

**MARULDA (*Lactuca sativa L.*) UV-B STRESİNE  
TOLERANS ÜZERİNE PROLINİN DÜZENLEYİCİ  
ETKİSİNİN MOLEKÜLER, BİYOKİMYASAL ve  
FİZYOLOJİK DÜZEYDE  
BELİRLENMESİ**

**Dilruba TABAY**

**Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı  
2014**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MARULDA (*Lactuca sativa L.*) UV-B STRESİNE TOLERANS  
ÜZERİNE PROLINİN DÜZENLEYİCİ ETKİSİNİN MOLEKÜLER,  
BİYOKİMYASAL ve FİZYOLOJİK DÜZEYDE BELİRLENMESİ

Dilruba TABAY

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM  
2014

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

MARULDA (*Lactuca Sativa L.*) UV-B STRESİNE TOLERANS ÜZERİNE PROLINİN DÜZENLEYİCİ ETKİSİNİN MOLEKÜLER, BİYOKİMYASAL VE FİZYOLOJİK DÜZEYDE BELİRLENMESİ

Doç. Dr. Özken AKSAKAL danışmanlığında, Dilruba TABAY tarafından hazırlanan bu çalışma 25/12/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı-Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Serkan ERDAL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hakan AŞKIN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özkan AKSAKAL

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu . 21 . / . 12 . / . 2014 . tarih ve . 52 . / . 1751 . nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEYOĞLU  
Enstitü Müdürü

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

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### MARULDA (*Lactuca sativa* L.) UV-B STRESİNE TOLERANS ÜZERİNE PROLINİN DÜZENLEYİCİ ETKİSİNİN MOLEKÜLER, BİYOKİMYASAL VE FİZYOLOJİK DÜZEYDE BELİRLENMESİ

Dilruba TABAY

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özkan AKSAKAL

Ultraviyole B (UV-B) radyasyonu önemli çevresel stres faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Prolin, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı bitkinin savunmasında rol alan önemli bir moleküldür.

Bu tezde UV-B stresine maruz kalan marul (*Lactuca sativa*) fidelerinin strese karşı direnç oluşturmada eksojen prolinin rolünü belirlemek amacıyla, marul fidelerine 10 mM ve 20 mM prolin uygulandıktan sonra fideler 3.3 W m<sup>-2</sup> UV-B radyasyonuna 12 saat maruz bırakılmış ve fide yapraklarında antioksidan enzim (askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), peroksidaz (POD) ve süperoksit dismutaz (SOD)) aktiviteleri, malondialdehit (MDA) seviyesi, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) miktarı, toplam fenolik madde miktarı, antioksidan kapasite, bazı bitkisel hormonların (absisik asit (ABA), gibberellik asit (GA), indol asetik asit (IAA) ve salisilik asit (SA)) miktarı, çözünebilir şekerlerin (glukoz, fruktoz, sükroz ve maltoz) oranları, amino asit miktarları ve çeşitli makro-mikro elementlerin konsantrasyonlarındaki değişiklikler ölçülmüştür. Yine bitkilerde fenilpropanoidlerin ve  $\alpha$ -tokoferolün sentezinde yer alan fenilalanin amonyak liyaz (PAL) ve  $\gamma$ -tokoferol metiltransferaz ( $\gamma$ -TMT) genlerinin ifadesindeki değişiklikler de belirlenmiştir.

One-way anova sonuçlarına göre PAL ve  $\gamma$ -TMT gen ifadesinin, APX, CAT, POD, SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinin, MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, toplam fenolik madde miktarı, çözünebilir şekerlerin konsantrasyonları ve antioksidan kapasitenin UV-B, prolin ve UV-B+prolin uygulamalarından önemli ölçüde etkilendiği ve bu parametrelerin kontrole göre UV-B ve UV-B+prolin uygulamalarında artış gösterdiği belirlenmiştir. Yine bitkisel hormonlardan ABA ve SA miktarının UV-B stresi ile birlikte arttığı, GA ve IAA miktarının azaldığı, UV-B uygulamasından 24 saat önce fide yapraklarına uygulanan prolinin bu hormonların miktarında değişikliklere yol açtığı tespit edilmiştir. UV-B, prolin ve UV-B+prolinin marul yapraklarında ölçülen çeşitli amino asitlerin konsantrasyonlarında değişiklik oluşturduğu, yapraklardaki makro-mikroelement miktarlarının prolin ve UV-B uygulamalarından önemli ölçüde etkilendiği de belirlenmiştir.

**2014, 65 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Absisik asit, Antioksidan enzim, Gibberellik asit, Hidrojen peroksit, Indol asetik asit, *Lactuca sativa*, Malondialdehit, PAL, Prolin, UV-B, Salisilik asit,  $\gamma$ -TMT

## ABSTRACT

Master Thesis

### DETERMINATION of REGULATIVE EFFECT of EXOGENOUS PROLINE on UV-B STRESS TOLERANCE in LETTUCE (*Lactuca sativa* L.) at MOLECULAR, BIOCHEMICAL, and PHYSIOLOGICAL LEVELS

Dilruba TABAY

AtaturkUniversity  
Graduate School of Natural and Applied Science  
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özkan AKSAKAL

Ultraviolet-B radiation (UV-B, 280–320 nm) is recognized as one of the environmental stress factors that cannot be neglected. Proline is an important molecule in a plant's defense against biotic and abiotic stresses.

In this research, to determine the role of exogenous proline in the resistance of lettuce (*Lactuca sativa*) to stress from UV-B radiation, lettuce seedlings were exposed to 3.3 W m<sup>-2</sup> UV-B radiation for 12 h after pretreatment with 10 and 20 mM proline, and the activity of antioxidant enzymes (ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD)), the level of malondialdehyde (MDA), the content of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), total phenolic concentrations, antioxidant capacity, the content of some phytohormones (abscisic acid (ABA), gibberellic acid (GA), Indole acetic acid (IAA), salicylic acid (SA)), the level of soluble sugars (glucose, fructose, sucrose and maltose), the content of various amino acids and the concentrations of some macro-micro elements were measured.

The results of one-way ANOVA illustrated that PAL and  $\gamma$ -TMT gene expression, the activities of APX, CAT, POD, SOD, MDA level, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content, soluble sugars level, total phenolic concentrations, antioxidant capacity were significantly affected by UV-B, proline, and UV-B+proline and all of these parameters were provoked by UV-B and UV-B+proline compared to the control. Moreover, under the UV-B conditions, the endogenous GA and IAA content decreased, while a significant increase in the endogenous ABA and SA contents were determined. Meanwhile the combination of UV-B and proline caused some changes in measured phytohormones. On the other hand, the concentrations of various amino acids and macro-micro elements in lettuce leaves were changed by UV-B with or without the presence of pretreatment proline.

**2014, 65 pages**

**Keywords:** Abscisic acid, Antioxidant enzymes, Gibberellic acid, Hydrogen peroxide, Indole acetic acid, *Lactuca sativa*, Malondialdehyde, PAL, Proline, UV-B, Salicylic acid,  $\gamma$ -TMT

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu araştırma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Araştırmanın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde her türlü desteği sağlayan danışmanım, Sayın Doç. Dr. Özkan AKSAKAL'a, Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamız esnasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Feyza AKSAKAL'a, deneysel çalışmalarına yardım eden arkadaşım Sayın Raziye AKAR'a ve ayrıca laboratuvardaki çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın tamamlanmasındaki bu önemli süreçte, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, kıymetli babam Ahmet TABAY'a ve değerli annem Sevilay TABAY'a eğitimimi tamamlamamı sağladıkları için şükranlarımı sunarım.

**Dilruba TABAY**

**Aralık 2014**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>16</b>
3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	16
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	17
3.3. Yöntemler.....	19
3.3.1. Bitkilerin Büyütülmesi.....	19
3.3.2. Marul yapraklarında toplam azot miktarının belirlenmesi.....	20
3.3.3. Marul yapraklarında makro ve mikro elementlerin miktarının belirlenmesi ...	20
3.3.4. Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) miktarının belirlenmesi.....	20
3.3.5. Lipid peroksidasyon aktivitesinin belirlenmesi.....	21
3.3.6. Antioksidant enzim ekstraksiyonu.....	22
3.3.6.a. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin belirlenmesi.....	22
3.3.6.b. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi.....	22
3.3.6.c. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi.....	23
3.3.6.d. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi.....	23
3.3.7. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi.....	24
3.3.8. Antioksidan kapasite.....	25
3.3.9. Glukoz, fruktoz, maltoz ve sükroz miktarının belirlenmesi.....	25
3.3.10. Organik asitlerin miktarının belirlenmesi.....	26
3.3.11. Hormonların ekstraksiyon, saflaştırma ve analiz işlemleri.....	26
3.3.11.a. Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri.....	26
3.3.11.b. Şartlandırma işlemi.....	27

3.3.11.c. Hormonların analizi .....	27
3.3.12. Amino asit miktarının belirlenmesi .....	29
3.3.13. Gen ekspresyonu çalışmaları .....	30
3.3.13.a. RNA'nın kantitatif tayini .....	31
3.3.13.b. cDNA sentezi .....	31
3.3.13.c. Real time PCR uygulamaları .....	31
3.3.14. Gen ekspresyonu hesaplamaları .....	32
3.3.15. İstatistiksel analiz .....	32
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>33</b>
4.1. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda Prolin Uygulamalarının Marul Fidelerinde Makro-Mikro Element Üzerine Etkileri .....	36
4.2. Malondialdehit (MDA) ve Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) Miktarı .....	38
4.3. Antioksidan Enzim Aktiviteleri .....	38
4.4. Bazı Bitkisel Hormonların Miktarı .....	39
4.5. Antioksidan Kapasite ve Toplam Fenolik Madde Miktarı .....	41
4.6. Marul Yapraklarına Ait Dokulardan Elde Edilen RNA'lara Ait Konsantrasyon ve 260/280 Oranları .....	41
4.7. PAL ve $\gamma$ -TMT mRNA Seviyesi .....	43
4.8. Çözünebilir Şeker ve Organik Asit Miktarları .....	44
4.9. Amino Asit Miktarları .....	44
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>49</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>58</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>66</b>



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	Absisik Asit
APX	Askorbat peroksidaz
CAT	Katalaz
cDNA	Komplementer DNA
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Deoksiribonükleosid trifosfat
E.U.	Enzim ünitesi
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EtBr	Etidyum bromür
GA	Giberallilik asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IAA	İndol Asetik Asit
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mM	Milimolar
NBT	Nitroblue tetrazolium klorür
nmol	Nano mol
NO	Nitrik Oksit
NR	Nitrat Redüktaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFO	Polifenol oksidaz
POX	Peroksidaz
PVP	Polivinilpirrolidon
RNA	Ribonükleikasit
ROT	Reaktif oksijen türleri
rpm	Devir/dakika
SA	Salisilik Asit
SOD	Süperoksit dismutaz
SNP	Sodyum nitro prussid

TBA	Tiobarbutirik asit
TCA	Trikloroasetik asit
TEAA	Trietil Amonyum Asetat
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
$\mu\text{M}$	Mikromolar

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. UV-B radyasyonunun etkileri.....	2
Şekil 1.2. UV-B'ye maruz kalan bitkilerin ROT üretimi .....	4
Şekil 3.1. Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik ..	21
Şekil 3.2. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik .....	24
Şekil 3.3. Hormonlara ait HPLC kromatogramı .....	28
Şekli 4.1. Kontrol grubu marul fidelerinin genel görünümü .....	33
Şekil 4.2. Prolin-1 uygulanmış marul fidelerinin genel görünümü .....	34
Şekil 4.3 Prolin-2 uygulanmış marul fidelerinin genel görünümü .....	34
Şekil 4.4. On iki saat UV-B uygulanmış marul fidelerinin genel görünümü .....	35
Şekil 4.5. On iki saat UV-B+Prolin 1 uygulanmış marul fidelerinin genel görünümü ..	35
Şekil 4.6. On iki saat UV-B+Prolin 2 uygulanmış marul fidelerinin genel görünümü ..	36
Şekil 4.7. Prolin ve 12 saat UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında MDA ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeriği .....	38
Şekil 4.8. Prolin ve 12 saat UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında antioksidan enzim içeriği .....	39
Şekil 4.9. Prolin ve 12 saat UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında bazı hormonların içeriği .....	40
Şekil 4.10. Prolin ve 12 saat UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında toplam antioksidan ve toplam fenolik madde içeriği .....	41
Şekil 4.11. Örnek Real-time PCR amplifikasyon görüntüsü .....	42
Şekil 4.12. Genlere ait örnek standart eğri etkinlik oranı .....	43
Şekil 4.13. UV-B ve prolin uygulanmış marul yapraklarında PAL ve $\gamma$ -TMT mRNA seviyesi .....	44
Şekil 4.14. UV-B ve prolin uygulanmış marul yapraklarında organik asit seviyeleri (ng/ $\mu$ l).....	47

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> RT PCR için kullanılacak spesifik primerler.....	32
<b>Çizelge 4.1.</b> Prolin ve 12 saat UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarındaki makro ve mikro element içeriği.....	37
<b>Çizelge 4.2.</b> Uygulama gruplarına ait RNA konsantrasyon ve absorbanans değerleri.....	43
<b>Çizelge 4.3.</b> Prolin ve 12 saat UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında çözünebilir şeker içeriği ( $\text{nmol g}^{-1}$ FW).....	46
<b>Çizelge 4.4.</b> Prolin ve 12 saat UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında amino asit içeriği ( $\text{pmol}/\mu\text{l}$ ) .....	48

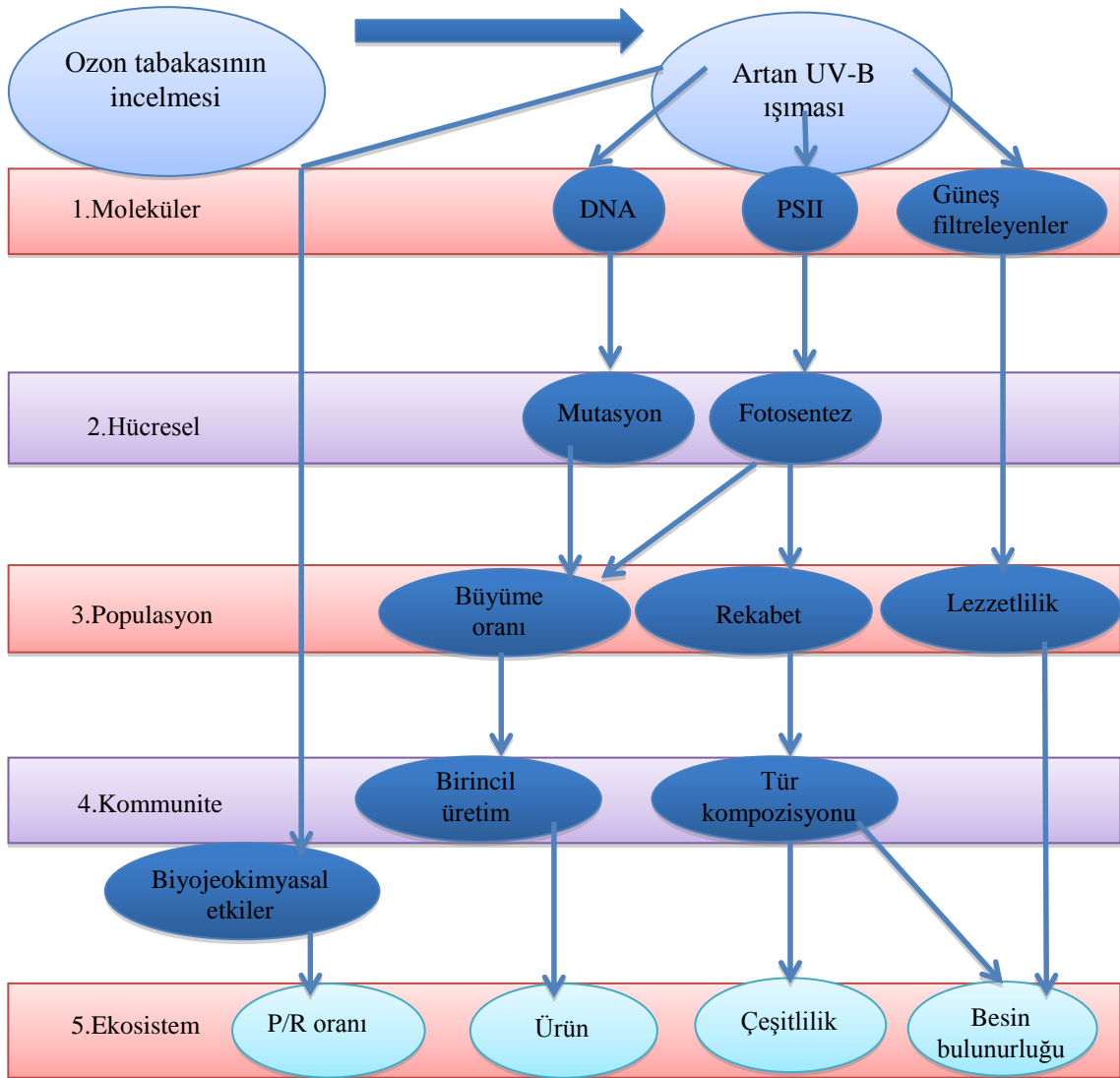
## 1. GİRİŞ

Çevre şartlarının bir canlının normal gelişme ve büyümesini olumsuz yönde etkileyecek kadar değişmesi halinde canlılarda oluşan durum stres olarak tanımlanmaktadır. Canlı varlıklar yaşamları boyunca çok sayıda stres faktörü ile karşılaşmaktadır. Stres faktörleri biyotik ve abiyotik faktörler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Biyotik stres faktörleri arasında virüs, bakteri ve mantar enfeksiyonları, zararlı böcekler yer alırken, abiyotik stres faktörlerini su fazlalığı, kuraklık, tuzluluk, sıcak, soğuk, çeşitli kimyasallar, topraktaki besin yetersizliği, manyetik ve elektriksel alanlar, ultraviyole radyasyonu oluşturmaktadır.

Halojenler, hidrokarbonlar ve stratosfere ulaşan diğer ozon azaltıcı kimyasallar gibi antropojenik kirleticilerin oluşturduğu stratosferik ozon tabakası incilmesi ve buna bağlı olarak abiyotik stres koşulları arasında yer alan solar ultraviyole radyasyonundaki artış üzerine ilgi son yıllarda dikkate değer bir biçimde artmıştır (Santa-Cruz *et al.* 2010 Liu *et al.* 2012). Ozon tabakasındaki incelme ultraviyole radyasyonunda önemli bir artışa ve yeryüzüne ulaşan spektral UV kompozisyonunda değişime yol açmıştır (Rai *et al.* 2011). Bu durumun gelecekte de devam etmesi tahmin edilmektedir.

Güneş ışınlarında mevcut olan radyasyon UV-A, UV-B ve UV-C olmak üzere üç sınıfa ayrılmıştır. 320 ile 390 nm arasında dalga boyuna sahip UV-A ozon tabakası tarafından tutulur (UV-A ve UV-C atmosferdeki gazlar tarafından absorplanır) ve bu yüzden stratosferik ozon incelmesinden etkilenmez. UV-C 280 nm den daha kısa dalga boyuna sahip ışınlardır ve yer yüzeyine erişmezler. 280-315 nm dalga boyu aralığındaki UV-B radyasyonu ise ozon tarafından absorbe edildiğinden dolayı en fazla dikkat çekicidir. Stratosferik ozon azalmasına bağlı olarak yer kabuğundaki günlük UV-B miktarı artmaktadır (Ormrod and Hale 1995). Biyosferdeki bütün canlı organizmalar, solar açığı ve stratosferik ozon tabakasının kalınlığıyla değişime uğrayan şiddetteki UV-B radyasyonuna maruz kalırlar (Zlatev *et al.* 2012). UV-B'nin artış miktarı temelde enlem derecesine bağlıdır ve en büyük artış kuzey ve güney kutuplarındadır. Kuzey kutbunda ozon tabakasının incelme dönemi kış ve ilkbahar mevsimi, güney kutbunda ise eylül ve

ekim aylarıdır. UV-B total solar radyasyonun sadece küçük bir bileşeni (%0.5) olmasına rağmen, sahip olduğu yüksek enerjisinden dolayı yalnızca miktarındaki büyük artışlar değil küçük artışlarda olağanüstü biyolojik hasar oluşturma potansiyelindedir (Şekil 1.1) (Frohnmeier and Staiger 2003; Zlatev *et al.* 2012; Nawkar *et al.* 2013).



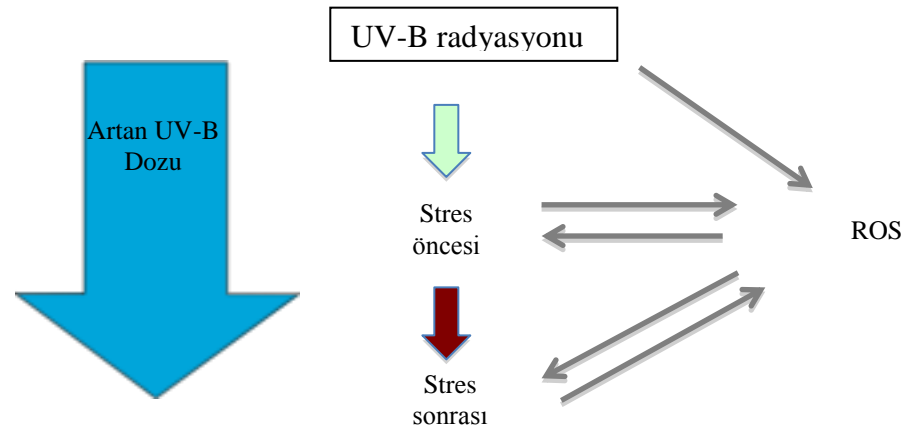
**Şekil 1.1.** UV-B radyasyonunun etkileri (Dahlback *et al.* 2002)

Bitkiler büyüme ve gelişme için güneş ışınlarını absorbe eden sesil organizmalar olduklarından dolayı, güneşten yayılan UV-B radyasyona maruz kalmaları kaçınılmazdır (Tossi *et al.* 2011). Bitkilerde UV-B radyasyonuna yanıt olarak tür içi ve

türler arasında büyüme, kuru madde üretimi, fizyolojik ve biyokimyasal değişimler bakımından büyük farklılıklar rapor edilmiştir (Mpoloka 2008; Fedina *et al.* 2010). Bazı bitki türleri UV-B radyasyonundan etkilenmez, bazı bitki türlerinde ise UV-B büyümeyi teşvik edebilir, ancak tahıllar ve sebzelerinde içinde bulunduğu birçok tür UV-B ışınlarına karşı hassastır ve bu ışınlardan zarar görürler (Lidon 2012; Du *et al.* 2014). UV-B radyasyonuna maruz kalan duyarlı tarım bitkilerde bodurluk, yapraklarda renk kaybı, yaprak alanında azalma, palizat parankiması ve bekçi hücrelerde değişiklikler, biyomas ve bitki üretkenliğinde azalma gibi bir takım morfolojik ve anatomik değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Yine UV-B radyasyonunun oluşturduğu hasarlar arasında fotosentetik aparatında dahil olduğu çeşitli fizyolojik süreçleri etkileyen ve kalıtsal mutasyonlara sebep olan protein denatürasyonu, membran değişimleri ve DNA hasarı oldukça dikkat çekicidir. Aşırı UV-B DNA ve ilişkili bazların yapısını bozmaktadır. Artan UV-B radyasyonu ile plazma membranlarında ATPaz miktarının azaldığı, membran geçirgenliğinin arttığı ve doymamış yağ asitlerinin etkilendiği kaydedilmiştir. UV-B radyasyonu hücre konfigürasyonunda değişimlere, fotosentezde azalmaya, polisakkarit içeriğinde değişime de neden olmaktadır. UV-B radyasyonu altında bitkilerde reaktif oksijen türevlerinin arttığı, klorofil sentezinin azaldığı bilinmektedir. UV-B bitkilerde antioksidan enzimler ve bitki sekonder metabolitlerinin birikimine yol açar, bitki savunma sistemlerini aktive eder ve fotobiyolojik strese neden olur (Jiang *et al.* 2011). Ayrıca, su noksanlığı, yüksek sıcaklık, ortamdaki görünür ışınların miktarı, beslenme durumu gibi birçok çevresel faktör bitkilerin UV-B stresine karşı yanıt oluşturmasını zayıflatabilir veya kuvvetlendirebilir (Zlatev *et al.* 2012). UV-B radyasyonunun eko-fizyolojik rolünü anlamak için UV-B'nin oluşturduğu hasar, tamir veya koruma gibi fizyolojik süreçlerin mekanizmalarının anlaşılması önemlidir (Zlatev *et al.* 2012).

UV-B ya bitkilere doğrudan hasar verir ya da bitkilerdeki çeşitli düzenleyici basamakları bozmak suretiyle bitkilerdeki süreçleri etkileyebilir (Potters *et al.* 2009). UV-B radyasyonunun bitkilerde oluşturduğu hasar iki kategoride toplanabilir; birincisi kalıtsal mutasyonlara sebep olabilen doğrudan DNA hasarı, ikincisi bitkinin fizyolojik fonksiyonlarındaki doğrudan veya dolaylı hasar (Lidon 2012). UV-B radyasyonunun

etkisi başlangıçta hücresel seviyede doğrudan veya dolaylı olarak ortaya çıkar ve sonuçta bitkinin büyüme ve üretkenliğinde değişime neden olur. Toprak yüzeyine kadar erişen UV-B radyasyonuna maruz kalan bitkiler birden fazla mekanizma ile süperoksit ( $O_2^-$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi reaktif oksijen türlerini (ROT) üretebilir (Şekil 1.2).

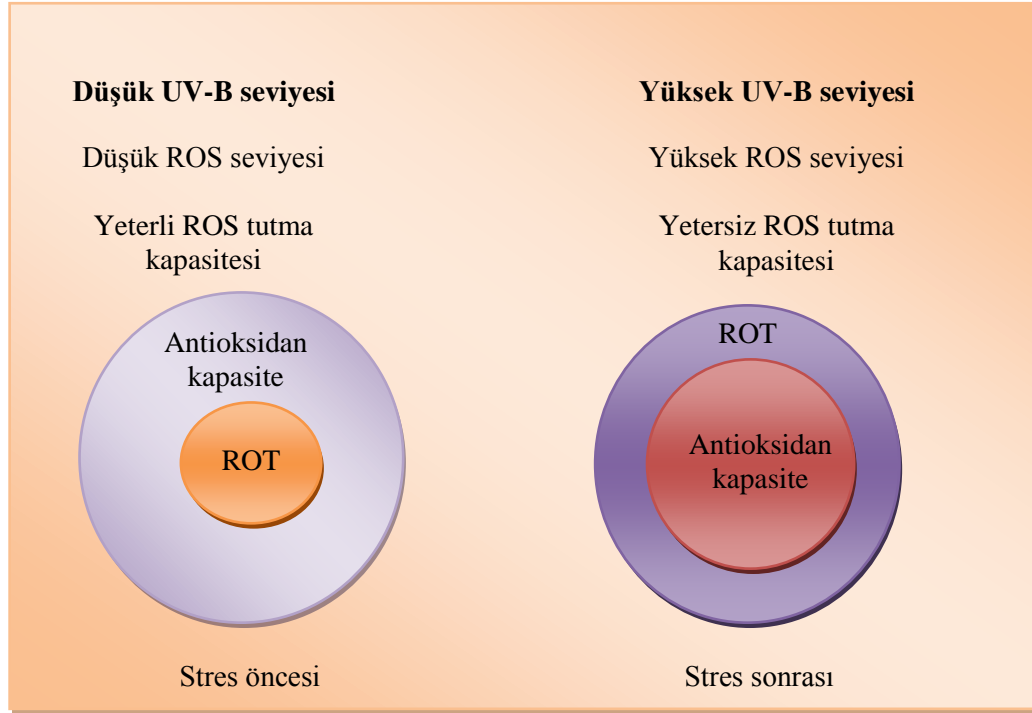


**Şekil 1.2.** UV-B'ye maruz kalan bitkilerin ROT üretimi (Hideg *et al.* 2013)

Hücrelerde başlıca ROT kaynakları, fotosentetik reaksiyonlar ile oksidazlar gibi enzimlerin faaliyetleri ve solunumdur (Jenkins 2009). Buna ilaveten demir ve bakır gibi redoks aktif metaller ile  $H_2O_2$  arasındaki fenton-tipi reaksiyonda agresif hidroksil radikallerini ( $OH^\cdot$ ) üretir. ROT bitkilerin fizyoloji ve morfolojisini, hücre bütünlüğünü etkileyerek; DNA, yağlar ve proteinlerde hasara neden olur (Frohnmeier and Staiger 2003). ROT üretimi artışı stresin şiddetine, süresine ve bitkinin buna ne kadar uyum sağladığına bağlı olarak değişir (Şekil 1.3).

Bitkiler UV-B stresine karşı UV-B absorblayan bileşiklerin (örneğin antosiyaninler, flavonoidler ve diğer fenolik maddeler) biriktirilmesi ve antioksidan sistemin geliştirilmesi (askorbat ve glutatyon gibi enzimatik olmayan antioksidanların up regülasyonu, askorbat peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitesinin artması) gibi savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Jansen *et al.* 1998; Guo and Wang 2010; Tossi *et al.* 2011; Rai *et al.* 2011; Radyukina *et al.* 2011).





**Şekil 1.3.** UV-B stresine bağlı ROS ve antioksidan miktarı değişimi (Hideg *et al.* 2013)

Arabidopsis (Rao *et al.* 1996), biber (Teckhandani and Guruprasad 1998) ve buğday fidelerine uygulanan UV-B'nin süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığı rapor edilmiştir. Benzer biçimde peroksidaz, polifenol oksidaz, askorbat peroksidaz, katalaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerin UV-B uygulanmış biber bitkisinde önemli artış gösterdiği belirtilmiştir (Mahdavian *et al.* 2008). Arabidopsiste gen ifadesi, antioksidan substrat akışı ve enzimatik aktivite arasındaki koordinasyonun, uygulanan UV-B ile değiştiği Rao *et al.* (1996) tarafından rapor edilmiştir. UV-B uygulanmış Arabidopsis fidelerinde antosiyanin ve flavonoidler gibi fenolik maddelerin sentezlendiği gözlemlenmiştir (Winkel-Shirley 2002). Flavonoidler bitkilerin doğal antioksidanları gibi işlev görürler (Hahlbrock and Scheel 1989). Flavonoidlerin sağlığı koruyucu etkileri onların radikal süpürücü ve metal şelatlayıcı yeteneklerine atfedilebilir. Flavonoidler başlıca üç mekanizma ile antioksidan aktivite oluştururlar. Flavonoidler daha düşük redoks potansiyellerinden dolayı (0.23-0.75V) 2.13-1.0V aralığında redoks potansiyeline sahip yüksek okside serbest radikalleri ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $H_2O_2$  gibi) azaltabilirler (Pietta 2009). Flavonoidler iz elementleri etkili bir biçimde şelatlayarak  $OH^{\cdot}$  oluşumunu

sınırlandırabilirler (Tossi *et al.* 2012). Flavonoidler ROT oluşumunda yer alan bazı enzimleri inhibe ederler (Tossi *et al.* 2012).

UV-B'nin fenil alanin amonyak liyaz (PAL) gibi fenol metabolizmasında önemli rol oynayan enzimlerin aktivitesini teşvik ettiği de bilinmektedir (Tossi *et al.* 2011). Fenilalanin amonyak liyaz; fenilalanini, amonyak ve trans sinamik asite dönüştüren bir reaksiyonu katalizleyen enzimdir. Fenilpropanoid türevi metabolizmasında ilk enzim olan PAL'ın merkezi görevinden dolayı, PAL enzimi flavonoidlerin biyosentezindeki anahtar enzimlerden biri olarak düşünülür. PAL aynı zamanda bitkilerin çevresel strese cevap oluşturmasında anahtar bir enzimdir (Oh *et al.* 2009a). PAL enzimini düzenleyen genlerin ifadesi UV radyasyonu, düşük sıcaklık, bitki büyüme düzenleyicileri tarafından indüklenebilir.

UV-B tarafından uyarılan stres kaynaklı PAL sentezi marul ve beyaz kuşkonmaz bitkisi için belgelenmiştir (Rajabbeigi *et al.* 2013). Flavonoid metabolik yolları üzerinde yapılan araştırmalar ile birlikte UV hasarından korunmada farklı dokularda belli pozitif rollere sahip birçok ara bileşik belirlenmiştir. Bununla birlikte, özellikle PAL gibi iyi dokümantasyona sahip genlerin araştırılması, flavonoid biyosentetik yoluna katılan genlerin karakterizasyonu ve ifade edilmesi üzerinde yapılan çalışmalarda, flavonoidlerin biyosentezi ve strese direnç mekanizmasını anlamak için gereklidir. Askorbik asit ve tokoferol gibi antioksidanlar çeşitli streslere bitkilerin toleransında önemli rol oynarlar. Tokoferoller hücre içi sinyal oluşumuna katılan (Munne Bosch 2005), membranları stabilize eden, oksidatif hasara karşı bitkileri koruyan ve çeşitli streslere yanıt oluşturulmasında görev alan güçlü antioksidanlardır (Oh *et al.* 2009b).  $\gamma$  tokoferol metiltransferaz;  $\alpha$  tokoferolün biyosentezinde yer alan ve bitkilerin çevresel strese karşı savunmasında rol oynayan anahtar bir enzimdir. Bu enzimi kodlayan genlerin ifadesinin sıcak ve soğuk stresine bağlı olarak değiştiği rapor edilmiştir (Oh *et al.* 2009b)

Stres altındaki bitkiler, hücrede sentezlenen ve yine hücre içerisinde sitoplazma ve organellerde çözünebilir özellik taşıyan çeşitli osmotik koruyucular biriktirirler. Bu

maddeler, enzimler üzerinde pozitif bir etki oluşturarak membran bütünlüğünün sağlanması ve ozmotik dengenin yapılandırılmasında önemli rol oynarlar. Osmotik koruyucuların yaprağa püskürtülerek ya da tohuma uygulanarak kullanımı olumsuz çevre koşulları altında strese toleransı artırmak için ekonomik olarak uygun bir stratejidir (Ali *et al.* 2007; Ali and Ashraf 2011). Prolin bitkilerde UV-B stresi ile indüklenen uyumlu osmolitlerden biridir (Radyukina *et al.* 2011). Strese maruz kalmış dokularda prolin birikimi membranların ve proteinlerin stabilizasyonunu sağlamakta (Mansour 1998), makromolekülleri denatürasyondan korumakta (Hamilton and Heckathorn 2001), osmotik koruma sağlamakta (Kishor *et al.* 1995), serbest radikalleri süpürmekte (Chen and Dickman 2005) ve antioksidan moleküllerin birikimine neden olmaktadır (Hoque *et al.* 2007). Stres süresince kloroplastlardaki prolin biyosentez oranındaki artış, daha düşük NADPH/NADP<sup>+</sup> oranı sağlayarak, hücre bütünlüğüne zarar veren reaktif O<sub>2</sub> radikallerinin oluşumunu azaltmaktadır (Szabados and Savoure 2009; Lehman *et al.* 2010; Miller *et al.* 2010).

Prolinin eksojen uygulamasının çeşitli bitki türlerinde abiyotik strese toleransı teşvik ettiği bilinmektedir (Ali *et al.* 2007; 2008; Ashraf and Foolad 2007; Abdelhamid *et al.* 2013). Mısır yapraklarına uygulanan 30 mM prolinin biyomas üretimini, içsel CO<sub>2</sub> oranını, stomata iletkenliğini ve fotosentez oranını artırmak yoluyla kuraklığa toleransı teşvik ettiğini belirtmişlerdir. Yine Ali *et al.* (2008) su noksanlığı koşullarında yapraklara uygulanan prolinin kök ve gövdede besin alınımını ve transpirasyon hızını artırdığını rapor etmişlerdir. UV-B stresi altında peroksidatif prosese karşı bitki hücrelerini koruyan prolin birikiminin arttığı bildirilmiştir (Saradhi *et al.* 1995). UV-B stresi altında prolin birikiminde artış mısır (Carletti *et al.* 2003) ve bezelyede de gözlenmiştir (Singh *et al.* 2011). Öte yandan bitkiye eksojen olarak uygulanan prolinin etkileri uygulanan konsantrasyona bağlı olarak değişmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda bitkiye uygulanan prolin hücre büyümesi ve proteinlerin fonksiyonları üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır (Ashraf and Foolad 2007). Hücre içerisinde prolinin aşırı birikimi *Arabidopsis* 'te morfogenez ve amino asitlerin sentezinde yer alan bazı genlerin ifadesini önemli ölçüde baskılamıştır (Nanjo *et al.* 2003). Hücre içerisinde 100 mM gibi bir prolin birikimi yüksek bitkilerde RuBisCo

aktivitesini de baskılamaktadır (Sivakumar *et al.* 1998). Bu yüzden strese toleransı teşvik edebilmesi için hücre içi prolin seviyesinin uygun konsantrasyonda bulunması gerekir. Yaprğa püskürtme yoluyla prolin uygulamasının etkinliği, bitkinin türüne, gelişme dönemine, uygulama süresine, ve konