıkça ölüm oranı da artar ve belirli bir miktardan sonra ise canlıların tümünün öldüğü söylenebilir. Doz ve canlılık arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda toksik madde konsantrasyonu ile ölüm oranı arasında sigmoid bir ilişki vardır. Ancak bu hesaplamalarda elde edilen değerlerin tahmini değerler oldukları belirtilmiştir. Toksik madde konsantrasyonlarının tabii logaritmaları ile ölüm oranlarının probitleri arasında lineer bir ilişki bulunduğu, probit regresyon hattının elde edilmesi ile EC50 değerinin daha doğru elde edilmesi sağlanabilir (Düzgüneş ve Düzgüneş, 1958).

Literatür taramalarında probit analizi ile kumarin maddesinin özellikle bitkiler üzerinde toksik doz hesaplaması yapılmış bir veri ile karşılaşılmadı. Yukarıda verilen teorik bilgilerden probit analizinin bu tür çalışmalarda güvenilir bir test kaynağı olarak kullanılabileceği düşünüldü.

5.2. Sitolojik Analizler

5.2.1. Kumarinin çimlenme yüzdesi ve kök uzunlukları değerleri üzerine etkileri

Çimlenme, embriyonun uygun şartlar altında gelişerek kökü oluşturacak radikulanın ve gövdeyi meydana getirecek plumulanın tohumdan çıkması olayıdır. Tohumlar hemen çimlenmeyip çeşitli iç ve dış faktörlerin etkisi ile bir süre uyku halinde (dormant) kalırlar. Uygun çevre şartları (sıcaklık, su, ışık, oksijen vb.) oluştuğunda tohum su alıp çimlenmeye başlar. Bitki türlerine göre farklılıklar olsa da tohumlar genelde en iyi % 20 oksijen ve % 0,03 karbondioksit ortamında çimlenme gösterir (Mayer ve Mayber, 1982; Taiz ve Zeiger, 2002; Yentür, 2003).

Çimlenme ile tohumda bazı fizyolojik, biyokimyasal, moleküler düzeyde değişiklikler meydana gelir. Tohum çimlenmesi birbirini izleyen bir dizi reaksiyonu

içeren 3 evrede gerçekleşmektedir. Dormant haldeki I. evre tohum tarafından suyun alındığı, II. evre protein sentezinin olduğu, III. evre fide gelişiminin başladığı evredir (Bewley ve Black, 1994; Srivastava, 2002). Su alımını izleyen süre içerisinde hücre membranlarının permeabilitesi artmakta, mitokondri ve nukleus gibi organellerde yapısal değişiklikler oluşmaktadır. Çimlenme aşamasındaki, ilk metabolik değişim solunum hızının artmasıdır. İkinci metabolik değişim, depo materyallerinin yıkımıdır. Depo maddelerinin yıkımı sonucunda tohumdan embriyoya, kotiledondan büyüyen kısımlara madde taşınması ve yıkım ürünlerinden yeni maddelerin sentezlenmesi gibi önemli kimyasal değişimler oluşmaktadır. Çimlenmenin başlamasıyla dormant durumundan çıkan tohumlarda madde kaybı ile birlikte ağırlıkta da azalma meydana gelmektedir. Özellikle düşük molekül ağırlıklı maddeler, iyonlar, şekerler ile amino asitler çimlenme ortamına geçebilirler. Yıkım, taşınma ve sentez gibi olaylar enzimler tarafından yapılır. Bu enzimler kuru tohumlarda inaktif durumdadırlar ancak tohum uyarıldığında aktif hale geçerler ve çimlenmenin ileri evrelerinde aktivitelerinde artışlar gösterirler.

Çimlenen tohumlarda meydana gelen diğer bir önemli değişim DNA ve RNA miktarındaki değişimdir. DNA sentezi çimlenmenin ileri evresinde meydana gelirken, RNA içeriğindeki artış oldukça erken evrede meydana gelmektedir. Çimlenme enerji isteyen bir olaydır, ilk aşamada solunum yolu ile enerji sağlanırken, sentez için gerekli metabolitler de pentoz fosfat yan yolundan sağlanır. Çimlenme sürecinde hormonlar yeniden sentez edilir ya da dokuda mevcut inaktif formlarından aktif formlarına dönüştürülürler (Raven ve Johnson, 1999; Srivastava, 2002). Dormant durumundaki tohum su alınca embriyodaki gibberellinler alevron tabakasına hareket eder, gibberellik asitler alevron tabakasında α - ve β -amilaz, hidrolazlar, glukonazlar, nukleaz, proteaz gibi hidrolitik enzimlerin sentezini ya da salınmasını uyarır. Endosperme salınan bu enzimler ile yıkım sentez reaksiyonları meydana gelir. Bu şekilde sitokinin ve oksin gibi büyüme hormonları serbest kalır. Endospermde oluşan bu hormonlar embriyoya iletilerek hücre bölünme ve uzamasını uyarır. Çimlenmenin kontrolü içsel ve çevresel faktörler olmak üzere iki kısımda incelenebilir. Çimlenmeyi teşvik ediciler sitokininler (kinetin, zeatin), GA ile etilen gibi hormonlar ve potasyum nitrat, tiyoure, strigol gibi basit yapılu bileşikler sayılabilirken, çimlenmeyi engelleyiciler ise hormon olarak ABA ve bileşikler olarak

da trans-sinamik asit, kumarin, kafeik asit, ferulik asit, siyanür, dinitrofenol ve hidroksilamin gibi maddeler sayılabilir (Mayer ve Mayber, 1982; Srivastava, 2002; Yentür, 2003).

Çalışmamızda çimlenen tohum sayısının artan kumarin konsantrasyonlarında gittikçe düştüğü gözlemlendi. 300 ppm konsantrasyonda çimlenen tohum sayısında kontrol grubuna göre yarıyarıya düşüş belirlendi. Özellikle kontrol grubunda 72 saat sonunda %90 olan çimlenme yüzdesinin kumarin konsantrasyon artışına paralel olarak önemli oranda azaldığı tespit edildi. Tohumların 3. 5. ve 7. gündeki görünümüne bakıldığında tohumların gelişim aşamasının 7. gününde 600 ppm kumarin konsantrasyonunda çimlenmenin çok azaldığı tespit edildi. Kumarin uygulanan tohumların kök gelişimi kontrole göre artan kumarin konsantrasyonlarında önemli oranda yavaşladığı söylenebilir.

Çimlenme aşamasında artan kumarin konsantrasyonunda kontrol grubu göre kök uzunluklarında önemli değişiklikler meydana gelmiştir. Hoagland çözeltisi uygulanan kontrol grubu ile kumarinin farklı konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat muamele edilen *L.culinaris* tohumlarındaki çimlenme yüzdesindeki değişime göre kök uzunluklarına ait ortalama değerlerine bakıldığında etken madde konsantrasyonlarındaki artmalara paralel olarak kök uzunluklarında azalmalar tespit edildi ve bu veriler kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Yapılan literatür taramalarında kumarin maddesinin çeşitli bitkilerde çimlenme olayı üzerine hem olumlu hem olumsuz etkilerinin olduğu saptandı. Saleh ve arkadaşlarının (2015) yılında yaptıkları çalışmada kumarinin *Vicia faba* L.'nin çimlenmesine, gelişmesine ve bazı fizyolojik parametreler üzerindeki etkisine bakmışlar ve kumarinin doğrudan uyguladıkları bitki çeşidinin, büyüme ve fizyolojisini aktif bir büyüme maddesi olarak etkileyebileceğini ve fitohormon metabolizması ile etkileşiminin olabileceğini açıklamışlardır. Bizim çalışmamızdaki sonuçlar ile bu çalışmadaki sonuçlar farklıdır. Saleh ve arkadaşları kumarinin teşvik edici yönünü ileri sürerken bizdeki sonuçlar kumarinin çimlenme üzerindeki inhibisyon etkisinin çok yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durumun farklılığı bitki türünün farklı olmasına ve ortam koşullarına bağlanabilir. Mata ve diğ. (1998), Kupidowska ve diğ. (1994) yaptıkları çalışmalarda doğal kumarin türevi olan

imperatorinin ve kumarinin, hedef bitkilerde ATP sentez ve fosforilasyon mekanizmalarını inhibe ettiğini, mitokondriyal matrisdeki yapısal değişikliklerin yoğunlaşmasına ve bu organellerin oluşumunda, fizyolojisinde değişikliğe sebep olduklarını ve allelopatik ajan olarak davrandığını rapor etmişlerdir. Bu değişiklikler sonucunda enerji metabolizması etkilediğini açıklamışlardır. Bu çalışmalardan yola çıkarak yukarıda verilen bilgiler ile kumarinin çimlenme aşamasındaki *L.culinaris* hücrelerinde membran permabilitesine etki ederek solunum mekanizmasını etkilediğini düşünüyoruz. Çimlenme oranlarındaki azalmanın sebebi de bu olabilir. Aynı şekilde Wu ve diğ. (2016), Shettel ve Balke'nin (1983), Ahrabi ve diğ. (2011), Abenovoli ve diğ. (2004; 2006), Aliotta ve diğ. (1992), Zhou ve diğ. (2013), Li ve Gao (2011), ve Pergo ve diğ. (2008) yaptıkları araştırmalarda kumarin ve türevlerinin uyguladıkları hedef bitkilerde hem tohum çimlenmesi hem de fide gelişiminde önemli inhibisyona neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmalar bizim yaptığımız çalışmayı destekler niteliktedir. Kumarinin *L.culinaris* tohumlarında çimlenmeyi ve kök uzunluğunu geciktiren ve inhibe edebilen bir sitotoksik ajan gibi davrandığı görüşüdeyiz.

5.2.2. Kumarinin mitotik indeks üzerine etkileri

Bitkisel organizmalara uygulanan toksik maddelerin oluşturduğu etkilerin incelenmesi için kök ucu meristematik hücrelerinde kromozom anormalliklerinin ve mitotik indeksin araştırılması önemlidir. Mitotik indeks hücre bölünme frekansını yansıtır ve kök gelişim oranını belirlemede önemli bir parametre olarak kullanılır (Jiang ve diğ., 2000). Bitkilerde mitoz bölünme incelemesi için en çok kök ucundan, genç yapraklardan ve küçük çiçek tomurcukların petal yapraklarındaki meristematik hücrelerden yararlanılmaktadır. Meristematik dokular kök ucu ve gövde sürgünlerinde bulunmaktadır ve bu yapılar bitkinin tüm yaşamı boyunca bölünebilme yeteneğindedir bu yüzden mitoz bölünme bitkilerde meristematik dokularda araştırılabilir. Kök uçları ile uğraşmanın kolay olması, kök meristeminin bölünen birçok hücre içermesi, kök uçlarının kimyasallarla doğrudan etkileşebilir olması, kolay ve ucuz elde edilebilirlikleri yönünden araştırmacılar tarafından daha çok tercih edilmektedir. Kök ucu meristematik hücrelerdeki mitotik safhaların sitolojik olarak incelenmesi ile mitotik indeks hesaplanabilir. Kromozom sayımı

çalışmalarında ve toksikolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Böylece kimyasal maddenin hücre bölünmesi üzerindeki etki mekanizmaları konusunda bilgi verebilir.

Çalışmamızda mitotik indeks oranı üzerine EC50 ve 2xEC50 kumarin konsantrasyonlarında *L.culinaris* tohumları üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı ($P<0,05$) bulundu. Kontrol ve uygulama grupları kendi aralarında kıyaslandığında uygulanan kumarin dozu arttıkça mitotik indeks yüzdesinde önemli oranda düşüş gözlemlendi. Mitotik indeksteki azalma, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında %22'nin altına düşerse letal etki (Antonsie-wiez, 1990), %50'nin altına düşerse subletal etki (Panda ve Sahu, 1985) değeri olarak belirtilmektedir. Bu değerler, araştırmacılar tarafından sitotoksik sınır değerleri olarak tanımlanmıştır (Sharma, 1983). Mitotik indeksteki düşüşün nedenlerini Schulze ve Kirscher (1996), mitozu baskılayıcı etkiye sahip genotoksinlerin DNA ve nükleoprotein sentezini bloke etme gücüne sahip olmaları ile belirtmişlerdir. El-Ghamery ve diğ. (2000) ise mitozu durduran etkiyi, G1 fazının bloke olması ile S fazında DNA sentezinin baskılanmasının neden olduğunu açıklamışlardır. Bal (1995), yaptığı çalışmada mitotik indeksteki düşüşün nedeninin mitotik döngüye girmiş, toksik kimyasal ajanlara karşı korumasız hücrelerin fizyolojik cevabı olarak; enerji yollağının, protein, RNA ve DNA sentezlerinin inhibe olmasından kaynaklanabileceğini belirtmiştir. Kaymak (2005), çeşitli kimyasalların kromozomlarda mitoz bölünme için gerekli olan iğ ipliklerinin oluşumunu sağlayan temel proteinleri mikrotübülleri etkilemesi sonucunda olabildiğini açıklamıştır. Eun ve diğ. (2000) kimyasal ajanların mikrotübül organizasyonunu değiştirdiğini ve dolaylı olarak mitoz aktivitesini engellediğini belirtmişlerdir. Kupidowska ve diğ. (1994) yaptıkları çalışmada kumarinin *Allium cepa* kök uçlarının meristematik hücrelerinde mitozu geciktirdiğini belirtmişlerdir. Bu bileşiklerin, mitozu geciktirmesi, oksijen alımını azaltması ve mitokondriyal yapıdaki değişikliklere sebep olmasından dolayı allelokimyasal yapıda olmaları şeklinde açıklamışlar. Abenavoli ve diğ. (2003) allelokimyasal bileşik kumarinin hücre döngüsünün bir inhibitörü olarak rol oynadığını ve yaşlanmayı teşvik edici madde olarak hareket edebileceğini öngürmüşlerdir. Etken maddenin *L.culinaris* kök hücrelerindeki mitotik indekste azalışlara sebep olması, hücre bölünmesindeki kontrol noktalarını düzenleyen genleri veya gen ürünlerini etkilemesinden olabileceği gibi enerji metabolizmasının, protein, RNA ve DNA

sentezlerinin inhibe olmasından, mikrotübül organizasyonunu değiştirmesinden ve iğ ipliklerin oluşumunu sağlayan temel proteinlerin sentez mekanizmasını etkilemesi sonucunda da oluşabilir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar daha önce yapılan benzer çalışmalarla uyum göstermektedir. Artan kumarin konsantrasyonun hücre bölünmesi üzerinde inhibisyon etkisi yaptığı gözlendi.

5.2.3. Kumarinin hücre bölünmesi ve kromozom anormallikleri üzerine etkileri

Genotoksisite, sitotoksisite araştırmalarında toksik kimyasal ajan için çok sayıda kromozom preparatlarının hazırlanması, anormallik oranlarının ayrı doz ve sreler için belirlenmesi, yüzlerce hücrenin mikroskopta sayılması, incelenmesi ve istatistiksel hesaplamalarla sonuca gidilmesi araştırmanın güvenirliliği açısından önemlidir. Kromozom anormalliklerinin genotoksik ve sitotoksik maddeler için indikatör olduğu belirtilmektedir (Ertürk, 2013). Bitkilerin depolanmasının, taşınmasının, kullanılmasının kolay, ucuz olması ve iyi gözlenebilen kromozomlarının varlığı bu tür araştırmalarda tercih edilmesini sağlar.

Kromozom sayısındaki ve yapısındaki değişimler, toksik kimyasal ajanların etkisi ile kromozomların anormal yerleşmesi sonucunda meydana gelirler. Kromozom kaybına örnek olarak geri kalmış kromozom, yapışıklık, multipolarite, c- mitoz verilebilir. Kromozomlarda kırıklara sebep olan maddeler kromozom köprüsü oluşumunda veya kromozom yapısında değişikliğe neden olabilirler (Leme ve Marin-Morales, 2009; Radic ve diğ., 2010). Geri kalmış kromozomlar; iğ ipliklerinin organizasyon veya fonksiyonlarında meydana gelen bozukluklar sonucunda (Yıldız ve diğ., 2009; Fındıklı ve Türkoğlu, 2010; Türkoğlu, 2012), anafaz köprüsü; eşit olmayan kromatin değişimindeki transanlokasyon, disentrik kromozom varlığı, kromozom ve kromotinlerin kırılması sonucunda (Liman, 2013), c-mitoz oluşumu; iğ ipliklerindeki bozulmalar sonucunda (Yoshida ve diğ. 1983), kalgın kromozomlar; iğ ipliklerinin etkilenme durumuna bağlı olarak kromozomlarda geri kalma, kromozomal hareketlerin yetersizliği ya da sinyal sürecinde meydana gelen düzensizlikler sonucunda, multipolarlık; iğ ipliklerinin kısmi etkilenmesi sonucunda (Ahmad 1983), kromozomlarda yapışıklık ise; kromatin proteinlerinin fiziksel adezyonu sonucunda (Patil ve Bhat, 1992) oluşabilmektedir. Köprü oluşumunun kromozomal yapışıklıklar, disentrik kromozom oluşumu ve kardeş kromatidlerde birleşme,

kromozomların kutuplara doğru hareketi sırasında meydana gelebileceği rapor edilmiştir. Ayrıca kopmuş kromozom parçaları mikronukleus oluşumuna ve genetik materyal kaybına sebep olabilir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

Çalışmamızda 48 ve 72 saatlik periyotlarda kontrol grubuna göre artan kumarin konsantrasyonlarında anormal bölünen hücrelerde artış gözlemlendi. 48 saatlik sürede kontrol grubuna göre en fazla anormal bölünen hücre 600 ppm kumarin konsantrasyonunda metafaz evresinde gözlemlendi. 72 saatlik sürede ise kontrol grubuna göre en fazla anormal bölünen hücre 600 ppm kumarin konsantrasyonunda anafaz evresinde gözlemlendi. Bu veriler artan kumarin konsantrasyonlarının her bir bölünme evresinde anormal bölünen hücre miktarlarını artırdığını göstermektedir. Hücredeki bir protein ya da enzimin inhibisyonu ya da yapısının bozulması, o hücredeki faaliyetleri de olumsuz yönde etkileyeceğinden farklı sonuçlar oluşabilir. Herhangi bir enzim inhibisyonu sonucunda, bölünmeyi herhangi bir safhada durdurabilir ya da enzim aktivasyonu ile bölünme uyarılabilir ve daha hızlı bölünme olabilir. Grana ve diğ. (2017) kumarin grubuna ait doğal bir bileşik olan skopoletin hücre çeper deformasyonları, çok çekirdekli hücreler, anormal çekirdekler ve doku düzensizliği gibi köklerde hücre ve doku anormallikleri oluşturduğunu göstermişlerdir. Skopoletin, mitokondriyal membran depolarizasyonuna sebep olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan literatür incelemeleri sonucunda, kumarin ve türevi olan maddelerin hücre bölünmesinin her sürecinde etkili olduğu ve bu nedenle de farklı bölünme fazlarında farklılıklar ortaya çıkardığı açıklanabilir.

48 saatlik ve 72 saatlik sürelerde ortaya çıkan kromozom hasarı çeşitleri ve oranlarına bakıldığında; en çok rastlanan kromozom hasarları düzensiz profaz, nükleus deformasyonu, düzensiz metafaz dır. En az rastlanan hasarlar multipolarite, bölünme düzleminde değişim ve tabla kayması olarak belirlendi. Toksik maddeler iğ ipliklerini işlevsiz hale getirerek kromozomların kutuplara çekilmesini engeller, metafazı bloke eder. Kutuplara göç etmesi engellenen kromozomlar birbirlerine yaklaşarak yapışık bir görüntü oluştururlar (Ventura-Camargo ve diğ., 2011). Bu bilgiden yola çıkarak düzensiz metafaz anormalliğinin fazla görülmesi kumarinin iğ ipliklerine etkisinin yüksek düzeyde olduğu görüşünü öne çıkartabilir. Yapılan başka bir çalışmada, elektromanyetik alanın *Vicia faba* üzerinde oluşturduğu kromozom anormallikleri incelendiğinde profaz ve metafazda gözlenen kromozom

anormalitesindeki artışlarının nedeni, bölünme sırasında kardeş kromatidlerin ayrılma sürecinin yavaşlaması ve kromozom yoğunlaşmasının etkilenmesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir (Rapley ve diğ., 1998). Ayrıca metafazdaki kromozom anormalliğinin fazla olmasını, kardeş kromatidler arasındaki bağlantının kaybolması ile oluşan ve anafazın başlamasına sebep olan sinyal sürecindeki gecikmeden kaynaklanmış olabileceğini açıklamışlardır. Multipolarlık ve kalgın kromozomlar ile c-mitoz şeklinde ortaya çıkan anormallikler, mikronukleus oluşumu ya da kromozom kaybı ile sonuçlanabilir. Multipolarlık, kalgın kromozom ve c-mitoz gibi anormalliklerin gözlenmesi kumarin toksitesi sonucuna bağlı olarak ortaya çıkan serbest radikallerin, mitotik iğ ipliklerinde meydana getirdiği hasarlar sonucunda ortaya çıkabilir. İğ iplikleri hücre bölünmesi sırasında kromozomların kutuplara doğru hareketinde önemli bir role sahiptir. Bu anormalliklerin varlığı kumarin maddesinin, iğ oluşumunu veya fonksiyonlarını engelleyerek, iğ iplikleri üzerinde direk olarak ya da oluşan yan ürünler ile etkili olduğu söylenebilir. DNA tamir mekanizmasının etkilenmesi ve bu nedenle meydana gelen anormalliklerin onarılamaması, oluşan anormalliklerin artmasına sebep olabilir (Robison ve diğ., 2002). Kromozom köprüsü metafaz evresinde kromatin ipliklerinin kardeş kromatinlere tutunarak, geç anafaz veya telofaza kadar ayrılmaması sonucunda meydana gelebilir. Bu bağ çok güçlü olursa kromatinler kırılır ya da anafazda birleşik görüntü oluşturabilir (Kumar ve Srivastava, 2011). Kumarin etken maddesinin oluşturduğu yan ürünlerin DNA'daki hareketli elektronlarla etkileşime girmesi, ya da DNA tamir mekanizmasını etkilemiş olmasından dolayı kromozomal anormalliklerin ortaya çıkabileceği düşünülmektedir. Ayrıca ikinci mesajcılar aracılığıyla DNA'ya etki etmekte ve anormalliklerin artmasına neden olduğu düşünülebilir. Kumarin etken maddesinin mitotik indekste azalmalara, hücre bölünmesinde ve kromozom anormalliğine neden olduğu görülmektedir. Sitolojik incelemeler sonucunda kumarinin artan konsantrasyonlarının hem hücre seviyesinde, hem kromozom organizasyonunda hem de DNA seviyesinde etkili olduğu söylenebilir.

5.3. Biyokimyasal Analizler

5.3.1. Kumarinin toplam protein miktarı üzerine etkileri

Organizmaların anabolizma ve katabolizma metabolizmasının önemli bir göstergesi olan toplam protein içeriği, canlının karşılaştığı olumsuz koşullara karşı cevap oluşturduğunun önemli bir göstergesi olarak bilinmektedir (Singh ve Tewari, 2003).

48 saat sonunda yapılan ölçümlerde, kontrol ve 300 ppm kumarin konsantrasyonunda protein içeriğinin (1,82 mg/ml ve 1,83 mg/ml) fazla değişmediği buna karşın 600 ppm kumarin uygulanmış örneklerde protein içeriğinin (3,30 mg/ml) belirgin şekilde arttığı gözlemlendi. Ancak bu değerlerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. 72 saat sonunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde 48 saat süre sonundaki veriler ile benzer sonuçların ortaya çıktığı görüldü. Kontrol grubu ve 300 ppm kumarin konsantrasyonunda protein içeriğinin (1,87 mg/ml ve 1,86 mg/ml) fazla değişmediği, 600 ppm kumarin uygulanmış örneklerde protein içeriğinin 2,21 mg/ml olduğu belirlendi. 48 saat ve 72 saat sonunda elde edilen veriler karşılaştırıldığında; protein miktarının kontrol grubu ve 300 ppm kumarin uygulamasında değişmediği ancak 600 ppm da artma meydana geldiği belirlendi.

Yapılan literatür araştırmalarında Zhou ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada kumarin uygulamasının *Medicago sativa*'da büyüme üzerindeki etkileri, net nitrat alımına, nitrat (NO_3^-) ve amonyum (NH_4^+) konsantrasyonuna, çözümlü proteinlerin miktarına ve nitrat redüktaz (NR), glutamin sentaz (GS) ve glutamat dehidrogenaz (GDH) aktivitelerine etkilerini incelemişler. Yüksek konsantrasyonda kumarin (≥ 0.1 mM), sürgünlerde ve köklerde taze ağırlık üretimini ve kök/gövde gelişim oranını düşürdüğü belirtilmiş ancak köklerde çözümlü protein üzerinde istatistiksel olarak önemli bir etkisi olmadığı açıklanmıştır. Buldukları verilere göre, düşük konsantrasyonda kumarinin, nitrat alımını ve köklerde azot metabolizmasını uyardığı, ancak yüksek konsantrasyondaki kumarinin, yoncadaki azot metabolizmasının temel enzimlerini ve bitki büyümesini olumsuz yönde etkilediğini rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada Abenavoli ve diğ. (2003) kumarinin *Daucus carota L. cv. Saint Valery*'e uygulamışlar. Bu bitki üzerindeki kumarinin etkilerini hücre büyümesine ve nitrat alımına, amonyum ve karbonhidratların kullanımının açısından incelemişlerdir. 50 $\mu\text{mol/L}$ kumarin varlığı, kültürlenmiş hücrelerde

serbest amino asitler ve amonyum birikimine neden olmuş ve glutamin sentetaz, glutamat dehidrojenaz, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz ve fosfoenolpiruvat karboksilaz aktivitelerini uyardığı ve malat dehidrojenaz enzimini ise aynı koşullar altında inhibe edildiğini açıklanmıştır. Bu etkiler, protein katabolizmasının uyarılması ve/veya kumarin tarafından indüklenen protein biyosentezi ile müdahale açısından yorumlanmış. Tohum çimlenmesi sırasında depo proteinlerinin proteolitik olarak yıkıldığı araştırmacılar tarafından rapor edilmiş (Marttila ve diğ., 1995; Vierstra, 1996).

Çalışmamızda kontrol grubundaki ve 300 ppm deki total protein miktarını birbirine çok yakın çıkması çimlenmeyi takiben protein yıkımı ile ilgili enzimlerin hızla aktive olup, var olan proteinleri hidrolize etmesi ve yeni protein sentezinin olmaması ya da 300 ppm kumarin konsantrasyonunun protein katabolizması ya da anabolizmasında herhangi bir etki göstermediği şeklinde yorumlanabilir. Artan kumarin konsantrasyonlarında protein yıkımı hızlı olmadığı için çimlenme oranının düşük ve kök uzamasının da daha az olduğu söylenebilir. Bunun sonucunda antioksidan sistem ile ilgili enzimlerin sentezi artar, dolayısıyla düşük kumarin konsantrasyonlarına göre protein miktarının yüksek çıkması söz konusu olabilir. Çalışmamızda kök örneklerinde kontrole göre 600 ppm de görülen artış çözümlü protein miktarları, stres şartlarında bitkinin verdiği tepki olarak değerlendirilebilir. Farklı stres koşullarında bitkide çözümlü proteinlerin çözümlülüğünü artıran prolin amino asidinin artışı buna örnek olarak gösterilebilir (Öncel ve Keleş, 2002).

5.3.2. Kumarinin SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) profillerine olan etkisi

SDS-PAGE denatüre edilmiş proteinlerin belirli bir pH değerinde elektriksel bir alanda, moleküler büyüklüğüne göre ayrılması prensibiyle çalışan bir tekniktir. SDS-PAGE moleküler ağırlığın belirlenmesinde, protein saflığının tayininde, aminoasit diziliminin belirlenmesinde, türler arasındaki farklılıkların ya da aynı türe ait bireylerin farklı durumlarda sentezledikleri protein farklılıklarının belirlenmesinde kullanılır. SDS-PAGE'in en çok kullanılan alanlarından biri, polipeptidlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesidir. Molekül ağırlığı bilinmeyen protein örneği, molekül ağırlığı bilinen standart proteinlerle beraber, aynı jel üzerindeki kuyucuklara

uygulanır ve elektroforetik olarak ayrımı sağlanır. Ayrımı gerçekleştirilen proteinlerin sonuçlarını matematiksel olarak değerlendirerek molekül ağırlığını belirler. Kantitatif ve kalitatif protein analizleri, metabolizmanın işleyişi hakkında önemli bilgiler verdiği için, canlı ile ilişkili tüm temel disiplinler arasında önemli bir yer almaktadır (Temizkan ve diğ., 2004).

SDS-PAGE uygulaması, kontrol grubu ve kumarin uygulanan *L.culinaris* tohumlarında meydana gelmesi muhtemel protein profil değişikliklerinin belirlenmesi ve total çözümlü protein miktarlarını belirlemek için yapılan çalışmayı desteklemek amacıyla yapıldı. 48 ve 72 saat sonunda elde edilen örneklerin SDS-PAGE analizinde; 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulamaları sonucunda örneklerin protein bant yoğunluğunun arttığı belirlendi. Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarında 48 ve 72 saat sonrasında SDS-PAGE ile oluşan toplam proteinlere ait ortalama moleküler ağırlık verileri kıyaslandığında; artan kumarin konsantrasyonlarının *L.culinaris* tohumlarının protein profillerinde hem polimorfik bantlar oluşturduğu hem de bant yoğunluklarında artış veya azalmalara neden olduğu belirlendi.

48 ve 72 saat sonunda ortaya çıkan sonuçlara göre, kontrol grubuna göre 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulanmış örneklerin protein bantlarının moleküler ağırlıklarında sırasıyla artış tespit edildi. Ortalama moleküler ağırlık verilerinde artan konsantrasyon ile orantılı olarak artış belirlendi. Sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlı bulundu.

Ayrıca çalışmamızda kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarındaki 48. ve 72. saat sonrasında SDS-PAGE analizi sonucunda elde edilen protein bant profillerinin uygulama grupları için ayrı değerlendirilmesi ile elde edilen dendrogram ve uygulama grupları arasındaki uzaklık değerlerine bakıldı. Dendrogram da uygulama yapılmış ve yapılmamış tohumlar iki ana küme oluşturdu. Her iki zaman uygulaması için; 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulanması aynı dallanmada yer alırken kontrol grubu ayrı dallanma gösterdi.

Çalışmamızda *L. culinaris* tohumlarındaki çözümlü protein konsantrasyonları ile SDS-PAGE profilleri de kumarinin biyokimyasal toksisitesinin etkilerini belirlemek amacıyla yapıldı. Artan kumarin konsantrasyonlarının bitkide stres oluşturup

oluşturmadığı belirlenmeye çalışıldı. SDS-PAGE profillerinde çok az miktarda değişim gözlenmesi ve elde edilen protein bantlarında farklı bant yoğunluklarının gözlenmesi, protein miktarlarının değişmiş olabileceği şeklinde ifade edilebilir. Çözünür protein miktarlarında ve protein profillerinde meydana gelen değişimlerin nedeni; tohumların çimlenme sırasında strese girmelerine ve buna bağlı olarak meydana gelen fizyolojik, biyokimyasal ve genetiksel değişimlere bağlanabilir. Protein profillerinde oluşan değişimin çok fazla olmaması bu değişimlerin DNA'nın fonksiyonel olmayan bölgelerinde meydana gelmiş olabileceğinin bir göstergesi olabilir. Ayrıca protein bantlarından elde edilen veriler ile mitotik indeks oranındaki azalma karşılaştırılırsa, artan kumarin konsantrasyonunun hücre siklusunun interfaz-sentez basamağında meydana getirdikleri değişikliklerden kaynaklandığı belirtilebilir. Kumarin uygulaması ile toplam protein seviyesinde belirlenen artış sentezlenen stres proteinleri ile açıklanabilir. Bu hipotezi desteklemek için başka fizyolojik, biyokimyasal ve genetiksel parametrelere de bakılması gerekmektedir. Örneğin western blot analizleriyle özellikle hangi tip proteinlerin miktarlarında artış geldiğine bakılabilir. Böylelikle daha spesifik sonuçlar elde edilebilir.

5.3.3. Kumarinin prolin miktarı üzerine etkisi

Prolin aminoasidi, bitki stres fizyolojisinde üzerinde en çok çalışılan moleküllerden birisidir. Bu aminoasidin biyotik ve abiyotik stres koşulları altındaki bitkilerde önemli miktarlarda yükseldiği ve böylelikle bitki savunma mekanizmasını devreye sokarak bitkinin strese karşı koyma mekanizmasını desteklediği belirtilmiştir. Birçok bitkinin, yüksek tuzluluk (Hassine ve diğ., 2008), kuraklık (Choudhary ve diğ., 2005), oksidatif stres (Yang ve diğ., 2009), aşırı ışık (Jan ve diğ., 2012), düşük sıcaklık (Chu ve diğ., 1974) ve yüksek sıcaklık (Naidu ve diğ., 1991) gibi stres koşullarında prolin miktarlarının arttığı rapor edilmiştir. Prolinin ozmotik düzenleyici olmasının yanı sıra serbest radikallerin yakalanmasında, membranların ve proteinlerin stabilizasyonunu sağlamada, sitoplazmik asidozun azaltılmasında, hücrel redoks potansiyelinin korunmasında ve DNA hasarlarının engellenmesinde de rol oynadığı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Hare ve Cress, 1997; Jain ve diğ., 2001; Lima-Costa ve diğ., 2008; Vijayan, 2009). Prolin aminoasidinin enzimlerin aktif konformasyonunun korunmasında etkili olduğu ve bu yolla iyonların

neden olduğu konformasyonel değişikliğe karşı enzimlerin denatürasyonlarını engellediği ve moleküler şaperon olarak rol aldığı bildirilmiştir (Cherian ve diğ., 2006). Örneğin prolinin nitrat reduktazı alüminyum stresi koşullarında koruduğu (Sharma ve Dubey, 2005), ribonukleaz ve proteazları arsenik stresi altında kararlı halde tuttuğu (Mishra ve Dubey, 2006) belirtilmiştir. Ayrıca prolin gibi bileşikler ozmotik denge ajanı ve hücre içi yapıların korunmasında rol alarak, hücresel osmolaritede artışa neden olurlar. Böylelikle hücreye su giriş çıkışının ayarlanmasında rol oynarlar. Bu da turgor basıncının sürdürülmesinde önemlidir. Prolin sentezi pH ve redoks düzenlenmesinde ve strese karşı koyma süresince karbon, azot ve enerji için yedek kaynak olarak da rol oynar (Kavi Kishor ve diğ., 2005). Osmolitler arasında prolinin serbest radikalleri tetiklediği hasarlar ve singlet oksijene (O[•]) karşı bitkileri koruyan tek molekül olduğu belirtilmiştir. Prolin singlet oksijen ve hidroksil radikalini uzaklaştırıcı bir rol oynayabildiği için membranlar kadar protein ve DNA' nın konformasyonun stabilize olmasını sağlar. Prolin sadece redoks sinyallerinde önemli bir molekül değildir aynı zamanda bütün bitkilerde tuz, metal ve dehidrasyon stres şartları altında oluşan ROS'ların etkili bir gidericisidir. Katalaz, peroksidaz ve polifenol oksidaz enzim aktivitelerinin in vivo da prolin tarafından artırıldığı belirtilmiş (Kavi Kishor ve diğ., 2005 Mani ve diğ., 2002).

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerinde 72. saat sonrasında oluşan prolin miktarları değerlendirildiğinde, kontrol grubunda 2,07 µg/g prolin miktarı belirlenirken, 300 ppm kumarin konsantrasyonunda (2,81 µg/g) ve 600 ppm kumarin konsantrasyonunda (4,00 µg/g) kontrole iki kat artış tespit edildi. İstatiksel olarak 600 ppm kumarin uygulanması anlamlı olarak farklı bulundu.

Prolin stres şartlarında çok yüksek seviyelerde biriktiğinden stres süresince prolinin rolü önemlidir. Prolin miktarlarında belirlenen yükselme, membran permeabilitesindeki artma ve nispi su içeriğindeki azalmalarla orantılıdır. Bu da bitkinin strese karşı bir tolerans veya kendi kendini koruyucu bir mekanizma geliştirdiği hakkında bilgi verebilir (Bokhari ve Trent, 1985) Çalışmalarımızın sonucundaki prolin artışı, bitkilerin artan kumarin uygulamaları sonucunda strese girdiğinin bir kanıtıdır. Ayrıca prolin serbest radikaller ile stabil kompleksler meydana getirerek, bu kompleksleri detoksifiye etme özelliğindedir. Osmotik regülatörlerden olan prolinin karasal bitkiler için bu görevi yaptığımız literatür

araştırmaları belirtirken, çalışmamızdaki prolin artışı bu bulguları desteklemektedir. Organizmada prolin miktarının hızla artması, bitkinin stres koşullarına adaptasyonun ve serbest oksijen radikallerinden doğan zarara karşı bir koruma mekanizması oluşturmakta olduğunu belirtilmektedir (Smirnoff ve Colombe, 1988).

5.3.4. Kumarinin lipid peroksidasyonu üzerine etkisi

Reaktif oksijen turleri tarafından en fazla etkilenen bileşiklerin, hucre zarının ana yapısını oluşturan lipitler olduğu duşunılmaktadır. Organizmada yeterli miktarda reaktif atom ya da molekul varlığında, lipit peroksidasyonu hızlı bir şekilde başlar. Reaktif oksijen turlerinin sebep olduğu lipit peroksidasyonu bir radikalik zincir reaksiyonudur (Aruoma ve Cuppett, 1997). Lipit peroksidasyonu, hucrenin hayati fonksiyonları için de onemlidir ve organizmaya geri donuşumsuz zararlar verir (Davies, 2000). Aktif oksijen atom ya da molekul oluşumu stres koşullarına karşı bitkilerin oluşturmuş olduğu bir tepkidir (Luna ve diğ., 1994; Gossett diğ., 1994). Reaktif oksijen turleri hucrede membranların yapısında bulunan lipitleri oksitleyerek membranların yapısını bozar ve buylelikle zarların iyon alımındaki seçici geçirgenlik ozeliklerini azaltabilirler. Bitkide stres oluşturan faktorler sonucunda hucre zarlarındaki lipitlerin oksitlenmesi reaksiyonlarında ortaya çıkan ara urun malondialdehit (MDA) biyomembrandaki doymamış yağ asitlerinin ayırşma urunlerinden biridir. Bu sebeple stres araştırmalarında MDA miktarı stres zararının olusunu belirlemede kullanılır (Wise ve Naylor,1987). Ortaya ıkan MDA, hucre zarlarındaki iyon alışverişini etkileyerek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına sebep olur. Buylelikle iyon geçirgenliğinin değişmesine, enzim aktiviterinde artma ya da azalma gibi olumsuz sonuçlara sebep olur. MDA bu ozelliği nedeniyle, DNA'nın azot taşıyan grupları ile reaksiyona girebilir; bundan dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik ozelikte olduğu soylenebilir (Porter, 1984; Niki, 1987; Placer ve diğ., 1990; Kalender ve diğ., 2002).

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* kolerinde 72. saat sonrasında oluşan MDA miktarları değerlendirildiğinde, kontrol grubunda 2,04 nmol/g MDA miktarı belirlenirken, 300 ppm kumarin konsantrasyonunda (3,74 nmol/g) ve 600 ppm kumarin konsantrasyonunda (4,30 nmol/g) kontrole goere artan değerler tespit edildi. İstatiksel olarak 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulaması anlamlı olarak

farklı bulundu. Bu verilere göre kontrol grubuna göre artan kumarin konsantrasyonlarında MDA miktarlarının arttığı belirlendi.

Lipid peroksidasyonun (LPO) derecesi, hücresel düzeyde stresin sebep olduğu hasarın hem ölçütü hem de yansıması olduğu kabul edilmektedir ve hücre için çok tehlikelidir. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Bundan dolayıdır ki LPO ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkuş 1995). Lipid peroksidasyonu; hücre membran bütünlüğünün yok olmasına sebep olurken membran permeabilitesinin bozulmasına neden olur. Ca ve Na iyonlarının hücre içi ve dışı geçiş mekanizmalarının etkilenmesi sonucunda ATP tüketiminin değişmesine sebep olurken hücre enerji mekanizmasını etkileyebilir. Hücre içi kalsiyum iyonlarındaki artış; protein ve lipidlerde daha fazla zarara sebep olabilecek proteaz ve fosfolipaz gibi enzimlerin aktivasyonunu sağlar. Böylelikle DNA konformasyonunun bozulmasına ve hücre ölümüne neden olabilecek enzim inaktivasyonuna ya da aktivasyonuna neden olabilir.

Ahrabi ve diğ., (2011) yaptıkları çalışmada, kumarinin kanola üzerindeki biyokimyasal ve fizyolojik tepkilerini araştırmışlar. Kanola fidelerinin antioksidan kapasitesindeki artışa rağmen, kumarin varlığında lipid peroksidasyonunun arttığını açıklamışlar. Kumarin içeren yabancı otların yok edilmesinin, kanola üretimi için allelopatik açıdan çok önemli olduğu rapor edilmiştir.

5.3.5. Kumarinin hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarı üzerine olan etkisi

Oksidatif stres sürecinde oluşan reaktif oksijen türleri nükleik asitleri, proteinleri ve lipitleri oksitleyip konformasyonlarına zarar verebilir (Stadtman 2002). H₂O₂, aerobik organizmalarda süperoksitlerin, katalitik aktivitesi yüksek olan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenmesi sonucunda meydana gelir. Diğer ROS türlerine göre uzun bir yaşam döngüsüne (1 ms) sahip olan H₂O₂, orta derecede reaktif bir moleküldür (Bhattacharjee, 2005). H₂O₂ tiyol gruplarını okside ederek peroksizomlarda oksidatif hasara ve hücre ölümüne neden olur (Del Rio ve diğ., 2002). Ancak düşük seviyede üretildiklerinde programlı hücre ölümünde sinyal molekülleri olarak görev alırlar (Grant ve Loake, 2000; McDowell ve Dangl, 2000).

H₂O₂; senesens (Lisanti ve diğ., 2011), solunum ve fotosentez (Wang ve diğ., 2010;

Ren ve diğ., 2014), stoma hareketi (Hua ve diğ., 2012), hücre döngüsü (Livanos ve diğ., 2012), büyüme ve gelişme (Barba-Espin ve diğ., 2010) olmak üzere farklı fizyolojik süreçlerde anahtar rolü oynayan bir düzenleyici olarak görev yapar. Ayrıca bitkilerde; düşük konsantrasyonlarda, çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı koymada sinyal molekülü olarak görev yaparken (Foyer ve diğ., 1997; Rhee 1999; Jones ve Morice, 2000; Neill ve diğ., 2002; Rojkind ve diğ., 2002; Halliwell ve diğ., 2000) yüksek konsantrasyonda programlı hücre ölümüne neden olur (Quan ve diğ., 2008; Fedina ve diğ., 2009). H₂O₂'in tehlikeli oluşu, onun hücre membranından kolayca difüze olabilmesi ve OH• radikale dönüşmeye hazır olmasından kaynaklanır (Asad ve diğ., 2004). Bitkide lignin yapılıma süreci de H₂O₂ yapımını gerektirir (Özcan ve diğ., 2001).

Çalışmamızda kontrol grubu ve kumarin maddesi uygulanmış *L.culinaris* köklerinde 72. saat sonrasında oluşan H₂O₂ miktarları değerlendirildiğinde, kontrol grubunda 22,94 µM/g H₂O₂ miktarı belirlenirken, 300 ppm kumarin konsantrasyonunda (14,48 µM/g) azalma, 600 ppm kumarin konsantrasyonunda (40,15 µM/g) kontrole göre artan değerler tespit edildi. İstatiksel olarak özellikle 600 ppm kumarin uygulaması anlamlı olarak farklı bulundu.

Biyokimyasal streslerin belirlenmesinde hidrojen peroksitin bir sinyal molekül olarak kullanılması ve oksidatif stresler anında miktarının artması, bitkilerle ilgilenen bilim insanları için bitkilerde de bu molekülün stresin bir işareti olduğu düşüncesini öne çıkarmıştır. Ayrıca hidrojen peroksitin hücrelerde çabuk bir şekilde metabolize edilmesi ve dokulardaki gerçek seviyesinin ne olduğu ile ilgili belirsizlikler, strese verilen cevap mekanizmalarının anlaşılmasını zor hale getirmektedir. Bitki stres derecesinin belirlenmesinde biyolojik bir işaret olarak kullanılan bu bileşiklerin düşük miktarları, bitki savunma sisteminin aktifleştirilmesine pozitif bir etki göstermekteyken, antioksidan enzim aktivitelerinin yeterince aktifleştirilemediği veya yetersiz kaldığı durumlarda hücrede yüksek miktarlarda bulunduğu zaman dokularda oksidatif hasarlara sebep olduğu yukarıda verilen literatür taramalarında birçok araştırmacı tarafında rapor edilmiştir.

Bizim çalışmamızda mercimek bitkisine kumarin stresi uygulandığında, özellikle 600 ppm kumarin konsantrasyonunda kök dokusunda H₂O₂ içeriğinin önemli bir şekilde

arttığı gözlemlendi. 300ppm de hidrojen peroksit miktarının azalmasının sebebi olarak antioksidan sistemlerinin devreye girmiş olması sayılabılır. Ancak bu miktar arttıkça bitki stres ile başa çıkamayacak duruma gelmiş olabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir (Sigel ve Sigel 1999; Halliwell 2006). Bu görevi gerçekleştirmede katalaz önemli bir yer tutar. Hidrojen peroksidin proteinlerdeki demir grubu ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturması ve bunun sonucunda oluşan çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip demirin, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabildiği söylenebilir (Hajlaoui ve diğ., 2009). Bizim çalışmamızda da özellikle 600 ppm kumarin konsantrasyonunda MDA miktarının ve H_2O_2 miktarının doğrusal olarak artması literatür bilgilerini destekler niteliktedir. Ayrıca Saleh ve Kebeish (2017) yaptıkları çalışmada kumarin ve türevlerini hücre, doku ve organ seviyeleri üzerinde çeşitli fizyolojik etkileri olduğunu belirlemişlerdir. Buldukları sonuçlarda kumarin uygulamalarının α -amilaz üretimini süperoksit dismutaz, katalaz ve askorbat peroksidaz aktivitelerini inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Kumarin tarafından antioksidan enzimlerin azalarak düzenlenmesine hem H_2O_2 hem de malondialdehitin önemli birikimine sebep olmuştur. Ayrıca hücre yaşayabilirliğinde önemli bir düşüş ile sonuçlanmıştır. Bu sonuçlar ile kumarinin enzimatik antioksidan sistemin inaktive etmesiyle aleuron katmanlarındaki redoks dengesini bozabileceğini rapor etmişlerdir. Bu araştırmalarda bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

5.3.6. Kumarinin α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi

Amilaz tohum çimlenmesinde rol alan önemli enzimlerden biridir. Amilaz enzimi çimlenme sırasında aktif duruma geçerek, tohumun beslenmesi ve büyümesi için gerekli olan glukozu, tohumda depo halinde olan nişastayı parçalamak suretiyle elde eder (Bidwell, 1974). Bundan dolayı çimlenme sırasında önemli bir rol üstlenir. Yapılan birçok çalışmada amilaz aktivitesi üzerine çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi incelenmiştir (Jovanovic ve diğ., 1997; Yan ve diğ., 2004).

Dormant durumundaki tohumun çimlenmesini başlatan ana faktör tohuma su girişidir. Suyun embriyo hücresine girişi ile önceden inaktif durumdaki gibberellin hormonu aktif duruma gelir. Aktif hale gelen bu hormon pozitif geri besleme

mekanizmasıyla yeniden gibberellin sentezini uyarır. Aktif durumdaki gibberellinler embriyodan endosperme geçerler ve çeşitli depo maddelerini parçalayan hidrolitik enzimlerin sentezini uyarmak suretiyle etkili olurlar. Amilaz, lipaz, proteaz, nükleaz enzimleri nişasta, yağ, protein ve nükleik asitleri parçalayarak sitokin (CK), indol asetik asit (IAA) ve glikoz oluşum sürecini başlatırlar. Gibberellin tarafından aktif hale gelmiş enzimler hücre bölünmesini ve büyümesini teşvik ederek embriyonun büyümesini ve farklılaşmasını sağlarlar. Tohumun radikula kısmı kabuğu parçalayarak dışarı çıkar ve morfolojik anlamda çimlenme gerçekleşmiş olur (Kocaçalışkan, 2008).

Saleh ve Kebeish (2017) yaptıkları araştırmada kumarin ve türevlerinin buğday tohumlarının aleuron katmanlarında redoks homeostazına etkisini araştırmışlardır. Buldukları sonuçlarda kumarinin α -amilaz üretimini indüklediğini açıklamışlar ancak aktivitesi hakkında bir yorum yapmamışlardır. Bu sonuçlar ile kumarinin enzimatik antioksidan sistemini inaktive etmesiyle aleuron katmanlarındaki redoks dengesini bozabileceğini ve kumarinin gibberellin benzeri aktivite gösterebileceği belirtilmiş. Başka bir araştırmacı Abenovoli ve diğ. (2006) yaptıkları çalışmada kumarinin *Triticum turgidum* Desf. üzerinde tohumlarda çimlenmenin engellenmesine neden olan fizyolojik ve biyokimyasal değişimlere bakmışlardır. 200 μm 'nin üzerindeki konsantrasyonlarda, kumarinin tohum çimlenmesini konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe ettiğini, inhibisyonun tohumun su alması sırasında meydana geldiği, hızlı olduğunu ve geri döndürülemez şekilde meydana geldiğini belirtmişlerdir. Çimlenme evresi sırasında, kumarin maddesinin su alımını azalttığını açıklamışlardır. Ayrıca 1000 μm kumarin konsantrasyonunda alfa amilazın inhibe olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Khan (1969) da 340 μm kumarin konsantrasyonunda arpadaki alfa amilazın inhibe olduğunu açıklamıştır. Saleh ve Abu El-Soud (2015) kumarinin gibberellin gibi davranıp davranmayacağı hakkında veriler sunmuşlardır. Buldukları sonuçlar ile kumarin ile muamele edilmiş aleuron katmanı hücrelerinde amilaz sentezi ve sekresyonunun uyarılmasına neden olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte, buğday tohumlarının çimlenme yüzdesinin ve fide büyümesinin konsantrasyona bağlı olarak kumarin tarafından engellendiği açıklanmıştır. Bu, kumarinin gibberellin benzeri bir etkiye sahip olduğunu ve çimlenmenin ve fidan oluşumunu da etkilediğini açıklamışlar. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada

giberellik asidin *Allium cepa* gelişimi üzerindeki etkilerine bakılmış. Bu çalışmada artan giberellik asit konsantrasyonlarının *Allium cepa* köklerinin büyümelerini önemli oranda inhibe ettikleri ve anormal bölünen hücrelerde artış olduğu rapor edilmiş (Tütünoğlu, 2015).

Çalışmamızda kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarında 48 ve 72 saat sonrasında kalan nişasta konsantrasyonu miktarları değerlendirildiğinde, 300 ppm kumarin konsantrasyonunda kontrole göre bir değişiklik olmadığı belirlendi. 600 ppm kumarin konsantrasyonunda ise kontrole göre artan nişasta miktarı tespit edildi. 48. ve 72. saat kumarin uygulaması sonucunda veriler karşılaştırıldığında artan kumarin konsantrasyonunda ortamda kalan nişasta miktarının arttığı gözlemlendi. α -amilaz bitkilerdeki depo maddesi olan nişastayı glukoz monomerlerine çeviren bir enzim olarak görev yaptığı için ortamdaki nişasta konsantrasyonunun kontrol grubuna göre fazla olması α -amilaz enziminin inaktive haline gelmiş olabileceğini gösterir. 300 ppm de nişasta miktarının kontrol grubuna göre değişmemesi enzimin strese karşı koyduğu hakkında bilgi verebilir.

Kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* tohumlarındaki 48. ve 72. saat sonrasında α -amilaz aktivitesinin değerleri ortamda kalan nişasta konsantrasyonuna bağlı olarak azalma gösterdi. Buna göre 48. saat sonrasında kontrol grubunda α -amilaz aktivitesi 1.498 U/ml belirlenirken 300 ppm kumarin konsantrasyonunda 1.323 U/ml olarak belirlendi. 600 ppm kumarin konsantrasyonunda (995,9 U/ml) ise kontrole göre azalan değerler tespit edildi. 72 .saat sonrasında 48. saate göre benzer veriler elde edildi. Kontrol grubunda alfa amilaz aktivitesi 1.461 U/ml belirlenirken 300 ppm kumarin konsantrasyonunda (1.311 U/ml) ve 600 ppm kumarin konsantrasyonunda (934,81 U/ml) kontrole göre azalan değerler tespit edildi. İstatiksel olarak 48 ve 72 saatlik 600 ppm kumarin uygulaması anlamlı olarak farklı bulundu. α -amilaz aktivitesinin düşmesinin ortamdaki kumarin konsantrasyonu ile ters orantılı olması literatür bilgilerini desteklemektedir. α -amilaz aktivitesinin düşmesinin sebebi, enzimin moleküler konformasyonu bozulmasından ya da oluşan stresin sonucunda meydana gelen yan ürünlerden dolayı enzim inhibisyonu sonucunda gerçekleşmiş olabilir. Enzimin moleküler yapısı hakkında bilgi edinebilmek için proteomiks çalışmalarıyla desteklenebilir.

5.3.7. Kumarinin katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) aktivitesine etkisi

Katalaz enzimi ilk kez 1818'de Thenard tarafından gözlenmiş ve Loew tarafından (1901) bu enzime katalaz ismi verilmiştir. Enzimler içerisinde en yüksek turnover oranına sahip enzimlerden olan katalaz; peroksizomlarda, yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile oluşan, fotorespirasyon ve pürin katabolizmasında yer alan oksidaz enzimlerinin ürettiği H_2O_2 'yi ortadan kaldırmada görevli bir enzimdir (Gill ve Tuteja, 2010; Patykowski ve Urbanek, 2003). Bir molekül CAT, dakikada yaklaşık olarak 6 milyon H_2O_2 molekülünü H_2O ve O_2 'ye çevirme yeteneğine sahiptir (Dhindsa ve diğ., 1981; Scandalios 1994; Willekens ve diğ., 1997). Yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 'nin 2 elektronunu kullanarak H_2O ve O_2 indirgenmesini katalizleyen demir porfirin içeren tetramerik ve yüksek molekül ağırlığına sahip bir enzimdir (McClung 1997; Chaudiere ve Ferrari 1999; Scandalios ve diğ., 1997). Katalaz kararlı bir enzim değildir. Strese maruz kalan bitki hücrelerinde oluşan H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarıyla inhibe hale gelebilir. (Streb ve diğ., 1993). Katalazın büyük bir kısmı peroksizomlarda ve çok az bir miktar ise mitokondri matriksinde bulunur. H_2O_2 'ye olan zayıf afinitesi Katalaz'ın etkinliğini azaltmaktadır (Asada 1992; Scandalios 1993).

Stres koşulları altındaki bitkilerde askorbat peroksidaz, glutatyon redüktaz ve süperoksit dismutaz enzim aktivitelerindeki artışın aksine katalaz enzim aktivitesindeki azalma çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Tewari ve diğ., (2006), Esfandiari ve diğ., (2010) yaptıkları çalışmalarda stres koşullarında fotooksidatif zararlanma sonucunda fotosistem 2'de meydana gelen aksaklıklar sonucu katalaz enzim aktivitesinin azaldığını belirtmişlerdir. Enzim inhibisyonuna sebep olan aksaklıklar içinde uygulanan stres sonucu bir katalaz inhibitörünün oluşmasını, enzim sentezinin sekteye uğramasını ve enzim alt birimlerinin yapısal deformasyonunu rapor etmişlerdir (MacRae ve Ferguson, 1985). Ayrıca süperoksit dismutaz ve katalaz, biyomoleküllerle rastgele reaksiyona girebilen yüksek reaktif özellik gösteren OH^\cdot 'in etkisini azaltmak için birbirleriyle ortaklaşa çalışır. (Scandalios, 1997), *Helianthus annuus* L.'de (ayçiçeği), *Hordeum vulgare*'de (arpa) *Zea mays* L.'da (mısır) ve *Brassica oleracea* L.'de (karnıbahar) yapılan araştırmalarda katalaz enziminin çeşitli stres şartları altında bitkilerde değişik

seviyelerde koruma sağladığı rapor edilmiştir (Polle ve diğ., 1992; Azevedo ve diğ., 1998).

Abenovoli ve diğ. (2006) kumarinin *Triticum turgidum*'un 200 µM 'nin üzerindeki konsantrasyonlarda kumarinin peroksidazların aktifleşmesini geciktirdiği, süperoksit dismutaz aktivitesini arttırdığı, bazı enzimlerin (APX,CAT) aktivitelerini düşürdüğü ve salgı yollarında yer alan moleküler şaperonların transkripsiyonunu bastırdığını belirtmişlerdir. Kumarinin neden olduğu yetersiz su alımı reaktif O₂ türünün fazla üretilmesine sebep olduğu, bu durumun membran yapısını bozabileceği ve solunumu azaltabileceği rapor edilmiştir. Traykova ve Kostova (2005), Wu ve diğ. (2007) yaptıkları araştırmalarda ise kumarinlerin DNA onarımında, hasar görmüş SOD, CAT, GPx enzimlerinin aktivitelerinin düzenlenmesinde görev aldıkları belirtilmiştir. 2011 yılında yapılan başka bir çalışmada ise Ahrabi ve diğ., kumarin konsantrasyonları 0,05, 0.5, 5, 10 mM olarak kullanmışlar ve katalaz etkinliği önemli derecede değişmediğini rapor etmişlerdir. Bu sonuçlar ile bazı bitkilerin alleopatik potansiyelinin fenolik bileşikleriyle çevre ve ekosistem üzerinde daha az olumsuz etkiye sahip herbisitlerin gelişmesine neden olabileceğini belirtmişler. Saleh ve Kebeish (2017) yaptıkları araştırmada ise kumarin ve türevlerini hücre, doku ve organ seviyeleri üzerinde çeşitli fizyolojik etkileri olduğu göstermişlerdir. Bu çalışmada kumarinin hormon benzeri davranışlarla ilgili ve fitormonların aktivitesi ile olan etkileşimi hakkında araştırma yapmışlardır. Buldukları sonuçlarda hem kumarin hem de GA3 uygulamalarının α-amilaz üretimini indüklediğini, ancak süperoksit dismutaz, katalaz ve askorbat peroksidaz aktivitelerini inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Kumarin ve GA3 tarafından antioksidan enzimlerin azalması düzenlenmesi hem H₂O₂ hem de malondialdehitin önemli birikimine sebep olmuştur. Ayrıca hücre yaşayabilirliğinde önemli bir düşüş ile sonuçlanmıştır. Bu sonuçlar ile kumarinin enzimatik antioksidan sistemi inaktive etmesiyle aleuron katmanlarındaki redoks dengesini bozabileceğini rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada kontrol grubu ve kumarin uygulanmış *L.culinaris* köklerindeki 72.saat sonrasında oluşan katalaz enziminin aktivitesi belirlendi. 72 saatin sonunda örnekler arasında katalaz aktivitesinin farklılığı değerlendirildiğinde kontrol grubuna (5163,21 U/ml) göre 300 ppm kumarin uygulamasında (2998,15 U/ml) aktivitenin azaldığı 600 ppm kumarin uygulamasında (4878,28 U/ml) ise arttığı görüldü. İstatiksel olarak

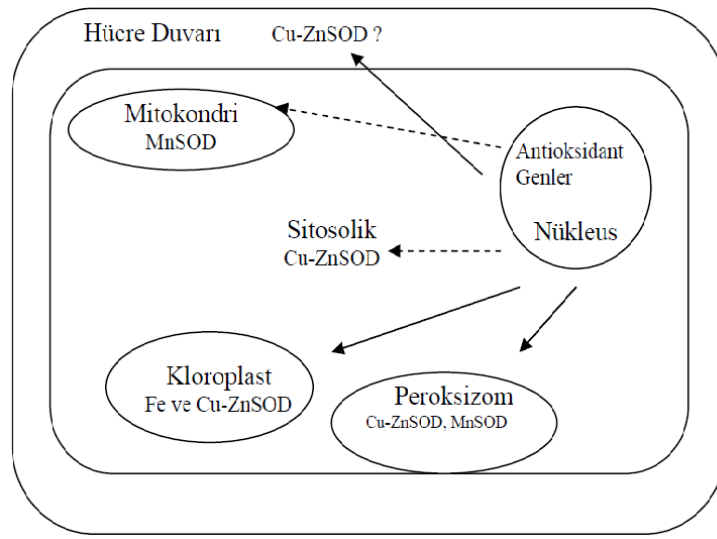
her iki ppm kumarin uygulanması anlamlı olarak farklı bulundu. Yukarıda verilen literatür bilgilerinden katalaz enziminin H_2O_2 oluşumunun arttığı durumlarda önemli etkinliğinin olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada, *L.culinaris* köklerindeki katalaz aktivitesinin özellikle 600 ppm kumarin uygulamasında yüksek olması hidrojen peroksit üretimindeki artış ile ilgili olduğu düşünülebilir. Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyonlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanır. Hidrojen peroksit miktarlarının da katalaz aktivitelerindeki artış ile paralellik göstermesi çıkan sonuçları desteklemektedir. Katalaz aktivitesindeki artma protein sentezinin aktive olmasından kaynaklanabileceği gibi, uygulanan stres sonucu artan hidrojen peroksit miktarı sonucunda meydana gelebileceği de söylenebilir. Katalaz aktivitesi enzimidaki aktivite ölçümleri Real Time PZR çalışmaları ile de desteklendi.

5.3.8. Kumarinin süperoksit dismutaz (SOD; EC.1.15.1.1) aktivitesine etkisi

Katalazlar ve peroksidazlar hidrojen peroksiti etkili bir şekilde taşıırken (Scandalios, 1994); süperoksit dismutazlar ise süperoksit anyonunu uzaklaştırırlar (Scandalios, 1993). Bu enzimler arasında en etkili çalışanlar katalazlar ve süperoksit dismutazlardır. Bu iki enzim birlikte potansiyel olarak tehlikeli olan O_2^- ve H_2O_2 ' i su ve moleküler oksijene çevirir. Metalloenzim süperoksit dismutaz, en etkili hücre içi enzimatik antioksidanlardan biridir. Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı ilk savunma mekanizması olarak görev aldığı düşünülmektedir. SOD enzimi, O_2^- molekülünün dismutasyonunu (kimyasal bir reaksiyon sonucu aynı maddeden, yapı olarak iki farklı ürünün meydana gelmesi olayı) katalizleyerek H_2O_2 ve O_2 oluşumunu sağlar böylelikle O_2^- molekülünü ortadan kaldırarak OH^- üretiminin oluşumunu azaltır (Gill ve Tuteja, 2010; Türkan, 2002). Oldukça reaktif olan süperoksit anyonu lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin oksidasyonuna da neden olur. Süperoksit anyonunun, membran hasarına, hücrel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırıklarına, lipid peroksidasyonuna, sebep olduğu bazı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Fridovich, 1995; Desikan ve diğ., 2005; Asada, 2006).

Süperoksit dismutaz enzimi aerobik olan tüm organizmalarda bulunmaktadır ve genelde aktif oksijen oluşturan hücre kısımlarında görev alır. Özellikle, O_2 aktivasyonunun gerçekleştiği yerler olan mitokondriler, kloroplastlar, mikrozomlar,

gliksizomlar, peroksizomlar, apoplast ve sitosol aynı zamanda hücrede $O_2^{\cdot-}$ oluşumunu gerçekleştirdiği organellerdir. Süperoksit dismutaz enzimi, metal kofaktörlerine göre 3 tipe ayrılır: Cu/Zn-SOD (bakır/çinko-SOD), Mn-SOD (mangan-SOD) ve Fe-SOD (demir-SOD). (Cu/Zn-SOD izoenzimleri; sitozolde ve bitkilerde kloroplastlarda (del Rio ve diğ., 2002) ,Mn-SOD; ökaryotik hücrelerin mitokondri ve peroksizomlarında (del Rio ve diğ., 2003), Fe-SOD; izoenzimleri ise kloroplastlarda az miktarlarda bulunurlar (Alscher ve diğ., 2002; Ferreira ve diğ., 2002) (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Bitki hücresinde SOD yerleşimleri (Alscher, 2002)

MnSOD'lar aktif bölgelerinde bulunan Mn atomu ile aktif hale gelir. (Bowler ve diğ., 1994). Fe ve MnSOD'lar birbirine çok benzerken Cu-ZnSOD'lar elektriksel özellik bakımından farklıdır. Cu-ZnSOD'lar bir hücrede reaktif oksijen türlerine (ROT) karşı savunmanın ilk hattını meydana getirirler.

Yapılan araştırmalarda; süperoksit dismutaz enzimlerinin gen ekspresyonundaki artışın biyotik ve abiyotik strese bağlı olarak meydana çıkan reaktif oksijen türlerine karşı koymada, stresle başa çıkmada ve bitkilerin stres koşulları altında canlılığı sürdürmesine katkı sağlamada önemli görevleri olduğu belirtilmiştir. *Morus alba*, *Cicer arietinum* ve *L. esculentum* gibi birçok bitki çeşidinde farklı stres koşulları altında süperoksit dismutaz enzim aktivitesinde artışlar meydana geldiği belirtilmiştir (Harinasut ve diğ., 2003; Gapinska ve diğ., 2008). Abenovoli ve diğ. (2006)

yaptıkları çalışmada kumarin maddesinin *Triticum turgidum*'da süperoksit dismutaz aktivitesini arttırdığını, Saleh ve Kebeish (2017) ise kumarin ve türevlerinin buğday tohumlarında süperoksit dismutaz, katalaz ve askorbat peroksidaz aktivitelerini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda 72 saatin sonunda örnekler arasında SOD aktivitesinin farklılığı değerlendirildiğinde kontrol grubuna (0,51 U/mg) göre 300 ppm kumarin uygulamasında (0,40 U/mg) ve 600 ppm kumarin uygulamasında (0,13 U/mg) SOD aktivitesinin düştüğü belirlendi. İstatiksel olarak her iki uygulanmada kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak farklı bulundu.

Bitkiler oksidatif stres koşulları altında yaşamlarını sürdürebilmek ve stresle başa çıkabilmek için reaktif oksijen türlerinin kontrolünü ve detoksifikasyonunu sağlayan antioksidatif savunma sistemlerini devreye sokmak zorundadırlar. Antioksidatif savunma sistemleri çalışmadığı ya da yeterli olmadığı zaman bitki hücrelerinde ölüm gerçekleşir. Elektron taşıma zincirinin bulunduğu herhangi bir yerde üretilen $O_2^{\cdot-}$ ve hidroksil radikali enzimlere ve lipitlere hasar vermektedir. Reaktif oksijen, fotosistem I'de (PSI) oluşur ve fotosistem I'in fotoinhibisyonuna sebep olur (Tjus ve diğ., 2001). Oluşan bu ROS'lar süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesiyle H_2O_2 'ye dönüştürülürler. Oluşan H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ molekülleri yayılıp fotosistem II'yi (PSII) inaktif duruma getirebilir. Buradan yola çıkarak, H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ oluşumu birlikte PSII'nin ve PSI'in hasar görmesine neden olabilir. Bu enzimler serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hücresel yapılara zarar vermesini sınırlandırmak suretiyle bir hücresel bölgeden diğerine geçişini de önleyebilirler. Hem toplam SOD miktarında hem de CAT aktivitesinde gözlenen anlamlı antioksidatif yanıtlar ise, bu yolun tolerans mekanizmasında işlevsel olabileceğini göstermektedir. SOD aktivitesinin azalması bu enzimin kumarine karşı yeteri kadar sert olmadığına bir kanıtı olabilir ya da enzim sentez yollarında kumarin maddesi hasarlara sebep olmuş olabilir. SOD aktivitesinin azalması hücrede $O_2^{\cdot-}$ radikalinin oluşumunun arttığının bir göstergesi olmakla birlikte OH^{\cdot} miktarının da arttığının bir kanıtı olarak kabul edilebilir. SOD enzimidaki aktivite azalması Real Time PZR çalışmaları ile de desteklendi.

5.4. Moleküler Analizler

5.4.1. Kumarinin RAPD PZR analizlerine olan etkisi

DNA ile etkileşen maddeler elektrofilik özellikte olup genotoksik maddeler (genotoksinler) ismini alır. Genotoksik maddeler DNA veya genetik ekspresyonu geri dönüşümsüz olarak değiştirerek kalıtsal bir değişime yol açabilirler. Bu nedenle genotoksinler aynı zamanda mutajenik maddeler olarak tanımlanmıştır (Vural, 2000). Organizmalara zarar verebilecek birçok toksik maddenin etkisini tam olarak ortaya çıkarabilmek için organizmanın farklı seviyelerinde (moleküler ve popülasyon seviyesi) veri toplama genotoksisiteyi anlamada önemlidir (Xue-mei et al. 2006). Son zamanlarda, hücresel ya da moleküler düzeyde çok sayıda biomarker geliştirildi. Bunlardan biri Williams ve diğ. (1990) ve Welsh ve McClelland tarafından 1990 yılında geliştirilen RAPD PZR tekniğidir. Uygun şekilde optimizasyonu sağlandıktan sonra gerçekçi, hassas ve üretken bir test olan rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) yöntemi geniş aralıkta DNA hasarları ve mutasyonları (nokta mutasyonları, kromozomal düzenlemeler vb.) belirlemede kullanılır. Bu nedenle RAPD PZR tekniği genotoksisite ve karsinogenez çalışmalarında oldukça popülerdir (Atienzar ve Jha, 2006). PZR metoduna dayalı olan bu teknikte, rastgele dizilimdeki kısa oligonükleotit primerleri kullanılarak genomik DNA üzerinde belirlenen parçacıklar çoğaltılmakta olup reaksiyonun gerçekleşmesi için araştırılan genomun baz dizilimi hakkında herhangi bir ön bilgiye ihtiyaç yoktur. Primerler tasarlanırken GC/AT miktarlarının %50 ya da daha büyük olması önemlidir. Mutasyonlar, kromozomal tekrar düzenlenmeleri, delesyonlar, eklenmeler ya da inversiyonlar primer bağlanmasını etkilerler. Bu faktörlerden yola çıkarak agaroz jelde molekül büyüklüklerine göre dizilen ve bantlaşma gösteren DNA parçacıkları değerlendirilerek DNA üzerindeki genetik polimorfizm belirlenebilir. DNA kopya sayısı farklılıkları, heterozigotluk, birlikte göç ya da PZR ürünleri arasındaki yarış gibi pek çok faktörler de RAPD bantlarının yoğunluğunu etkileyebilir. Bu yüzden iyi çözünmüş yüksek yoğunluktaki bantların değerlendirmede kullanılması gerektiği bazı araştırmacılar tarafından tavsiye edilmektedir (Wolf, 2004). RAPD profillerinde yeni DNA bantlarının oluşması, kontrol grubu RAPD profillerinde mevcut olan DNA bantlarının kaybolması ve RAPD profillerinin görünüşündeki değişiklikler DNA hasarı ve mutasyonal olaylar tarafından oluşturulabilir (Atienzar ve diğ., 1999; Liu

ve diğ., 2007). RAPD PZR çalışmalarında kontrol grubuna göre kaybolan veya yeni oluşan DNA bantlarının dizi analizi ile bölgeler hakkında daha detaylı moleküler bilgileri elde edilebilir. Ayrıca fizyolojik ve biyokimyasal veriler, kontrol grubuna göre meydana gelen değişim oranları ile RAPD profillerinde meydana gelen değişimler karşılaştırılarak toksik ajanların biyolojik organizmalar üzerindeki etkileri daha detaylı bir şekilde değerlendirilebilir (Atienzar ve diğ., 1999; Cenkci ve diğ., 2010). Genotoksisite sonuçları uygulama yapılmış ve yapılmamış örneklerin kalitatif ve kantitatif değerlendirilmesi ile ortaya çıkarılabilir. Çoğalmış PZR bant yoğunluklarının azalması veya artması, kaybolan ve yeni ortaya çıkan PZR bantların değerlendirmesi ve popülasyonun genel yapısı hakkında analiz yapma, RAPD gibi moleküler sistematik çalışmalarında önemli parametrelerdir.

Çalışmamızda uygulama yapılmış ve yapılmamış çimlenmiş mercimek tohumlarının kök uçlarından genomik DNA elde edildikten sonra bunların saflık profilleri belirlendi. Nanodrop verileri ve agaroz jel görüntüleri değerlendirildi, kontrol ve kumarin uygulaması yapılan gruplara ait DNA'ların RAPD-PZR uygulamaları için yeterli miktar ve saflıkta olduğuna karar verildi.

Hoagland çözeltilisi uygulanmış numunelerin RAPD profilleri ile kumarin uygulanmış olan tohumların köklerinde oluşan DNA hasarı ve/veya mutasyonlar, RAPD profillerinde normal DNA bantlarının kaybolması ve/veya yeni DNA bantlarının ortaya çıkması şeklinde belirlendi. Burdan yola çıkılarak analizler sonucunda kontrol grubuna göre 300 ppm kumarin ve 600 ppm kumarin uygulaması için toplam 2 adet monomorfik ve 8 adet polimorfik bant profili gösteren primer olduğu belirlendi. Değerlendirmeye alınan 10 RAPD primerinin her birinin ayrı ayrı polimorfizm ve monomorfizm yüzdelerine bakıldığında polimorfizm ve monomorfizm yüzdeleri sırasıyla %48,75 ve %51,25 olarak belirlendi. Toplamda elde edilen 97 DNA bandının 41 tanesi monomorfik bant, geriye kalan 39 tanesi ise polimorfik DNA bandıdır. RAPD bantlarındaki polimorfizmin sebebi nokta mutasyonlar, genetik ve kromozomal yeniden düzenlenmeler, delesyon ve insersiyon gibi genomik DNA zinciri hasarlarının bir göstergesi olarak açıklanabilir (Atienzar ve diğ., 2002; Wolf ve diğ., 2004). RAPD profilleri, uygulama yapılmamış kontrol ve uygulama yapılmış *L.culinaris* kökleri arasında çoğaltılmış DNA bantlarının sayı ve büyüklüklerinde belirgin farklılıklar gösterdi. Yeni DNA bantlarının moleküler

ebatları 187 (primer OPA03) ile 1484 (primer OPA02) baz çifti aralığında değişti. Yeni bantların %85'i 1000 baz çiftinden küçüktür. Uygulama grupları arasında en fazla yeni DNA bandı 600 ppm ($2 \times EC_{50}$) uygulamasında belirlendi. Yeni DNA bantlarının toplam sayısının kumarin konsantrasyonlarındaki artış ile belirgin bir şekilde arttığı tespit edildi. Uygulama grupları arasında en fazla RAPD bandı kaybı (16 bant) 300 ppm kumarin uygulamasında belirlendi. Bantların kaybolması genomik DNA'da kumarince oluşturulmuş olan DNA hasarları (tek iplik kırıkları, çift iplik kırıkları, modifiye bazlar, bazsız yerler, okside bazlar, DNA köprüleri, DNA-protein çapraz bağları), veya nokta ve/veya büyük kromozomal düzenlemeleri içine alan mutasyonlardan kaynaklanmış olabilir (Atienzar ve diğ., 1999). PZR reaksiyonu sırasında, genomik DNA'nın hasarlı bölgelerine primer bağlanması gerçekleşmemiş veya hasarlı kalıp DNA bölgesi ile karşılaşmış Taq DNA polimeraz enziminin reaksiyonu inhibisyonu sonucunda bant kaybı gerçekleşmiş olabilir (Atienzar ve Jha 2006). Yeni bant oluşumları en fazla (10 bant) 600 ppm kumarin uygulamasında belirlendi. Yeni RAPD PZR bantlarının oluşması nokta mutasyonuyla yeni primer bağlanma yerlerinin oluşması veya iki primer bağlanma yerini yakınlılaştırıran ya da uzaklaştıran homolog rekombinasyonlar ve/veya delesyon/insersiyonların varlığında oluştuğu söylenebilir (Atienzar ve diğ., 1999; Atienzar ve Jha, 2006).

Çalışmamızda, genotoksisitenin RAPD ile belirlenmesinin yanı sıra uygulama gruplarının kontrolden genetik olarak ne kadar uzaklaştığının analizi de yapıldı. RAPD gibi moleküler markörlerin nümerik analiz yöntemi kullanılarak genomik DNA'lar için oluşturulan dendrogram (genetik ilişkinin ağaçlandırılarak gösterilmesi), moleküler bitki sistematiğinde yani türler arası, tür içi veya popülasyonlar içi ve arası değerlendirilmesinde etkin bir yöntemdir (Zhiyi ve Haowen, 2004). PAST programı kullanılarak tüm uygulama grupları arasındaki genetik benzerlik katsayılarına bakıldığında; kontrol grubuna göre 300 ppm kumarin uygulanması genetik olarak 0,48 yakınlık gösterirken $2 \times EC_{50}$ değeri olan 600ppm 0,59 yakınlık gösterdi. Kumarin konsantrasyonundaki artış kontrol grubuna göre genetik mesafede artmaya sebep olduğu belirlendi. Araştırmamızda genetik benzerlik katsayıları 1.00'dan düşük çıktı. Bu, uygulama gruplarındaki bitkilerin DNA'larındaki hasarın bir göstergesidir. Hesaplanan genetik benzerlik katsayılarına ve kumarin konsantrasyonlarına göre DNA tahribatının seviyesinde de artış

belirlendi. PAST analizi sonucuna göre çizilen dendrogramda uygulama yapılmış ve yapılmamış kökler iki ana küme oluşturdu. 600 ppm kumarin uygulaması ve kontrol grubu aynı dallanmada yer alırken 300 ppm kumarin uygulaması ayrı dallanma gösterdi. Genetik benzerlik katsayılarının kullanılmasıyla oluşturulmuş olan UPGMA dendrogramında uygulama grupları arasındaki rakamsal ilişki şekil olarak da gösterildi. 300 ppm kumarin uygulaması kontrol grubundan en uzakta kümelendi.

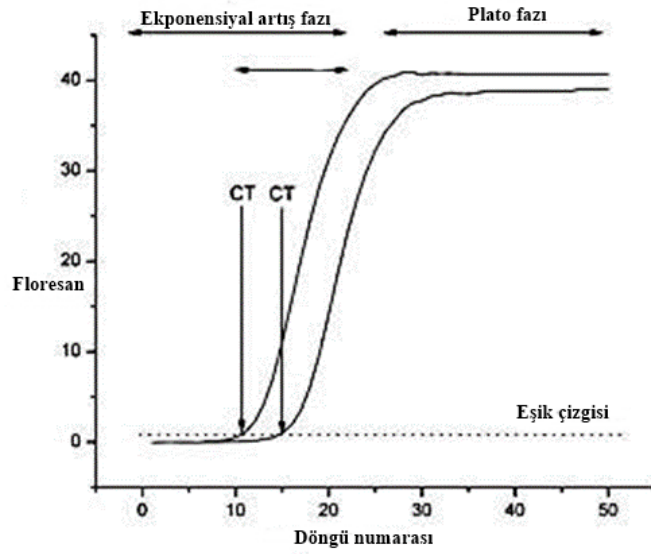
Toksik ajanların etkisi altında kalan örneklerin kontrol grubuna göre RAPD profillerindeki değişiklikler her bir primer için genomik kalıp kararlılık yüzdesi (Genomik Kalıp Kararlılığı; GKK %) olarak saptanır (Atienzar ve diğ., 1999). Toksik maddelere maruz bırakılarak RAPD profillerindeki değişikliklerin uyarılması, genomik kalıp kararlılığı ile ilişkilidir. RAPD profillerinde belirlenen değişikliklerin nitel bir değerlendirmesini gösteren genomik kalıp DNA kararlılığı (GKK,%) değerleri 8 primer için hesaplandı. GKK değerlerindeki azalma 600 ppm uygulamasında %45.8 iken 300 ppm uygulamasında %48,5 olarak belirlendi. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verilere göre; artan kumarin konsantrasyonlarında genomik kalıp kararlılığında düşüş gözlemlendi. GKK değerlerinin artan doza bağlı olarak kontrol grubundan uzaklaşması, uygulanan (EC50 ve 2xEC50) kumarin dozlarının mutasyonlara neden olduğu görüşü ile açıklanabilir. Genomik kalıp kararlılığı, DNA hasar seviyesi, replikasyon ve onarım etkinliği ile ilgilidir. RAPD profillerinden hareketle GKK oranındaki azalmanın ise DNA hasar seviyesi, DNA replikasyonu ve tamir mekanizmalarındaki aksaklıklar ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Atienzar ve diğ., 1999; Liu ve diğ., 2005; Cenkçi ve diğ., 2010). Genomik kararsızlık strese bağlı olarak artan reaktif oksijen türlerinin, nokta mutasyonları, genetik ve kromozomal düzenlenmeler, delesyon ve insersiyon gibi genomik DNA hasarları oluşturmasına bağlanabilir. GKK yüzdeleri ile fide kök uzunlukları, protein içerikleri, pigment içerikleri gibi klasik fizyolojik ve biyokimyasal verilerin kontrol gruplarına göre değişim yüzdeleri karşılaştırılarak toksik maddelerin organizma üzerindeki etkileri yaygın olarak kıyaslanabilir (Atienzar ve diğ.,1999; Liu ve diğ.,2005; Cenkçi ve diğ., 2010).

RAPD tekniği bu çalışmada kumarin stresine maruz bırakılmış organizmaların DNA değişikliklerinin belirlenmesi için güvenilir sonuçlar üretmiş olsa da, ileriki deneylerle bunun geçerliliğinin kanıtlanması gerekmektedir. Genotoksik ajanların

genotoksik etkilerini birden fazla genotoksisite testi ile aynı anda çalışmanın bu ajanların etkisini tam olarak belirlemede daha faydalı olacağı düşüncesindeyiz. Bu çalışmada kumarin konsantrasyonlarının arttırılması ile DNA bant profillerindeki değişiklikler artmış olmakla birlikte bu değişikliklerin mutasyonlara dönüşüp dönüşmediği hakkında bir bilgi sahibi değiliz. RAPD PZR tekniğinin DNA hasarı ve mutasyonları ne kadar etkin bir şekilde belirlediğinden emin olmak için RAPD PZR sonuçlarının, DNA iplik kırıklarını ve kromozom aberasyonlarını belirleyen bazı DNA analiz metotları ile desteklenmesi gerektiği düşüncesindeyiz. Ayrıca RAPD PZR profillerinde kaybolan veya yeni ortaya çıkan DNA bantlarının dizi analizi bilgilerinin elde edilmesi RAPD PZR sonuçlarını daha güvenilir hale getirecektir. Sonuç olarak, RAPD PZR analizi ile tespit edilen DNA polimorfizmi çevresel kirleticilerin oluşturduğu toksik etkiler için uygun ve yararlı bir biyomarkör olarak kullanılabilmesi düşüncesindeyiz.

5.4.2. *L.culinaris*'de Real Time PZR analizleri ile kumarinin etkisinin belirlenmesi

Real Time PZR uygulamalarında, meydana gelen ürün miktarını yansıtan floresans sinyal oluşturulur. Real Time PZR uygulamaları sonucunda meydana gelen kısa sekanslar amplicon olarak tanımlanır. Başlangıç döngülerinde kantitatif Real Time PZR'da sinyal zayıf iken sinyalin güçlenmesi ampliconların miktarlarının artışı ile meydana gelir. Sinyalin eşik seviyeye gelmesi için gereken döngü sayısı Ct (threshold cycle = eşik değer döngü) ya da Cq değeri olarak tanımlanır. Amplifikasyon cevap eğrileri Ct ya da Cq değeri aşıldıktan sonra logaritmik olarak yükselir (Kubista ve diğ., 2006) (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. Real Time PZR cevap egrileri (Kubista ve diğ., 2006)

DNA materyalinin amplifikasyonu ile floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede, nitel olarak sonuç alınır. SYBR Green I isimli boya yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlanır. Oluşan amplifikasyona bağlı DNA artışı ile ortaya çıkan floresans değeri ölçülür. İlgili primerlerin cDNA'ya bağlanmasıyla gerçekleşen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan SYBR Green miktarı yükselmekte ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. SYBR Green I ortamda hedef genler olmadığında, primerlerin kendi aralarında oluşabilecek olan bağlanmalar sonucunda spesifik olmayan amplifikasyon gösterebilir. Bu istenmeyen sonucu engellemek için amplifikasyon ürünlerinin erime eğrisi analizi yapılır. Ayrıca erime eğrisinden yararlanılarak amplikonun Tm derecesi (Primerlerin ayrılmış DNA zincirleri üzerinde komplementer oldukları bölgelere eşleşip kalıp DNA zinciri ile primer arasında hidrojen bağlarının oluşmasının sağlanacağı bir sıcaklık derecesidir.) belirlenebilir (Kubista ve diğ., 2006). Toksik kimyasallar genomun bütünlüğüne zarar verirken DNA'nın ifadesini doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyebilir. Uzun dönemli etkileşim sonucu ise maruz bırakılan organizmaların genetik materyalinde bir değişikliğe sebep olabilir (Zhiyi ve Haowen, 2004).

Çalışmamızda, hedef genler olan CAT, Cu/Zn SOD ve Mn SOD genlerinin *L.culinaris* kök dokularında kumarin stresi altında ekspresyon miktarları Real-Time PZR yöntemiyle SYBR Green I boyası kullanılarak araştırıldı. Kontrol ve

housekeeping gene göre gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde *L.culinaris* kök dokularında çalışılan genlerin ifadesinde kontrole göre farklılıklar meydana geldiği görüldü.

Çalışmamızda kontrol grubu olarak Hoagland çözeltilisinde, 300 ppm kumarin ve 600 ppm kumarin çözeltilisinde 72 saat süre ile çimlendirilen *L.culinaris* bitkisinin köklerinden alınan örneklerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Real Time PZR işlemi sonrasında her üç gen için de farklı kumarin konsantrasyonlarındaki örneklerde polimeraz zincir reaksiyonu eş zamanlı olarak izlendi ve pik profili olarak kaydedildi. Ct (Cycle Treshold) değerleri pik profilleri aracılığı ile belirlendi.

Sonuçlara bakıldığında kontrol grubuna göre CAT geninin ifade düzeyi 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulamalarının ortalama Cq değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlı bulunurken REST programı ile elde edilen sonuçlara ait CAT geninin ifade düzeyi kontrole göre hem 300 ppm kumarin uygulanmasında hem de 600 ppm kumarin uygulanmasında ise azaldı.

Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyi kontrol grubuna göre 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulamalarının ortalama Cq değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlı bulundu ve REST programı ile elde edilen ait Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyi Kontrole göre hem 300 ppm kumarin uygulanmasında hemde ,600 ppm kumarin uygulanmasında ise azaldığı belirlendi.

Mn-SOD geninin ifade düzeyi kontrol grubuna göre 300 ppm ve 600 ppm kumarin uygulamalarının ortalama Cq değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlı bulunurken REST programı ile elde edilen ait Mn-SOD geninin ifade düzeyi kontrole göre 300 ppm kumarin uygulanmasında 1,928 kat artarken, 600 ppm kumarin uygulanmasında ise -3,673 kat azalttığı belirlendi.

İlgilenilen hedef genlerin stres koşulları altındaki davranışlarının Real-Time PZR yöntemiyle takip edilmesi genlerin fonksiyonlarının belirlenmesine ve stresle ilişkili olan genlerin tanımlanmasına imkan sağlar (Wu ve diğ., 2004). Strese karşı genlerin anlatımlarının artırılması ya da azaltılması moleküler düzeyde gerçekleşen mekanizmalardır. Farklı bitki türlerinden abiyotik stresle ilişkili birçok gen ve

transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır (Agarwal ve diğ., 2012; Shinozaki ve Yamaguchi- Shinozaki, 2000; Chinnusamy ve diğ., 2003). Toksik maddelerin genetik materyal ile etkileşimi ve bunun sonucunda meydana gelen mutasyon çeşitleri, kromozom mutasyonları ve gen mutasyonları gen ifadelerinde değişikliklere sebep olmuş olabilir. Abiyotik stresle ilişkili birçok gen ve transkripsiyon faktörü strese toleransta görevli genlerin anlatımlarını düzenler ve başka transkripsiyon faktörlerin anlatımlarını sağlayabilirler. Bitkiler gibi hareket edemeyen organizmalar için çevreden gelen sinyallerin algılanması ve bu sinyallerin hücreye aktarılması gen anlatımlarının yapılması ya da genlerin susturulması çok önemlidir. Genin baz dizisindeki bir değişim o gen tarafından kodlanmış olan üründe de değişime sebep olmuş olabilir ya da ilgili genin anlatımını durdurmuş olabilir. Böyle mutant bir genin mutant enzimi, aminoasit dizisindeki meydana gelen değişme sebebiyle inaktif ya da daha az aktif olabilir. Eğer hücre mutasyon sonucu ihtiyaç duyduğu bir fenotipik özelliği yitirirse genotipikteki bu değişiklik zararlı ya da öldürücü olabilir.

Çalışmamızda seçilen genlerin anlatımları ve bu genlerin ürünleri olan enzimlerin aktivitelerinin değişimleri paralel sonuçlar verdi. Ancak SOD enzimini 3 izozimi olmasıyla sebebiyle Fe SOD geninin anlatım çalışmalarının yapılması ile bu genin anlatım profili desteklenebilir. Ayrıca Western blot analizleri ile süperoksit dismutaz izozimlerinin hangisinin özellikle anlatımının düştüğü belirlenebilir. Literatür araştırmalarında kumarinin *L.culinaris* ya da başka bir bitki üzerindeki etkisini gösteren Real Time PZR ile yapılan herhangi bir moleküler çalışmaya rastlanmadı. Bu açıdan çalışmamız *L.culinaris* kökleri üzerine kumarin stresi ile ilgili Real Time PZR tekniği ile yapılan ilk çalışma olma özelliği göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sitotoksik ve genotoksik çalışmalarda çevresel kirleticilerin etkilerinin belirlenmesinde bitkiler oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bitkiler gibi ökaryotik canlılardan elde edilen veriler bu kirleticilerin özellikle insanlar için de çeşitli olumsuz etkilere neden olup olmadığının anlaşılması bakımından oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında, alleopatik potansiyele sahip kumarin maddesinin *L.culinaris* üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve biyokimyasal etkilerinin belirlenmesi ile elde edilen verilere göre literatürde bu konu ile ilgili eksikliğin belirli bir dereceye kadar kapatılmasında, bazı açık kalmış noktaların aydınlatılmasında ve bitki fizyolojisi ile çalışan araştırmacıları katkı sağlayacağı ümit edilmektedir. Model canlı olarak ökaryotik bitkilerin seçilmesi, toksik dozların miktarını belirlemenin yanı sıra, sitotoksisite, genotoksisite ve çeşitli fizyolojik parametrelerin ölçülmesini kolaylaştırdı.

Çalışmamızı genel olarak ele alacak olursak; bulgularımız kumarin maddesinin *L.culinaris* bitkisinin vejetatif büyümesi üzerinde inhibisyon oluşturmuş olabileceği düşüncesindeyiz. Bu hipotez hem literatür taramalarıyla hem de bizim verilerimiz ile desteklenmektedir. Probit analizi ile elde edilen EC50 kumarin konsantrasyon değerinde bitkinin köklerinde büyüme azalışı kendini göstermektedir. Kontrole göre kök uzunluklarındaki azalışa genel anlamda bakıldığında, kumarinin sebep olduğu stres ile büyümede bir inhibisyondan bahsedilebilir. Mitotik indeksdeki azalışlar, anormal bölünen hücrelerin sayılarının artması ve kromozom anormalliklerinde görülen artışlar; hücre bölünmesindeki kontrol noktalarını düzenleyen genleri veya gen ürünlerini etkilemesinden, enerji yolağının, protein, RNA ve DNA sentezlerinin inhibe olmasından, mikrotübül organizasyonunun değişmesinden ve iğ ipliklerinin oluşumunu sağlayan temel proteinlerin sentez mekanizmasının etkilemesi sonucunda oluşabildiği tartışma kısmında belirtildi. Bu sonuçlardan yola çıkarak kumarinin sitotoksik bir ajan gibi davrandığını söyleyebiliriz. Biyokimyasal analiz sonuçları, kumarinin bitkide hidrojen peroksit miktarlarının artmasına sebep olarak oksidatif stres oluşturması MDA miktarı, antioksidan enzim aktivite ölçümleri gibi diğer

sonuçlarla uyum içindedir. Örneklerin çözünür protein konsantrasyonları ile SDS-PAGE profilleri de artan kumarin konsantrasyonlarının bitkide stres oluşturduğu ve buna bağlı olarak meydana gelen fizyolojik, biyokimyasal ve genetiksel değişimlerin olduğu düşüncesindeyiz. Kumarin uygulaması ile toplam protein seviyesinde belirlenen artış sentezlenen stres proteinleri ile açıklanabilir. Çeşitli detoksifikasyon enzimlerinin ve ara metabolitlerin protein yapıda olması bu artışta etkili olmuş olabilir. Çalışmalarımızın sonucundaki prolin miktarındaki anlamlı artışlar ile birlikte MDA'nın orantılı artışı oksidatif stresi ve toksisite sonucu membranlarda lipit peroksidasyonunu göstermektedir. Prolin miktarındaki artış bitkinin adaptasyonunda oksijen radikallerinden oluşan zarara karşı bir korumaya neden olmaktadır. Prolin miktarındaki artışın başka bir sebebi, stres altındaki bitkide, serbest oksijen radikallerinin detoksifikasyonuna katılması ve stres koşullarına toleransda önemli rol oynayan koruyucu özelliğe sahip azot içeren bir aminoasit olması olabilir. Lipit peroksidasyonu diğer stres çeşitleri etkisiyle de görülen bir olgu olup membran bütünlüğünün bozulması ve hücrenin hasar görmesi durumunda meydana gelmektedir. Pek çok bilimsel araştırma lipit peroksidasyonu ile bitkinin stres karşısında savunma yanıtı olarak kullandığı antioksidatif sistemlerinin mekanizmalarını araştırmıştır. Çalışmamız da bu konuyu ele alması bakımından değerlendirildiğinde, biyokimyasal analizlerde yapılan çalışmalarla öngörülen amaçlarına ulaştığını düşünmekteyiz. Kumarin uygulanmış mercimek bitkilerinde antioksidatif enzimlere ve MDA miktarına bakılırsa, bitkiler oksidatif strese girmişlerdir. Kumarin membran lipitlerinin oksidasyonuna sebep olmuş ve hücrede hasar meydana getirmiştir. Araştırmacılar çeşitli stres türleri altındaki bitkilerin fotosentez oranında azalma meydana geldiğini PSII de meydana gelen hasarlar sebebiyle MDA miktarında artış olduğunu bildirmişler. Bu tarz çalışmaların daha geniş kapsamlı farklı konsantrasyonları kapsayan ve daha uzun süreli olarak gerçekleştirildiğinde daha net çözümler için faydalı olacağını belirtebiliriz. Alfa amilaz gibi çimlenme aşamasında önemli göreve sahip bir enzimin kumarin uygulanması sonucunda aktivitesinde meydana gelen azalma, artan kumarin konsantrasyonu ile çimlenme miktarlarında meydana gelen azalmalar ile paralellik göstermektedir. Bu sonuçlar birbirini destekler niteliktedir. Bitkinin strese karşı kullandığı antioksidatif sistemin enzimlerinden olan CAT ve SOD'un belirli savunma görevlerinde işbirliği içinde çalıştığı sonuçlarımızda belirtildi. Kumarin

uygulamasý ile CAT ve SOD aktivitelerinde gözlenen azalma kumarin uygulamasý ile bitkideki reaktif oksijen ürünlerinin arttığı ve bitkinin bu strese karşı koymak için antioksidatif savunma devreye soktuğu şeklinde yorumlanabilir. Pek çok araştırma tarafından katalaz ve SOD gibi enzimlerin biyotik ve abiyotik stres mekanizmalarında kilit görev aldıkları belirtilmiştir. SOD ve CAT enzimlerinin, stres altındaki bitkiyi ROS türlerine karşı koruduğunu söyleyebiliriz.

RAPD tekniği ile bu çalışmada kumarin stresine maruz bırakılmış *L. culinaris*'in DNA değişikliklerinin belirlenmesi hedeflendi. Kumarin konsantrasyonlarının artırılması ile DNA bant profillerindeki değişiklikleri artmış olmakla birlikte bu değişikliklerin mutasyonlara dönüşüp dönüşmediği hakkında bir bilgi sahibi değiliz. RAPD PZR analizi sonucunda kumarin maddesinin bitkinin genetik materyaline zarar vermiş olabileceği düşüncesindeyiz. Çalışmamızda, katalaz ve süperoksit izoenzimlerinin çeşitli stres koşulları altındaki davranışlarının Real-Time PZR yöntemiyle takip edilerek genlerin fonksiyonlarının belirlenmesine ve stresle ilişkili olan genlerin tanımlanmasına olanak sağlandı. Toksik maddelerin genetik materyal ile etkileşimi ve bunun sonucunda meydana gelen mutasyon çeşitleri, kromozom mutasyonları ve gen mutasyonları gen ifadelerinde değişikliklere sebep olmuş olabilir. Bu tez çalışmasında çalışılan genlerin anlatımları ve bu genlerin ürünleri olan enzim aktivitelerindeki değişimler paralel sonuçlar verdi. Genel anlamda elde edilen sonuçlar literatür bilgisi ile uyum içerisinde olup farklı sonuçlar da elde edildi. Bu durum gerek bitki türü, çeşidi, uygulama dozları ve bitki yetiştirme koşulları gibi çevresel dış etmenlerden kaynaklanmış olabileceği düşüncesindeyiz.

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ile aşağıdaki çıktılar hedeflendi;

- Alleopatik potansiyele sahip kumarin bileşiminin *L.culinaris* üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve moleküler etkilerinin belirlenmesi,
- Toksikite çalışmalarında yaygın olarak kullanılan mitoz bölünme testleri ve kromozom anormaliliği belirleme yöntemi ile alleopatik kimyasalların etkilerinin tespit edilmesinde farklı bir alana uygulanması,
- Hem tüketiciler hem de çevre için daha sağlıklı ve güvenli herbisit öncü maddelerinin tespit edilmesi,
- Sentetik ve hedef olmayan organizmalara da toksik etki gösterebilen herbisitlere alternatif herbisitlerin geliştirilmesi,

- Tarım alanlarında verim artışı sağlanırken doğal dengenin de korunması,
- *L.culinaris*'in sitotoksikite ve genotoksikite çalışmalarında uygun bir bioindikatör olabileceğinin gösterilmesi,
- Kumarin bileşiğinin toksik etkilerinin belirlenmesiyle çeşitli alanlarda (tarım, tıp, boya ve gıda sanayii gibi) güvenli kullanımlarının sağlanması,
- Herbit olarak kullanımları önerilen ve son yıllarda sentetik kimyasalların yerini alan doğal bitki bileşenlerinin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi,
- Allelopatik etkiye sahip olan, çimlenmeyi etkileyen, sitotoksik karaktere sahip bu bileşenlerin DNA materyali ve protein sentezi üzerinde ne gibi değişimlere neden olduğunun belirlenmesi.

Allelopatik etkileşim gibi konularda bitki-organizma etkileşimlerinin tek yönlü değerlendirilmemesi önemlidir. Laboratuvar gibi stabil olmayan şartlarda, allelopatik olayların meydana gelmesinde birçok ekolojik, edafik ve mikrobiyal şartlar gibi dış etkilerin yanında bitkinin fenolojik yaşı, tolerans sınırı ve genetik yapısı da bileşiğin ya da bileşiklerin allelopatik potansiyeli üzerinde etkili olmaktadır. Laboratuvar koşullarında bu durumun bir kısmı göz ardı edilerek çalışmalar yapıldı. Bitkide sekonder metabolit olarak kullanılan ve allelopatik etkiye sahip olan kumarinin, tarım, gıda, kozmetik, tıp gibi birçok alanda aktif olarak kullanımları, etki mekanizmalarının açıklanması gerekliliğini de beraber getirmiştir. Bu bileşiklerin allelopatik ve toksik etkilerinin tam olarak anlaşılması için sitolojik, genetik, biyokimyasal ve fizyolojik testlerin beraber yürütülmesinde fayda vardır. Bitkiler üzerinde yapılan çalışmalar ile stres koşullarına dayanıklı bitki türlerindeki savunma mekanizmalarının anlaşılması ve böylelikle ürün kayıplarının en aza indirilmesi beslenme, tarım ekonomileri açısından son derece önemlidir. Bu amaçla son yıllarda gelişen teknoloji ile strese dayanıklı bitki türlerinin üretilmesi ve gelecekte ortaya çıkması muhtemel beslenme sorununun önlenmesi hedeflenmektedir. Ayrıca çalışmamızın bu konuda yapılmış çalışmalara katkı sağlayacağı ve bitki sekonder metabolitlerinin etkilerinin anlaşılmasına yönelik yeni çalışmalara ışık tutacağı düşüncesindeyiz. Bu çalışmada kumarinin *L.culinaris* üzerinde oluşturacağı sitotoksik, genotoksik ve moleküler etkilerinin belirlenmesini sağlayacağından daha sonra yapılacak çalışmalar için önemli bir veri kaynağı

olacaktır. Bitkilerin stres faktörlerine dayanıklılık mekanizmalarının belirlenmesine yönelik çalışmaların yapılmasının yararlı olacağına inanıyoruz.

Bu tez çalışmasında elde edilen bazı verilerin ilk kez saptanması açısından da ayrıca bir öneme sahip olduğunu söyleyebiliriz. Bu konu ile ilgili olarak çok fazla literatür bilgisine ulaşamadık. Kumarinin çeşitli bitkiler ve canlılar üzerindeki etkisi bazı araştırmacılar tarafından belirtilmiş ancak mercimek bitkisi üzerindeki etkisi ilk defa bu tez çalışması ile belirlendi. Bu nedenle allelopatik kimyasalların etkilerinin tespit edilmesinde, kumarin bileşiğinin ökaryotik canlılar üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesinde ve biyolojik parçalanabilirlikleri hızlı ve kolay olan hem tüketiciler hem de çevre için daha sağlıklı ve güvenli maddelerinin tespit edilmesinde, başka çalışmalara katkı sağlayacağı kanısındayız. Bitki sekonder metabolitlerinden olan kumarinin başka organizmalar üzerindeki etki mekanizmasının aydınlatılmasının daha detaylı moleküler düzeydeki araştırmalarla desteklenmesinin gerekli olduğu düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

Abenavoli M. R., Sorgonà A., Sidari M., Badiani M., Fuggi A., Coumarin Inhibits the Growth of Carrot (*Daucus carota* L. cv. Saint Valery) Cells in Suspension Culture, *J. Plant Physiol.*, 2003, **160**, 227–23.

Abenavoli M. R., Sorgonà A., Albano S., Cacco G., Coumarin Differentially Affects the Morphology of Different Root Types of Maize Seedlings, *Journal of Chemical Ecology*, 2004, **30**(9), 1871-1883.

Abenavoli M. R., Cacco G., Sorgonà A., Marabottini R., Paolacci A. R., Ciaffi M., Badiani M., The Inhibitory Effects of Coumarin on the Germination of Durum Wheat (*Triticum turgidum* ssp. Durum, cv. Simeto) Seeds, *Journal of Chemical Ecology*, 2006, **32**(2), 489.

Aebi H., Catalase in Vitro, *Methods in Enzymology*, 1984, **105**, 121-126.

Agarwal P. K., Shukla P. S., Gupta K., Jha B., Bioengineering for Salinity Tolerance in Plants: State of the Art, *Molecular Biotechnology*, 2012, **54**, 102-123.

Ahmad S., Yasmin R., Effects of Methyl Parathion and Tri-miltox on the Mitosis of *Allium Cepa*, *Cytologia*, 1992, **57**, 155-160.

Ahrabi F., Entesharisup S., Moradshahisup A., Allelopathic Potential of Para-hydroxybenzoic Acid and Coumarin on Canola: Talaieh Cultivar, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, **5**(20), 5104-5109.

Akay Ş., Fındık Bitkisinin (*Corylus Avellana*) Farklı Organlarından Endofitik Fungusların İzolasyonu ve Sekonder Metabolitlerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2011, 301936.

Akkuş İ., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkiler, *Mimoza Yayınları*, Konya, 1995.

Aksoy D., Patlıcan (*Solanum melongena*) Tohumlarında Bakır (Cu) Stresi ile Oluşan DNA Değişikliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2009, 258647.

Aksoy E., Kuraklık ve Tuz Streslerinin Mercimek (*Lens culinaris* M.) Fidelerinde Antioksidant Enzimlerinin Gen İfadeleri Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2008, 177339.

Aksoy Ö., Dane F., Sanal F. E., Aktac T., The Effects of Fusilade (Fluazifop-p-butyl) on Germination, Mitotic Frequency and α -Amylase Activity of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Seeds, *Acta Physiol Plant*, 2007, **29**, 115–120.

Aksoy Ö., Deveci A., Tütünoğlu B., Genotoxic Effects of the Fungicide Sportak on Zea Mays, *Fresenius Environmental Bulletin*, 2015, **24**(2), 552-559.

Al-Barwani F. M., Eltayeb E. A., Antifungal Compounds from Induced *Conium maculatum* L. Plants, *Biochemical Systematics and Ecology*, 2004, **32**(12), 1097-1108.

Al-Wakeel S., Gabr M., Abu-El-Soud W., Saleh A., Coumarin and Salicylic Acid Activate Resistance to *Macrophomina phaseolina* in Helianthus Annuus, *Acta Agronomica Hungarica*, 2013, **61**(1), 23-35.

Aliotta G., Cafiero G., Fiorentino A., Strumia S., Inhibition of Radish Germination and Root Growth by Coumarin and Phenylpropanoids, *Journal of Chemical Ecology*, 1993, **19**(2), 175-183.

Alscher R. G., Erturk N., Heath L. S., Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Controlling Oxidative Stress in Plants, *Journal of Experimental Botany*, 2002, **53** (372), 1331-1341.

Ananieva E. A., Alexieva V. S., Popova L. P., Treatment with Salicylic Acid Decreases the Effects of Paraquat on Photosynthesis, *Journal of Plant Physiology*, 2002, **159**(7), 685-693.

Antonsie-wiez D., Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of Leda krin, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 1990, **26**, 79-96.

Araniti F., Mancuso R., Lupini A., Giofrè S. V., Sunseri F., Gabriele B., Abenavoli M. R., Phytotoxic Potential and Biological Activity of Three Synthetic Coumarin Derivatives as New Natural-like Herbicides, *Molecules*, 2015, **20**(10), 17883-17902.

Arumuganathan K., Earle E. D., Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species, *Plant Mol Boil.*, 1991, **9**, 208-218.

Aruoma O. I., Cuppett S. L., *Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept*, AOCS Press, Champaign, Illinois, 1997.

Asad N. R., Asad L. M. B. O., Bonacossa de Almeida C. E., Felzenszwalb I., Cabral-Neto J. B., Leitão A. C., Several Pathways of Hydrogen Peroxide Action that Damage the E. coli Genome, *Genetics and Molecular Biology*, 2004, **27**(2), 291-303.

Asada K., Ascorbate Peroxidase-a Hydrogen Peroxide Scavenging Enzyme in Plants, *Physiol Plant*, 1992, **85**, 235-241.

Asada K., Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions, *Plant Physiol*, 2006, **141**, 391-396.

Asif M., Pharmacological Activities and Phytochemistry of Various Plant Containing Coumarin Derivatives, *Current Science*, 2015, **1**(3), 77-90.

Aslan M., Ürünlerin Birbirine Olan Allelopatik Etkileri ve Ekim Nöbeti, Sistemlerinin Oluşturulmasında Allelopatinin Önemi, *Türkiye’de Allelopatinin Kullanımı: Dün, Bugün, Yarın*, Yalova, Türkiye, 13-15 Haziran 2006.

Aspinall D., Metabolic Effects of Water and Salinity Stress in Relation to Expansion of the Leaf Surface, *Aust. J. Plant Physiology*, 1986, **13**, 59-73.

Atienzar F. A., Conradi M., Evenden A. J., Jha A. N., Depledge M. H., Qualitative Assessment of Genotoxicity Using Random Amplified Polymorphic DNA: Comparison of Genomic Template Stability with Key Fitness Parameters in *Daphnia magna* Exposed to Benzo[a]pyrene, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999, **18**, 2275–2282.

Atienzar F. A., Jha A. N., The Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Assay and Related Techniques Applied to Genotoxicity and Carcinogenesis Studies: A Critical Review, *Mutation Research*, 2006, **613**, 76-102.

Aydoğan A., Ülkemizde Mercimek Üretimi, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, *Tigem Dergisi*, 2001, **80**, 30-39.

Azevedo R. A., Alas R. M., Smith R. J., Lea P. A., Response of Antioxidant Enzymes to Transfer from Elevated Carbondioxide to Air and Ozone Fumigation in Leaves and Roots of Wild-type and Catalase-deficient Mutant of Barley, *Physiol Plant*, 1998, **104**, 280-92.

Barba-Espin G., Diaz-Vivancos P., Clemente-Moreno M. J., Albacete A., Faize L., Faize M., Perez-Alfocea F., Hernandez J. A., Interaction between Hydrogen Peroxide and Plant Hormones during Germination and the Early Growth of Pea Seedlings, *Plant, Cell & Environmet*, 2010, **33**, 981-994.

Barbério A., Bioassays with Plants in the Monitoring of Water Quality, Editors: Elshorbagy W., Chowdhury R. K., *Water Treatment*, InTech Publishers, Londra, 317-334, 2013.

Başaran A. A., Farmakognozide Tek Hücre Jel Elektrofrezisi Uygulamaları, *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Eskişehir, Türkiye, 29-31 Mayıs 2002.

Bates L., Waldren R. P., Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies, *Plant and Soil*, 1973, **39**, 205-207.

Beauchamp C., Fridovich I., Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable To Acrylamide Gels, *Analytical biochemistry*, 1971, **44**(1), 276-287.

Becerril C., Acevedo H., Ferrero M., Sanz F., Castano A., DNA Fingerprinting Comparison of Rainboe Trout and RTG-2line Using Random Amplified Polymorphic DNA, *Ecotoxicology*, 2001, **10**, 115-124.

Bewley J. D., Black M., *Seeds Physiology of Development and Germination*, 2nd ed., Plenum Press, New York ve Londra, 1994.

Bhattacharjee S., Reactive Oxygen Species and Oxidative Burst: Roles in Stress, Senescence and Signal Transduction in Plant, *Current Science*, 2005, **89**, 1113-1121.

Bidwell R. G. S., *Plant Physiology*, Macmillan Publishing Co, New York, 1974.

Bickers D., Calow P., Greim H., Hanifin J. M., Rogers A. E., Saurat J. H., Sipes I. G., Smith R. L., Tagami H., A Toxicologic and Dermatologic Assessment of Cinnamyl Alcohol, Cinnamaldehyde and Cinnamic Acid When Used as Fragrance Ingredients, *Food and Chemical Toxicology*, 2005, **43**, 799-836.

Blumwald E., Sodium Transport and Salt Tolerance in Plants, *Current Opinion in Cell Biology*, 2000, **12**, 431-434.

Boğa M., Kumarin Türevi Yeni 14:4 Taç Eter Bileşiklerinin Sentezi ve Yapılarının Aydınlatılması, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2005, 198377.

Bohnert H. J., Shen B., Transformation and Compatible Solutes, *Horticulture*, 1999, **78**, 237-260.

Bohnert H. J., Sheveleva E., Plant Stress Adaptations Making Metabolism Move, *Current Opinion Plant Biology*, 1998, **1**, 267-274.

Bokhari U. G., Trent J. D., Proline Concentrations in Water Stressed Grasses, *J Range Manage*, 1985, **38**, 37-38.

Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., Production of Plant Secondary Metabolites: A Historical Perspective, *Plant Science*, 2001, **161**(5), 839-851.

Born S. L., Api A. M., Ford R. A., Lefever F. R., Hawkins D. R., Comparative Metabolism and Kinetics of Coumarin in Mice and Rats', *Food and Chemical Toxicology*, 2003, **41**, 247-258.

Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M., Inzè, D., Superoxide Dismutase in Plants, *Critical Reviews in Plant Science*, 1994, **13**, 199-218.

Bradford M. M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**(1-2), 248-254.

Brooker N. L., Kuzimichev Y., Laas J., Pavlis R., Evaluation of Coumarin Derivatives as Anti-fungal Agents Against Soil-borne Fungal Pathogens, *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 2006, **72**(4), 785-793.

Büyük İ., Tuz ve Kuraklık Stresi Altında Geliştirilmiş Farklı Fasulye (*Phaseolus Vulgaris* L.) Çeşitlerinde Lea-3 Geni mRNA İfade Seviyelerinin Kantitatif Real-Time PCR Yöntemiyle İncelenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2014, 386201.

Canbolat M., Kahramanmaraş Koşullarında Değişik Mercimek (*lens culinaris*) Çeşitlerinde Ekim Sıklığının Verim ve Verim Unsurları Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 2014, 352095.

Cariello N. F., Piegorsch W. W., The Ames Test: The Two-Fold Rulo Revisited, *Mutation Research*, 1996, **369**, 23-31.

Cemeroğlu B., *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi*, 2. Baskı, Başkent Klişe Matbaacılık, Ankara, 2009.

Cenkçi S., Yıldız M., Ciğerci I. H., Konuk M., Bozdağ A., Toxic Chemicals-induced Genotoxicity Detected by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seedlings, *Chemosphere*, 2009, **76**(7), 900-906.

Charwood B. V., Rhodes M. J. C., *Secondary Products from Plant Tissue Culture*, Clarendon Press, Oxford, 1990.

Chaudiere J., Ferrari-Iliou R., Intracellular Antioxidants from Chemical Tobiochemical Mechanism, *Food Chem. Toxicol.*, 1999, **37**, 949-962.

Chen Z., Silva H., Klessig D., Active Oxygen Species in the Induction of Plant Systemic Acquired Resistance Induced by Salicylic Acid, *Science*, 1993, **263**, 1883–1886.

Chengxu W., Mingxing Z., Xuhui C., Bo Q., Review on Allelopathy of Exotic Invasive Plants, *Procedia Engineering*, 2011, **18**, 240-246.

Cherian S., Reddy M. P., Ferreira R. B., Transgenic Plants with Improved Dehydration-stress Tolerance: Progress and Future Prospects, *Biologia Plantarum*, 2006, **50**(4), 481-485.

Cheynier V., Polyphenols in Foods are More Complex than Often Thought, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, **81**(1), 223-229.

Chomczynski P., Sacchi N., Single-step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-phenol-chloroform Extraction, *Anal. Biochem.*, 1987, **162**, 156.

Choudhary N. L., Sairam R. K., Tyagi A., Expression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate Synthetase Gene During Drought in Rice (*Oryza sativa* L.), *Indian J Biochem Biophys*, 2005, **42**(6), 366-370.

Chu T., Aspinall D., Paleg L. G., Stress metabolism. VI. Temperature Stress and the Accumulation of Proline in Barley and Radish, *Functional Plant Biology*, 1974, **1**(1), 87-97.

Cirico T. L., Omaye S. T., Additive or Synergetic Effects of Phenolic Compunds on Human Low Density Lipoprotein Oxidation, *Food and Chemical Toxicology*, 2006, **44**, 510-516.

Coffey S., *Rood's Chemistry of Carbon Compounds*, 2nd ed., Elsevier, New York, 1977.

Conte C., Mutti I., Puglisi P., Ferrarini A., Regina G., Maestri E., Marmoroli N., DNA Fingerprinting Analysis by a PCR Based Method for Monitoring the Genotoxic Effects of Heavy Metals Pollution, *Chemosphere*, 1998, **37**, 2739-2749.

Coşkun Y., Karababa E., Türkiye'de Mercimek Üretim Potansiyeli ve İşleme Teknolojisi, *Gıda*, 1998, **23**, 201-209.

Danış Ö., Hidroksi Kumarin ve Aminokumarin Türevlerinin Pıhtılaşma Sistemi Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 2003, 136072.

Davies K. J. A., Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 2000, **50**, 279-289.

De Veylder L., Joubès J., Inzé D., Plant Cell Cycle Transitions, *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, **6**, 536-543.

Debnath A. K., Compadre R. L., Debnath G., Shusterman A. J., Hansch G., Structure-Activity Relationship of Mutagenic Aromatic and Heteroaromatic Nitro Compounds Correlation Molecular with Orbital Energies and Hydrophobicity, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1991, **34**(2), 786-797.

Del Rio L. A., Corpas F. J., Sandalio L. M., Palma J. M., Gomez M., Barroso J. B., Reactive Oxygen Species, Antioxidant Systems and Nitric Oxide in Peroxisomes, *Journal of Experimental Botany*, 2002, **53**, 1255-1272.

Del Rio L. A., Sandalio L. M., Altomare D. A., Zilinskas B. A., Mitochondrial and Peroxisomal Magnese Superoxide Dismutase: Differential Expression During Leaf Senescence, *Journal of Experimental Botany*, 2003, **54**, 923-933.

Demiralay N., Bazı Kumarin Bileşiklerinin Asitlik Sabitlerinin Tayini ve Fe(II), Cu(II), Ni(II) Metal İyonları ile Kompleksleşmelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2005, 198344.

Desikan R., Hancock J. T., Bright J., Harrison J., Weir I., Hooley R., Neill S. J., A Role for ETR1 in Hydrogen Peroxide Signaling in Stomatal Guard Cells, *Plant Physiol.*, 2005, **137**, 831-834.

Dewick P. M., *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons., West Sussex, 2nd Ed, Chichester, England, 2002.

Dhindsa R., Plumb-Dhindsa P., Thorpe T., Leaf Senescence: Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation, and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase, *J. Exp. Bot.*, 1981, **32**, 93-101.

Dökmeci I., *Toksikoloji: Akut Zehirlenmelerinde Tanı ve Tedavi*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1994.

Duke S. O., Naturally Occurring Chemical Compounds as Herbicides, *Weed Science*, 1986, **2**, 15-44.

Dülger B., Ceylan M., Alitsaous M., Uğurlu E., *Artemisia absinthium* L. (Pelin)'un Antimikrobiyal Aktivitesi, *Turkish Journal of Biology*, 1999, **23**(3), 377- 384.

Düzgüneş Z., Düzgüneş O., *Entomolojide İstatiksel Metodlar*, A.Ü. Ziraat Fak. Yayını, Ankara, 1958.

Eisenbrand G., Pool-Zobel B., Baker V., Balls M., Blaauboer B., Boobis A., Carere A., Kevekordes S., Lhuguenot J. C., Pieters R., Methods of in vitro Toxicology, *Food and Chemical Toxicology*, 2002, **40**(2-3), 193-236.

Ekinci F., Buğday (*Triticum aestivum* L.) α -Amilazının Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi ve Enzim Aktivitesi Üzerine EndosülfanIn Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 1996, 57303.

Elçi S., *Sitogenetikte Arastırma Yöntemleri ve Gözlemler*, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Yayınları, Van, 1994.

El-Ghamery A. A., El-Nahas A. I., Mansour M. M., The Action of Atrazine Herbicide as an Inhibitor of Cell Division on Chromosomes and Nucleic Acids Content in Root Meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*, *Journal Cytologia*, 2000, **65**(3), 277-287.

El-Khatib R. M., Nassr L. A. E., Reactivity Trends of The Base Hydrolysis of Coumarin and Thiocoumarin an Binary Aqueous Methanol Mixtures at Different Temperature, *Spectrochimica Acta*, 2007, **67**, 643-648.

El-Seedi H. R., El-Said A. M. A., Khalifa S. A. M., Göransson U., Bohlin L., Anna-Karin Borg-Karlson A. K., Verpoorte R., Biosynthesis, Natural Sources, Dietary Intake, Pharmacokinetic Properties, and Biological Activities of Hydroxycinnamic Acids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, **60**, 10877- 10895.

Ellis R. H., Roberts E. H., Summerfield R. J., Cooper J. P., Environmental Control of Flowering in Barley (*Hordeum vulgare* L.). II. Rate of Development as a Function of Temperature and Photoperiod and its Modification by Low Temperature Vernalization, *Ann. Bot.*, 1988, **62**, 145-158.

Erez M. E., *Lepidium draba* L., *Acroptilon repens* (L.) DC., *Thymus kotchyanus* Boiss&Hohen. var. *kotchyanus*, *Inula peacockiana* (Aitch.&Hemsl.) Koravin, *Salvia kronenburgei* Rech. f. ve *Phlomis armeniaca* Wild. Bitkilerinin Allelopatik Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, 2009, 258830.

Ergen Z. N., Budak H., Sequencing Over 13000 Expressed Sequence Tags from Six Subtractive cDNA Libraries of Wild and Modern Wheats Following Slow Drought Stress, *Plant Cell and Environment*, 2009, **32**, 220-236.

Ertürk F. A., Ağır Metallerin Neden Olduğu Genetik ve Epigenetik Değişikliklerin Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi, Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2013, 322564.

Esfandiari E., Shokrpour M., Alavi-Kia S., Effect of Mg Deficiency on Antioxidant Enzymes Activities and Lipid Peroxidation, *J Agr Sci*, 2010, **2**, 131–136.

Eun S. O., Youn H. S., Lee Y., Lead Disturbs Microtubule Organization in the Root Meristem of *Zea mays*, *Physiol Plant.*, 2000, **110**, 356-365.

Facchini P. J., Alkaloid Biosynthesis in Plants: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications, *Annual Review of Plant Biology*, 2001, **52**(1), 29-66.

FAO Statistical Databases/ Agriculture/ Production/ Crops Primary: <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (Ziyaret tarihi: 10 Eylül 2016).

Fedina I. S., Nedeva D., Çiçek N., Pre-treatment with H₂O₂ Induces Salt Tolerance in Barley Seedlings, *Biologia Plantarum*, 2009, **53**(2), 321-324.

Felter S. P., Vassallo J. D., Carlton B. D., Daston G. P., A Safety Assessment of Coumarin Taking into Account Species-specificity of Toxicokinetics, *Food and Chemical Toxicology*, 2006, **44**, 462-475.

Ferguson L. R., van Zijl P., Holloway W. D., Jones W. T., Condensed Tannins Induce Micronuclei in Cultured V79 Chinese Hamster Cells, *Mutation Research*, 1985, **158**, 89-95.

Ferreira R. R., Fornazier R. F., Vitoria A. P., Lea P. J., Azevedo R. A., Changes in Antioxidant Enzyme Activities in Soybean Under Cadmium Stress, *Journal of Plant Nutrition*, 2002, **25**, 327-342.

Fındıklı Z., Türkoğlu Ş., Glyphos ve DDVP' nin *Allium Cepa* L.' Da Mitoz Bölünme ve Kromozomlar Üzerine Etkisi, *C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2010, **31**, 49-62.

Finney D. J., *Probit Analysis*, 3rd ed., Cambridge University Pres., Londra, 1971.

Foyer C. H., Lopez-Delgado H., Dat J. F., Scott I. M., Hydrogen Peroxide and Glutathione-Associated Mechanism of Acclimatory Stress Tolerance And Signaling, *Physiologia Plantarum*, 1997, **100**, 241–254.

Fridovich I., Süperoxide Radical and Süperoxide Dismutases, *Annu. Rev. Biochem.*, 1995, **64**, 97-112.

Gao Z., Huang K., Xu H., Effects of Rutin Supplementation on Antioxidant Status and Iron, Copper and Zinc Contents in Mouse Liver and Brain, *Biological Trace Element Research*, 2002, **88**, 271-279.

Gapinska M., Sklodowska M., Gabara B., Effect of Short and Long Term Salinity on The Activities of Antioxidative Enzymes and Lipid Peroxidation in Tomato Roots, *Acta Physiol Plant*, 2008, **30**, 11-18.

Gerçek Y. C., Mercimek (*Lens Culinaris* Medik.) Bitkisinde Nişasta Sentaz Enziminin Farklı Fotoperiyotlardaki Ekspresyon Analizi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2014, 380539.

Gibson J. P., Gibson T. R., *Plant Diversity*, Chelsea House Pub., Chelsea, 2007.

Gichner T., Plewa M. J., Induction of Somatic DNA Damage as Measured By Single Cell Gel Electrophoresis and Point Mutation in Leaves of Tobacco Plants, *Mutation Research*, 1998, **401**, 143-152.

Gill S. S., Tuteja N., Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, **48**, 909-930.

Gkinis G., Bozin B., Mimica-Dukic N., Tzakou O., Antioxidant Activity of *Nepeta nuda* L. ssp. *nuda* Essential Oil Rich in Nepetalactones from Greece, *Journal of Medicinal Food*, 2010, **13**(5), 1176-1181.

Graña E., Costas-Gil A., Longueira S., Celeiro M., Teijeira M., Reigosa M. J., Sánchez-Moreiras A. M., Auxin-like Effects of The Natural Coumarin Scopoletin on *Arabidopsis* Cell Structure and Morphology, *Journal of Plant Physiology*, 2017, **218**, 45-55.

Grant J. J., Loake G. J., Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Signaling in Disease Resistance, *Plant Physiology*, 2000, **124**, 21-30.

Greaves M., Pharmacogenetics in the Management of Coumarin Anticoagulant Therapy: The Way Forward or an Expensive Diversion?, *PloS Med*, 2005, **2**, 944-945.

Griffiths H. R., Olinski R., Coolen S., Collins A., Astley S. B., Biomarkers, *Free Radical Research*, 2002, **36**, 7-8.

Gönen U., Aloe Vera L. Jel Ekstraktlarının, *Allium Cepa* L. Kök Ucu Hücrelerinde Mitotik İndeks ve Faz İndeks Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2007, 177625.

Guardia T., Rotelli A. E., Juarez A. O., Pelzer L. E., Anti-inflammatory Properties of Plant Flavonoids. Effects of Rutin, Quercetin and Hesperidin on Adjuvant Arthritis in Rat, *Il Farmaco*, 2001, **56**, 683-687.

Guenther E., *The Essential Oils*, D.Von Nostrand Ltd., New York, 1975.

Gül F., *Mentha Villosa* Nervata Bitkisindeki Uçucu Yağ ve Fenolik Bileşiklerin İzolasyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, 2011, 283352.

- Güllüce M., Şahin F., Sökmen M., Özer H., Daferera D., Sökmen A., Polissiou M., Adıguzel A., Özkan H., Antimicrobial and Antioxidant Properties of The Essential Oils and Methanol Extract from *Mentha Longifolia* L. Ssp. *Longifolia*, *Food Chemistry*, 2007, **103**(4), 1449-145.
- Gürsoy M., Balkan A., Ulukan H., Ecophysiological Responses to Stress in Plants A *Generalapproach*, *Pakistan J. Biological Sci.*, 2012, **15**(11), 506–516.
- Hajlaoui H., Denden M., El Ayeb N., Changes in Fatty Acids Composition, Hydrogen Peroxide Generation and Lipid Peroxidation of Salt-Stressed Corn (*Zea Mays* L.) Roots, *Acta Physiol Plant*, 2009, **31**, 787-796.
- Halliwell B., Reactive species and antioxidants. Redox Biology is a Fundamental Theme of Aerobic Life, *Plant Physiol.*, 2006, **141**, 312–322.
- Harashima H., Dissmeyer N., Schnittger A., Cell Cycle Control Across the Eukaryotic Kingdom, *Trends in Cell Biology*, 2013, **23**, 345-356.
- Hare P. D., Cress W. A., Metabolic Implications of Stress-induced Proline Accumulation in Plants, *Plant Growth Regulation*, 1997, **21**(2), 79-102.
- Harinasut P., Poonsopa D., Roengmongkol K., Charoensataporn R., Salinity Effects on Antioxidant Enzymes in Mulberry Cultivar, *Sci Asia*, 2003, **29**, 109-113.
- Hartmann T., From Waste Products to Ecochemicals, Fifty Years Research of Plant Secondary Metabolism, *Phytochemistry*, 2007, **68**(22-24), 2831-2846.
- Hassine A. B., Ghanem M. E., Bouzid S., Lutts S., An Inland and a Coastal Population of the Mediterranean Xero-Halophyte Species *Atriplex Halimus* L. Differ in their Ability to Accumulate Proline and Glycinebetaine in Response to Salinity and Water Stress, *Journal of Experimental Botany*, 2008, **59**(6), 1315-1326.
- Hawtin G. C., Singh K. B., Saxena M. C., Some Recent Advances in the Understanding and Improvement of Cicer and Lens., Editors: Summerfield R. J., Bunting A. H., *Advances in Legume Science*, Kew, Eng., London, 56-64, 1979.
- Heath R. L., Packer L., Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts, Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation, *Arch Biochem Biophys*, 1968, **125**(1), 189-198.
- Hodgson E. K., Fridovich I., The Interaction of Bovine Erythrocyte Superoxide Dismutase with Hydrogen Peroxide: Interaction of The Enzyme, *Biochemistry*, 1975, **14**(24), 5294–5299.
- Hopa E., İnsan Eritrositlerinden Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması, Bazı Kumarin ve Pestisitlerin Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 2010, 275233.
- Hoult J. R. S., Paya M., Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential, *General Pharmacology*, 1996, **27**, 713-722.

Hua D., Wang C., He J., Liao H., Duan Y., Zhu Z., Guo Y., Chen Z., Gong Z., A Plasma Membrane Receptor Kinase, GHR1, Mediates Abscisic Acid and Hydrogen Peroxide-regulated Stomatal Movement in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 2012, **24**, 2546-2561.

Hurkman W. J., Fornia C. S., Tanaka C. K., A Comparison of The Effects of Salt on Polypeptides and Translatable mRNAs in Roots of a Salt-Tolerant and Salt-sensitive Cultivar of Barley, *Plant Physiology*, 1989, **90**, 1444-1456.

İnce H., *Bitki Preparasyon Teknikleri*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir, 1989.

Jain M., Mathur G., Koul S., Sarin N., Ameliorative Effects of Proline on Saltstress-induced Lipid Peroxidation in Cell Lines of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.), *Plant Cell Reports*, 2001, **20**(5), 463-468.

Jain S. M., Saxena P. K., *Protocols for in Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants*, Humana Press, New York, 2009.

Jiang W., Liu D., Effects of Pb²⁺ on Root Growth, Cell Division, and Nucleolus of *Zea Mays* L., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2000, **65**, 786-793.

Jones R. D., Morice A. H., Hydrogen Peroxide-An Intracellular Signal in the Pulmonary Circulation: Involvement in Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction, *Pharmacology and Therapeutics*, 2000, **88**, 153-161.

Jovanovic S. V., Steenken S., Simic M. G., Hara Y., Antioxidant Properties of Flavonoids: Reduction Potentials and Electron Transfer Reactions of Flavonoid Radicals, Editors: Rice-Evans C. A., Packer L., *Flavonoids in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York, 1997.

Kanchanaketu T., Sangduen N., Toojinda T., Hongtrakul V., Genetic Diversity Analysis of *Jatropha Curcas* L. (Euphorbiaceae) based on Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism, *Genetics And Molecular Research*, 2012, **11**(2), 944-955.

Karaaltın S., İdikut L., Uslu Ö. S., Erol A., Zakkum Bitkisinin Kök, Gövde, Yaprak ve Tomurcuk Ekstraktların Fasulye ve Buğday Tohumlarının Çimlenme ve Fide Gelişimi Üzerine Etkileri, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2004, **7**(1), 111-115.

Karlovsky P., Secondary Metabolites in Soil Ecology, *Secondary Metabolites in Soil Ecology*, 2008, **1**, 1-19.

Kavi Kishor P. B., Sangam S., Amrutha R. N., Sri Laxmi P., Naidu K. R., Rao K. R. S. S., Rao S., Reddy K. J., Theriappan P., Sreenivasulu N., Regulation of Proline Biosynthesis, Degradation, Uptake and Transport in Higher Plants: Its Implications in Plant Growth and Abiotic Stress Tolerance, *Current Science*, 2005, **88**(3), 424-439.

Kavran G., Bazı Kumarin Türevlerinin Sentezleri ve UV Spektrumları, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1998, 75517.

Kaya F., Ülkemizde Yetiştirilen Bazı Mercimek Çeşitlerinin Bileşimlerinin Belirlenmesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2010, 256428.

Kaymak F., Cytogenic Effects of Maleic Hydrazide on *Helianthus Annus* L, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2005, **8**, 104-108.

Khan A. A., Interaction of Growth-Retarding Compounds and Gibberellin on Indoleacetic Acid Oxidase and Peroxidase of Cucumber Seedlings, *Plant Physiol.*, 1969, **38**, 731-737.

Knypl J. S., Coumarin- and Indole-3-Acetic Acid-Induced Growth and Respiration in Sunflower as Affected by 2-Chloroethyl-3-Methylammonium Chloride, Actinomycin CI, Puromycin and Diazouracil, *Acta Soc. Bot. Pol.*, 1968, **37**, 51-60.

Knypl J. S., Arrest of Yellowing and Senescing Leaf Discs of Maize by Growth Retardants, Coumarin and Inhibitors of RNA and Protein Synthesis, *Biol. Plant.*, 1969, **12**, 199-207.

Kobayashi K., Itaya D., Mahatamnuchoke P., Pornprom T., Allelopathic Potential of Itchgrass (*Rottboellia Exaltata* L. F.) Powder Incorporated into Soil, *Weed Biology and Management*, 2008, **8**(1), 64-68.

Kocaçalışkan İ., Bitki Hormonları, Editör: Kocaçalışkan İ., *Bitki Fizyolojisi*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 129-145, 2008.

Kocaçalışkan İ., *Bitki Fizyolojisi*, Bizim Büro Basımevi, Ankara, 2010.

Kohli R. K., Batish D., Singh H. P., Allelopathy and its Implications in Agroecosystems, *J.Crop Product.*, 1997, **1**, 169-202.

Kostova I., Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents, *Current Medicinal Chemistry*, 2005, **5**(1), 29-46.

Kovalchuk O., Titiv V., Hohn B., Kovalchuk I., A Sensitive Transgenic Plant System to Detect Toxic İnorganic Compounds in the Environment, *Nature Biotechnology*, 2001, **19**, 568-572.

Krystofova O., Shestivska V., Galiova M., Novotny K., Kaiser J., Zehnalek J., Babula P., Opatrilova R., Adam V., Kizek R., Sunflower Plants as Bioindicators of Environmental Pollution with Lead (II) Ions., *Sensors*, 2009, **9**, 5040-5058.

Kubista M., Andrade J. M., BenGKKson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Ståhlberg A., The Real-time Polymerase Chain Reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, 2006, **27**(2), 95-125.

- Kumar G., Srivastava N., Genotoxic Effects of Two Commonly Used Food Additives of Boric Acid and Sunset Yellow in Root Meristems of *Trigonella Foenum-Graecum*, *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.*, 2011, **8**, 361-366.
- Kupidlowska E., Dobrzynska K., Parys E., Zobel A. M., Effect of Coumarin and Xanthotoxin on Mitochondrial Structure, Oxygen Uptake, and Succinate Dehydrogenase Activity in Onion Root Cells, *Journal of Chemical Ecology*, 1994, **20**(10), 2471-2480.
- Laemmli U. K., Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 1970, **227**(5259), 680-685.
- Lake B. G., Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment, *Food and Chemical Toxicology*, 1999, **37**, 423-453.
- Lam Y., Wing S. C., Tong Y., Ng T. N., Wai T. C., Wen H. C., Xiang Q., Lin X., Zhang Y., Research on The Allelopathic Potential of Wheat, *Agric. Sci.*, 2012, **3**, 979-985.
- Lambert J. D., Hong J., Yang G. Y., Liao J., Yang C. S., Inhibition of Carcinogenesis by Polyphenols: Evidence from Laboratory Investigations, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, **81**(1), 284-291.
- Leme D. M., Marin-Morales M. A., *Allium Cepa* Test in Environmental Monitoring: A Review on its Application, *Mutat. Res.-Rev. Mutat.*, 2009, **682**, 71-81.
- Lewis R. J., Singh O. M., Smith C. V., Skarzynski T., Maxwell A., Wonacott A. J., Wigley D. B., The Nature of Inhibition of DNA Gyrase by the Coumarins and the Cyclothialidines Revealed by X-Ray Crystallography, *Embo J.*, 1996, **15**, 1412-1420.
- Li X., Gao M. J., Modulation of Root Branching by a Coumarin Derivative, *Plant Signaling & Behavior*, 2011, **6**(11), 1654-1655.
- Li Z. H., Wang Q., Ruan X., Pan C. D., Jiang D., Phenolics and Plant Allelopathy, *Molecules*, 2010, **15**, 8933-8952.
- Lichtenhaler H. K., Vegetation Stress: An Introduction to The Stress Concept in Plants, *J. Plant Physiol.*, 1996, **148**, 4-14.
- Lima-Costa M. E., Ferreira S., Duarte A., Ferreira A. L., Alleviation of Salt Stress Using Exogenous Proline on A Citrus Cell Line, *Acta Horticulturae (ISHS)*, 2008, **868**, 109-112.
- Liman R., Genotoxic Effects of Bismuth (III) Oxide Nanoparticles by *Allium* and Comet Assay, *Chemosphere.*, 2013, **93**, 269-273.
- Lin M. H., Chou Y. S., Tsai Y. J., Chou D. S., Antioxidant Properties of 5,7-Dihydroxycoumarin Derivatives in Vitro Cell-Free and Cell-Containing Systems, *J Exp Clin Med*, 2011, **3**(3), 126-131.

Liochev S. I., Fridovich I., The Effects of Superoxide Dismutase on H₂O₂ Formation, *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, **42**(10), 1465-1469.

Lisanti M. P., Martinez-Outschoorn U. E., Lin Z., Pavlides S., Whitaker-Menezes D., Pestell R. G., Howell A., Sotgia F., Hydrogen Peroxide Fuels Aging, Inflammation, Cancer Metabolism and Metastasis, *Cell Cycle*, 2011, **10**, 2440-2449.

Liu W., Li P., Qi X., Zhou Q., Sun T., Yang Y., DNA Changes in Barley (*Hordeum Vulgare*) Seedlings Induced by Cadmium Pollution Using RAPD Analysis, *Chemosphere*, 2005, **61**, 158-167.

Liu W., Yang Y. S., Zhou Q., Xie L., Li P., Sun T., Impact Assessment of Cadmium Contamination on Rice (*Oryza Sativa* L.) Seedlings at Molecular and Population Levels Using Multiple Biomarkers, *Chemosphere*, 2007, **67**, 1155–1163.

Livak J. K., Schmittgen D. T., Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and The 2- $\Delta\Delta$ CT Method, *Methods*, 2001, **25**, 402–408.

Livanos P., Apostolakos P., Galatis B., Plant Cell Division: ROS Homeostasis is Required, *Plant Signaling and Behavior*, 2012, **7**, 771-778.

Loew O., *Catalase: A New Enzym of General Occurrence, with Special Reference to the Tobacco Plant*, US Department of Agriculture Publishing House, Washington, 1901.

Luhová L., Lebeda A., Hedererova D., Pec P., Activites of Amine Oxidase, Peroxidase and Catalase in Seedlings of *Pisum Sativum* L. Under Different Light Conditions, *Plant Soil Environ.*, 2003, **49**(4), 151-157.

Lupini A., Sorgonà A., Miller A. J., Abenavoli M. R., Short-Term Effects of Coumarin Along The Maize Primary Root Axis, *Plant Signaling & Behavior*, 2010, **5**(11), 1395-1400.

Lupini A., Araniti F., Sunseri F., Abenavoli M. R., Coumarin Interacts with Auxin Polar Transport to Modify Root System Architecture in *Arabidopsis Thaliana*, *Plant growth regulation*, 2014, **74**(1), 23-31.

Ma T. H., Xu Z. D., Xu C., McConnell H., Rabago E. V., Arreola G. A., Zhang H., The Improved *Allium/Vicia* Root Tip Micronucleus Assay for Clastogenicity of Environmental Pollutants, *Mutation Research*, 1995, **334**, 185-195.

Macrae E. A., Ferguson I. B., Changes in Katalase Activity and Hydrogen Peroxide Cocentration in Plants in Response to Low Temperature, *Physiol. Plant*, 1995, **65**, 51-56.

Maistro E. L., Angeli J. P. F., Andrade S. F., Mantovani M. S., In Vitro Genotoxicity Assessment of Caffeic, Cinnamic and Ferulic Acids, *Genetics and Molecular Research*, 2011, **10**(2), 1130-1140.

- Manfredini S., Baraldi P. G., Bazzanini R., Guarneri M., Simoni D., Balzarini J., De Clercq E., Geiparvarin Analogs. 4.1. Synthesis and Cytostatic Activity of Geiparvarin Analogs Bearing a Carbamate Moiety or a Furocoumarin Fragment on the Alkenyl Side Chain, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1994, **37**(15), 2401-2405.
- Mani S., Van De Cotte B., Van Montagu M., Verbruggen N., Altered Levels of Proline Dehydrogenase Cause Hypersensitivity to Proline and its Analogs in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 2002, **128**, 73-83.
- Manuel J. R., Sánchez-Moreiras A., González L., Ecophysiological Approach in Allelopathy, *Critical Reviews in Plant Sci.*, 1999, **18**, 577-608.
- Maron D. R., Ames, B. N., Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research*, 1983, **113**, 173-215.
- Marttila S., Jones B. L., Mikkonen A., Differential Localization of Two Acid Proteinases in Germinating Barley *Hordeum Vulgare* Seeds, *Physiol. Plant*, 1983, **93**, 317-327.
- Mata R., Macías M. L., Rojas I. S., Lotina-Hennsen B., Toscano R. A., Anaya A. L., Phytotoxic Compounds from *Esenbeckia Yaxhoob*, *Phytochemistry*, 1998, **49**(2), 441-449.
- Mayer A. M., Mayber P., *The Germination of Seeds*, 3rd ed., Pergamon Press, England, 1982.
- Mehta S. K., Gaur J. P., Heavy-Metal-Induced Proline Accumulation and Its Role in Ameliorating Metal Toxicity in *Chlorella Vulgaris*, *The New Phytologist*, 1999, **143**(2), 253-259.
- McClung C. R., Regulation of Catalases in *Arabidopsis*, *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, **23**(3), 489-496.
- McDowell J. M., Dangl J. L., Signal Transduction in the Plant Immune Response, *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, **25**, 79-82.
- Mishra S., Dubey, R. S., Inhibition of Ribonuclease and Protease Activities in Arsenic Exposed Rice Seedlings: Role of Proline as Enzyme Protectant, *Journal of Plant Physiology*, 2006, **163**(9), 927-936.
- Muehlbauer F. J., Seed Yield Components in Lentil, *Crop Science*, 1974, **14**, 403-406.
- Muehlbauer F. J., Tullu A., *Lens culinaris* Medik, *New Crop Fact Sheet*, Purdue University Publishing, Purdue, 1997.
- Mueller R. L., First-generation Agents: Aspirin, Heparin and Coumarins, *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2004, **17**, 23-53.
- Murray R. D. H., Mendez J., Brown S. A., Coumarin Activity in Plants and Bioorganism Aspects, *John Wiley*, 1982, **2**, 45-55.

Mutlu S., Atıcı, O., Allelopathic Effect of *Nepeta Meyeri* Benth. Extracts on Seed Germination and Seedling Growth of Some Crop Plants, *Acta Physiologiae Plantarum*, 2009, **31**(1), 89-93.

Naidu B. P., Paleg L. G., Aspinall D., Jennings A. C., Jones G. P., Amino Acid and Glycine Betaine Accumulation in Cold-Stressed Wheat Seedlings, *Phytochemistry*, 1991, **30**(2), 407-409.

Natella F., Nardini M., Di Felice M., Scaccini C., Benzoic and Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidants, Structure-Activity Relation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, **47**, 1453-1459.

Nei M., Genetic Distance Between Populations, *Am. Nat.*, 1972, **106**, 283-292.

Neill S., Desikan R., Hancock J., Hydrogen Peroxide Signaling, *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, **5**, 388–395.

Noctor G., Veljovic-Jovanovic S., Foyer C. H., Peroxide Processing in Photosynthesis: Antioxidant Coupling and Redox Signalling, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2000, **355**(1402), 1465-1475.

Ntalli N. G., Ferrari F., Giannakou I., Menkissoglu-Spiroudi U., Phytochemistry and Nematicidal Activity of the Essential Oils From 8 Greek Lamiaceae Aromatic Plants and 13 Terpene Components, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, **58**(13), 7856-7863.

Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., Assay for Lipid Peroxidation in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction, *Annals of Biochemistry*, 1979, **95**, 351–358.

Olson M. M., Roseland C.R., Induction of the Coumarins Scopoletin and Ayapin in Sunflower by Insect-Feeding Stress and Effects of Coumarins on the Feeding of Sunflower Beetle (*Coleontara chrysolmelidae*), *Environ. Entomol.*, 1991, **20**, 1166-1172.

Ouzounidou G., Moustakas M., Eleftheriou E. P., Physiological and Ultrastructural Effects of Cadmium on Wheat (*Triticum Aestivum* L.) leaves, *Arc. Env. Toxic.*, 1997, **32**, 154- 160.

Önen H., Yılar M., Kaya C., Madımak (*Polygonum cognatum* Meissn.) Bitkisinin İçerdiği Fenolik Bileşikler, <http://bitkikoruma.yyu.edu.tr>, (Ziyaret Tarihi: 11 Mart 2016)

Öncel I., Keleş Y., Tuz Stresi Altındaki Buğday Genotiplerinde Büyüme, Pigment İçeriği ve Çözünür Madde Kompozisyonunda Değişmeler, *Fen Bilimleri Dergisi*, 2002, **23** (2), 8- 16.

Özdemir Ş., Brassicaceae Familyasından Bazı Bitkilere Ait Ekstraktların Yabancı Otlarla Mücadelede Biyo-Herbisit Olarak Kullanılabilme Olanaklarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay, 2007, 202751.

Özcan S., Gürel M., Babaoğlu M., Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, *Bitki Biyoteknolojisi II*, 2000, **20**, 261- 287.

Pamidimarri D., Singh S., Mastan S. G., Patel J., Reddy, M. P., Molecular Characterization and Identification of Markers for Toxic and Non-Toxic Varieties of *Jatropha Curcas* L. Using RAPD, AFLP and SSR Markers, *Molecular Biology Reports*, 2009, **36**(6), 1357-1364.

Panda B. B., Sahu U. K., Induction of Abnormal Spindle Function and Cytokinesis Inhibition in Mitotic Cells of *Allium Cepa* by the Organophosphorus Insecticide Fensulfothion, *Cytobios*, 2002, **42**, 147-155.

Patil B. C., Bhat G. L., A Comparative Study of MH And EMS In the Induction of Chromosomal Aberrations on Lateral Root Meristem in *Clitoria ternate* L., *Cytologia*, 1992, **57**, 259-264.

Patykowski J., Urbanek H., Activity of Enzymes Related to H₂O₂ Generation and Metabolism in Leaf Apoplastic Fraction of Tomato Leaves Infected with *Botrytis Cinerea*, *Journal of Phytopathology*, 2003, **151**, 153–161.

Pergo É. M., Abraham D., Da Silva P. C. S., Kern K. A., Da Silva L. J., Voll E., Ishii-Iwamoto E. L., *Bidens Pilosa* L. Exhibits High Sensitivity to Coumarin in Comparison with Three Other Weed Species, *Journal of Chemical Ecology*, 2008, **34**(4), 499- 507.

Polle A., Chakrabarti K., Chakrabarti S., Seifert F., Schramel P., Rennenberg H., Antioxidants and Manganese Deficiency in Needles of Norway Spruce (*Picea Abies* L.) Trees, *Plant Physiol*, 1992, **99**, 1084- 1089.

Polle A., Junkermann W., Inhibition of Apoplastic and Symplastic Peroxidase Activity From of Norway Spruce by the Photooxidant Hydroxymtyl Hydroperoxide, *Plant Physiol.*, 1994, **104**, 617-621.

Poontariga H., Darinee P., Kannarat R., Charoensataporn R., Salinity Effects on Antioxidant Enzymes in Mulberry Cultivars, *Science Asia*, 2003, **29**, 109-113.

Prasad K. V. S. K., Saradhi P. P., Effect of Zinc on Free Radicals and Proline in Brassica and Cajanus, *Phytochemistry*, 1995, **39**(1), 45-47.

Radic S., Stipanicev D., Cvjetko P., Mikelic I. L., Rajcic M. M., Sirac S., Pevalek-Kozlina B., Pavlica P., Ecotoxicological Assessment of Industrial Effluent Using Duckweed (*Lemna Minor* L.) as a Test Organism, *Ecotoxicology*, 2010, **16**, 216-222

Ramachandra Rao R. S., Ravishankar G. A., Plant Cell Cultures: Chemical Factories of Secondary Metabolites, *Biotechnology Advance*, 2002, **20**, 101-153.

Ramagopal S., Salinity Stress Induced Tissue-specific Proteins in Barley Seedlings, *Plant Physiology*, 1987, **84**, 324-331.

Rand, G.M., Wells, P.G., McCarty, L.S., *Introduction to Aquatic Toxicology, Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*, Taylor and Francis Publishers, North Palm Beach, Florida, 1995.

Rank J., Nielsen M. N., Evaluation of *Allium Cepa* Anaphase- Telophase Test in Relation to Genotoxicity Screening of Industrial Wastewater, *Mutation Research*, 1994, **312**, 17-24.

Rapley B. I., Rowland R. E., Page W. H., Podd J. V., Influence of Extremely Low Frequency Magnetic Fields on Chromosomes and the Mitotic Cycle in *Vicia faba* L. the Broad Bean, *Bioelectromagnetics*, 1998, **19**, 152-161.

Raven P. H., Johnson G., *Biology*, 5th Ed., WCB/McGraw-Hill, Boston, 1999.

Razavi S. M., Imanzadeh G. H., Davari M., Coumarins from *Zosima Absinthifolia* Seeds with Allelopathic Effects, *EurAsia. J. Biosci*, 2010, **4**, 17-22.

Razavi S. M., Plant Coumarins as Allelopathic Agents, *International Journal of Biological Chemistry*, 2011, **5**, 86-90.

Reda A. S., El-Banhewy E. M., Effects of Coumarin and Gallic Acid, Allochemicals on Survival, Development and Reproduction of The Two Spotted Spider Mite, *Tetranychus Urtica.*, *Int. J. Acaro.*, 1986, **12**, 259-262.

Reigosa M. J., Pedrol N., Gonzalez L., *Allelopathy, a Physiological Process with Ecological Implications*, Springer, Dordrecht, 2006.

Reigosa M. J., Souto X. C., Gonz L., Effect of Phenolic Compounds on the Germination of Six Weeds Species, *Plant Growth Regul*, 1999, **28**, 83–88.

Reigosa M. J., Pedrol N., Sanchez–Moreira A. M., Gonzales L., Stress and Allelopathy, Editors: Reigosa M. J., Pedrol N., *Allelopathy, from Molecules to Ecosystems*, Science Publishers, Enfield, New Hampshire, 231- 256, 2002.

Ren C. G., Li X., Liu X. L., Wei X. D., Dai C. C., Hydrogen Peroxide Regulated Photosynthesis in C4-Pepc Transgenic Rice, *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, **74**, 218-229.

Rhee S. G., Redox Signaling: Hydrogen Peroxide as Intracellular Messenger, *Experimental and Molecular Medicine*, 1999, **31**, 53–59.

Rice E.L., Allelopathy — An Overview. Editors: Cooper-Driver G.A., Swain T., Conn E.E. *Chemically Mediated Interactions between Plants and Other Organisms. Recent Advances in Phytochemistry*, Springer, Boston, 81-99, 1985.

Robison J. G., Pendleton A. R., Monson K. O., Murray B. K., O’neill L., Decreased DNA Repair Rates and Protection from Heat Induced Apoptosis Mediated by Electromagnetic Field Exposure, *Bioelectromagnetics*, 2002, **23**, 106-112.

Rock C. D., Pathways to Abscisic Acid-Regulated Gene Expression, *New Phytologist*, 2000, **148**, 357-396.

Rodríguez S. A., Nazareno M. A., Baumgartner M. T., Effect of Different C3- Aryl Substituents on the Antioxidant Activity of 4-Hydroxycoumarin Derivatives', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011, **19**, 6233–6238.

Rojkind M., Domínguez-Rosales J. A., Nieto N., Greenwel P., Role of Hydrogen Peroxide and Oxidative Stress in Healing Responses, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2002, **59**, 1872–1891.

Saleh K., Mikronükleus Testi ile bazı Kimyasal maddelerden ve Çevre Kirleticilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye, 1997, 58210.

Saleh A. M., El-Soud W. A., Evidence for “Gibberellin-Like” Activity of Coumarin, *South African Journal of Botany*, 2015, **100**, 51-57.

Saleh A. M., Madany M. M., González L., The Effect of Coumarin Application on Early Growth and Some Physiological Parameters in Faba Bean (*Vicia faba* L.), *Journal of Plant Growth Regulation*, 2015, **34**(2), 233-241.

Saleh A. M., Madany M. M. Y., Coumarin Pretreatment Alleviates Salinity Stress in Wheat Seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry*, 2015, **88**, 27-35.

Saleh A. M., Kebeish R., Coumarin Impairs Redox Homeostasis in Wheat Aleurone Layers, *Journal of Plant Research*, 2017, **1**, 1-7.

Sampietro D. A., Catalan C. A. N., Vattuone M. A., *Isolation, Identification and Characterization Of Allelochemicals/Natural Products*, CRC Press, Boca Raton FL, 2009.

Sampson J. B., Beckman J. S., Hydrogen Peroxide Damages The Zinc-Binding Site of Zinc-Deficient Cu,Zn Superoxide Dismutase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, **392**(1), 8–13.

Sanyal R., Darroudi F., Parzefall W., Nagao M., Knasmüller S., Inhibition of The Genotoxic Effects of Heterocyclic Amines in Human Derived Hepatoma Cells by Dietary Bioantimutagens, *Mutagenesis*, 1997, **12**, 297-303.

Scandalios J. G., Oxygen Stress and Superoxide Dismutases, *Plant Physiol.*, 1993, **101**, 7-12.

Scandalios G. D., Regulation and Properties of Plant Catalases, Editors: Foyer C. H., Mullineaux P. M., *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton FL, 275- 315, 1994.

Scandalios J. G., Molecular Genetics of Superoxide Dismutase In Plants, Editor: Scandalios J. G., *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, USA, 527-565, 1997.

Schulze E., Kirscher S., Microtubule Dynamics in Interphase Cells, *Journal of Cell Biology*, 1996, **102**, 1020-1021.

Seigler D. S., Chemistry and Mechanisms of Allelopathic Interactions, *Agronomy Journal*, 1996, **88**(6), 876-885.

Sharma P., Dubey R. S., Lead Toxicity in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2005, **17**(1), 35-52.

Shettel N. L., Balke N. E., Plant Growth Response to Several Allelopathic Chemicals, *Weed Science*, 1983, **31**(3), 293-298.

Sepetoğlu H., *Yemeklik Dane Baklagiller*, Ders Kitabı, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir, 2002.

Shafaghat A., Antioxidant, Antimicrobial Activities and Fatty Acid Components of Leaf and Seed of *Bupleurum Lancifolium Hornem*, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, **5**(16), 3758-3762.

Sharma C. B. S. R., Plant Meristems as Monitors of Genetic Toxicity of Environmental Chemicals, *Current Science*, 1983, **52**, 1000-1002.

Shilling W., Longland, R., Crampton, C., Metabolism of Coumarin in Man, *Nature*, 1969, **221**, 664- 665.

Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Molecular Responses Dehydration and Low Temperature: Differences and Cross-Talk Between Two Signalling Pathways, *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, **3**, 217-223.

Sigel H., Sigel A., *Interrelations Between Free Radicals and Metal Ions in Life Processes*, 36, CRC Press, Boca Raton FL, 1999.

Singh P. K., Tewari R. K., Cadmium Toxicity Induced Changes in Plant Water Relations and Oxidative Metabolism of *Brassica Juncea* L. Plants, *Journal of Environmental Biology*, 2003, **24**, 107– 112.

Smirnoff N., Colombé S. V., Drought Influences The Activity of Enzymes of The Chloroplast Hydrogen Peroxide Scavenging System, *Journal of Experimental Botany*, 1988, **39**(8), 1097-1108.

Soberón J. R., Sgariglia M. A., Sampietro D. A., Quiroga E. N., Vattuone M. A., Free Radical Scavenging Activities and Inhibition of Inflammatory Enzymes of Phenolics Isolated from *Tripodanthus Acutifolius*, *Journal of ethnopharmacology*, 2010, **130**(2), 329-333.

Srivastava L. M., *Plant Growth and Development, Hormones and Environment*, Academic Press, California, 2002.

Stadtman E. R., Importance of Individuality in Oxidative Stress and Aging, *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, **33**, 597–604.

Stenlio G., Sadoik K., The Effect of Some Growth Regulators and Uncoupling Agents Upon Oxidative Phosphorylation in Mitochondria of Cucumber Hypocotyls, *Physiol. Plant.*, 1962, **15**, 369-379.

Stevenson P., Simmonds M. S. J., Yule M. A., Veitch N. C., Kite G. C., Irwin D., Legg M., Insect Antifeedent Furanocoumarins from *Tetradium Daniellii*, *Phytochemistry*, 2003, **63**, 42-46.

Stopper H., Schmitt E., Kobras K., Genotoxicity of phytoestrogens, *Mutation Research*, 2005, **574**, 139-155.

Streb P., Shang W., Feierabend J., Resistance to Cold-Hardenedwinter Rye Leaves (*Secale Cereale* L.) to Photo-Oxidative Stress, *Plant Cell and Environment*, 1999, **22**, 1211- 1223.

Strobel G. A., Daisy B., Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products, *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, **67**, 491– 502.

Summiaya R., Shahnaz D., Treatment of Lentil (*Lens Culinaris*. L) Seeds with Various Concentrations of Salts to Check Their Efficiency Against Seed-Borne Mycoflora During Storage, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2012, **45**(16), 1891–1901.

Sürek, D., Karakurt, E., Meyveci, K., Yürürer, A., Karaçam, M., Özdemir, B., Avcı, M. Meyveci-2001 Yazlık Yeşil Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) Çeşidinde Uygun Tohum Miktarının Belirlenmesi, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2014, **20**, 22-28.

Şehirli S., *Yemeklik Dane Baklagiller*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 1988.

Tadeg H., Mohammed E., Asres K., Mariam T.G., Antimicrobial Activities Of Some Selected Traditional Ethiopian Medicinal Plants Used in The Treatment of Skin Disorders, *Journal of Ethnopharmacol*, 2005, **100**(1), 168-175.

Taiz L., Zeiger E., *Plant Physiology*, 3rd ed., Sinauer, Sunderland, 2002.

Taşdemir E., Atmaca M., Yıldırım Y., Bilgin H. M., Demirtaş B., Obay B. D., Oflazoğlu H. D., Influence of Coumarin and Some Coumarin Derivatives on Serum Lipid Profiles in Carbontetrachloride-Exposed Rats, *Human & Experimental Toxicology*, 2017, **36**(3), 295-301.

Temizkan G., Arda N., *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, 2. Basım, İstanbul Üniversitesi BİYOGEM, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2004.

Tewari R. K., Kumar P., Sharma P. N., Magnesium Deficiency Induced Oxidative Stress and Antioxidant Responses in Mulberry Plants, *Sci Horti-Amst*, 2006, **108**, 7– 14.

Tjus S. E., Scheller H. V., Andersson B., Møller B. L., Active Oxygen Produced During Selective Excitation of Photosystem I is Damaging not Only to Photosystem I, But Also to Photosystem II, *Plant Physiology*, 2001, **125**, 2007– 2015.

Toğay Y., Toğay N., Doğan Y., Çiftçi V., Effects of Nitrogen Levels and forms on the Yield and Grain Components of Lentil (*Lens culinaris Medic.*), *Asian Journal of Plant Sciences*, 2005, **4**(1), 64-66.

Topaktaş M., Rencüzoğulları E., *Sitogenetik*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2010.

Traykova M., Kostova I., Coumarin Derivatives and Oxidative Stres, *International Journal of Pharmacology*, 2005, **1**(1), 29-32.

Turan E., Sarı Ulak Tarsus Zeytini ve Siyah Çaydan Elde Edilen Fenolik Ekstraktların Antioksidan Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye, 2005, 198053.

Türkan I., *Oksidatif Stres ve Bitkilerde Antioksidant Savunma Sistemleri*, Biyolojik Bilimlerde Araştırma Yöntemleri Yaz Okulu, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir, 2002.

Türkoğlu Ş., Determination of Genotoxic Effects of Chlorfenvinphos and Fenbuconazole in *Allium Cepa* Root Cells by Mitotic Activity, Chromosome Aberration, DNA Content, and Comet Assay, *Pestic. Biochem. Phys.*, 2012, **103**, 224-230.

Türkyılmaz B., Sodyum Klorürün Bazı Arpa (*Hordeum vulgare L.*) Kültür Çesitlerinde Mineral Beslenme ve Protein Metabolizması Üzerine Etkileri, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2004, 149759.

Tütünoğlu B., Gibberellik Asitin (GA3) *Allium Cepa L.* Var. Ceba (Alliaceae) Üzerindeki Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli, 2015, 423767.

Uncuoğlu A. A., Arpa (*Hordeum vulgare L.*) ve Buğday (*Triticum aestivum L.*)'da Kuraklığa Dirençli Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Tanımlanması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2001, 105421.

Quan L. J., Zhang B., Shi W. W., Li H. Y., Hydrogen Peroxide in Plants: A Versatile Molecule of the Reactive Oxygen Species Network, *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, **50**, 2-18.

Vardar F., Ünal M., Tralkoksidim Ve Proklorazın Arpa (*Hordeum Vulgare L.* Cv Efes) Köklerinde Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkileri, *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2009, **21**, 29-35.

Verma B., Huci P., Chibbar R. N., Phenolic Acid Composition and Antioxidant Capacity of Acid and Alkali Hydrolysed Wheat Bran Fractions, *Food Chemistry*, 2009, **116**, 947-954.

Ventura-Camargo B. C., Maltempi P. P. P., Marin-Morales M. A., The Use of the Cytogenetic to Identify Mechanisms of Action of an Azo Dye in *Allium Cepa* Meristematic Cells, *J. Environment. Analytic. Toxicol.*, 2011, **1**, 1-12.

Vierstra R. D., Proteolysis in Plants: Mechanisms and Functions, *Plant Mol. Biol.*, 1996, **32**, 275-302.

Vijayan K., Approaches for Enhancing Salt Tolerance in Mulberry (*Morus L*) –A, Review, *Plant Omics Journal*, 2009, **2**(1), 41-59.

Vincent K., Probit Analysis: <http://userwww.sfsu.edu/~efc/classes/biol710/probit/Probitanalysis.pdf>, (Ziyaret tarihi: 30 Eylül 2016).

Vural N., *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fak.Yayınları, Ankara, 1984.

Vural N., *Toksikoloji Laboratuvar Kitabı*, Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 2000.

Vural N., *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 2005.

Wang H., Liang X., Huang J., Zhang D., Lu H., Liu Z., Bi Y., Involvement of Ethylene and Hydrogen Peroxide in Induction of Alternative Respiratory Pathway in Salt-treated *Arabidopsis* Calluses, *Plant and Cell Physiology*, 2010, **51**(10), 1754-1765.

Wang X. S., Han J. G., Changes of Proline Content, Activity, and Active Isoforms of Antioxidative Enzymes in Two Alfalfa Cultivars Under Salt Stress, *Agricultural Sciences in China*, 2009, **8**(4), 431-440.

Welsh J., McClelland M., Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers, *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**, 7213-7218.

Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Monyagu M. V., Inzé D., Camp W. V., Catalase is a Sink for H₂O₂ and is Indispensable for Stress Defence in C3 Plants, *EMBO J.*, 1997, **16**, 4806–4816.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V., DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers, *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**, 6531-6535.

Wilson J. J., Ingledew W. M., Isolation and Characterization of Schwanniomyces Alluvius Amylolytic Enzymes, *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, **44**(2), 301-307.

Wink M., Latzbruning B., Allelopathic Properties of Alkaloids and Other Natural-Products - Possible Modes of Action, *Allelopathy*, 1995, **582**, 117-126.

Wink M., *Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*, Blackwell Pub, New Jersey, 2010.

Wise R. R., Naylor A. W., Chilling-enhanced Photooxidation: Evidence of the Role of Singlet Oxygen and Endogenous Antioxidants, *Plant Physiol.*, 1987, **83**, 278-282.

Wolf H., Blust R., Backeljau T., The Use of RAPD in Ecotoxicology, *Mutation Research*, 2004, **566**, 249-262.

Wu C. A., Yang G. D., Meng Q. W., Zheng C. C., The Cotton Ghnhx1 Gene Encoding a Novel Putative Tonoplast Na⁺/H⁺ Antiporter Plays an Important Role in Salt Stress, *Plant Cell Physiology*, 2004, **45**, 600-607.

Wu C. R., Huang M. Y., Lin Y. T., Ju H. Y., Ching H., Antioxidant Properties of Cortex Fraxini and its Simple Coumarins, *Food Chemistry*, 2007, **104**, 1464–1471.

Wu C. X., Zhao G. Q., Liu D. L., Liu S. J., Gun X. X., Tang Q., Discovery and Weed Inhibition Effects of Coumarin as the Predominant Allelochemical of Yellow Sweetclover (*Melilotus officinalis*), *International Journal of Agriculture & Biology*, 2016, **18**(1), 168- 175.

Xiong H. X., Hu Y. X., Wang G. H., Fu Z. Q., Tan Ya G. A., Comparative Analyses of Soil Contaminant Levels and Plant Species Diversity at Developing and Disused Oil Well Sites in Qianjiang Oilfield, China, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1997, **58**, 667-672.

Xue-mei Q., Pei-jun L., Wan L., Li-jingly X., Multiple Biomarkers Response in Maize (*Zea Mays* L.) During Exposure to Copper, *Journal of Environmental Science*, 2006, **18**, 1182–1188.

Yan W., Dilday R. H., Helms R. S., Bourland F. M., Effects of Gibberellic Acid on Rice Germination and Seedling Emergence in Stress Conditions, *Arkansas Agricultural Experiment Station Research Series*, 2004, **517**, 303-316.

Yang S. L., Lan S. S., Gong M., Hydrogen Peroxide-Induced Proline and Metabolic Pathway of Its Accumulation in Maize Seedlings, *Journal of Plant Physiology*, 2009, **166**(15), 1694-1699.

Yentür S., *Bitki Anatomisi*, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İstanbul, 2003.

Yıldız M., Çiğerci İ. H., Konuk M., Fidan A. F., Terzi H., Determination of Genotoxic Effects of Copper Sulphate and Cobalt Chloride in *Allium Cepa* Root Cells by Chromosome Aberration and Comet Assays, *Chemosphere*, 2009, **75**, 934–938.

Yoshida Y., Nakamura K., Hiura A., Contraction of Chromosomes and Depression of RNA Synthesis by Isopropyl N-(3-Chlorophenyl) Carbamate (CIPC) in *Vicia faba*, *Cytologia*, 1983, **46**, 169-172.

Yüce B., Hesperidin, Rutin ve 7,8-Dihidroksi-3-(4-Metilfenil) Kumarin Bileşiklerinin Lipit Düşürücü ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006, 193630.

Zhiyi R., Haowen Y., A Method for Geotoxicity Detection Using Random Amplified Polymorphism DNA with *Danio Reio*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, **58**, 96-103.

Zhou X., Song H., Wang J., Effects of Coumarin on Net Nitrate Uptake and Nitrogen Metabolism in Roots of Alfalfa (*Medicago sativa*), *Allelopathy Journal*, 2013, **31**(2), 377- 386.





EKLER

Ek-A

Confidence Limits

| Probability | 95% Confidence Limits for KullanılanDoz | | |
|--------------------------|---|-------------|-------------|
| | Estimate | Lower Bound | Upper Bound |
| PROBIT ^a ,010 | 651,672 | 474,331 | 1472,819 |
| ,020 | 607,987 | 447,157 | 1347,418 |
| ,030 | 580,270 | 429,823 | 1267,948 |
| ,040 | 559,420 | 416,724 | 1208,226 |
| ,050 | 542,460 | 406,023 | 1159,692 |
| ,060 | 528,025 | 396,878 | 1118,419 |
| ,070 | 515,367 | 388,827 | 1082,263 |
| ,080 | 504,034 | 381,590 | 1049,918 |
| ,090 | 493,728 | 374,982 | 1020,528 |
| ,100 | 484,240 | 368,874 | 993,500 |
| ,150 | 444,959 | 343,276 | 881,905 |
| ,200 | 413,740 | 322,439 | 793,704 |
| ,250 | 386,957 | 304,041 | 718,558 |
| ,300 | 362,904 | 286,911 | 651,683 |
| ,350 | 340,616 | 270,282 | 590,469 |
| ,400 | 319,467 | 253,504 | 533,381 |
| ,450 | 299,005 | 235,882 | 479,536 |
| ,500 | 278,868 | 216,517 | 428,569 |
| ,550 | 258,730 | 194,112 | 380,640 |
| ,600 | 238,268 | 166,810 | 336,476 |
| ,650 | 217,119 | 132,299 | 297,121 |
| ,700 | 194,831 | 88,459 | 263,118 |
| ,750 | 170,779 | 33,886 | 233,686 |
| ,800 | 143,995 | -32,884 | 206,912 |
| ,850 | 112,776 | -115,352 | 180,343 |
| ,900 | 73,495 | -222,873 | 150,671 |
| ,910 | 64,008 | -249,221 | 143,882 |
| ,920 | 53,701 | -277,963 | 136,627 |
| ,930 | 42,368 | -309,688 | 128,770 |
| ,940 | 29,710 | -345,247 | 120,122 |
| ,950 | 15,275 | -385,939 | 110,395 |

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Yüksel, B. Healthy Life and Nutrition, Editors: Ozdemir, B., Shapekova, N.L., Ak, B., Yıldız, H., Ozcanarlan, F., Ivanova, L., *Developments in Health Sciences*, 2nd ed., Sofia St.Kliment Ohridski University Publishing, Sofya, 473-478, 2017.

Yüksel, B., Aksoy, Ö., Cytological Effects of Coumarin on Mitosis of Lens Culinaris Medik, *Fresenius Environmental Bulletin*, 2017, **26**(11), 6400-6407.

Boga, S., Arsal S., Tastan, R., **Yüksel B.**, Külcü N., Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Öğrencilerinde Sağlıklı Yaşam Biçimi Davranışları ve Depresyon Düzeylerinin İncelenmesi, *4. Ulusal Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulları Sempozyumu*, İstanbul, Türkiye, 15-18 Kasım 2017.

Yüksel, B., Aksoy, Ö., Effect of Coumarin on Proline, Malondialdehyde and Alpha Amylase Activity in *Lens culinaris* Medik, *XIII. Congress of Ecology and Environment with International Participation*, (UKECEK) Edirne, Türkiye, 12- 15 Eylül 2017.

Yüksel, B., Aksoy, Ö., Cytological Effects of Coumarin on Mitosis of *Lens Culinaris* Medik, *International Conference on Biochemistry and Molecular Biology*, Münih, Almanya, 03- 05 Nisan 2017.

Yüksel, B., Yüksel, D., Students' Perceptions about a Medical Terminology course. *5th World Conference on Educational Sciences, WCES*, Roma, İtalya, 05-08 Şubat 2013.

Yenikaya C., Sarı M., Bülbül M., İlkimen H., **Çınar (Yüksel) B.**, Büyükgüngör O., Synthesis and Characterisation of Two Novel Proton Transfer Compounds and their Inhibition Studies on Carbonic Anhydrase Isoenzymes, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2011, **26**(1), 104-114.

Aydın, S., Bülbül, M., Aktan Y, Gökçe, B., Çelik, H., **Çınar (Yüksel) B.**, Karbonik Anhidraz İnhibitörleri Olarak 5-Amino-1,3,4-Tiyadiyazol-2-Sülfonamid Bileşiğinin Amid Türevlerinin in vivo İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi, *V. Ulusal Afinité Teknikleri Kongresi*, Balıkesir, Türkiye, 20-24 Mayıs 2009.

ÖZGEÇMİŞ

23/04/1985 tarihinde Bilecik’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Bilecik’te tamamladı. 2003 yılında Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümünü kazandı ve 2008 yılında buradan mezun oldu. 2008-2010 yıllarında Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya alanında yüksek lisansını yaptı. 2010-2014 yılları arasında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsünde doktora çalışmaları yaptı. 2010-2012 yılları arasında Bilecik Üniversitesi Pazaryeri Meslek Yüksek Okulunda, 2012 yılından beri ise Kocaeli Üniversitesi Kocaeli Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulunda Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır.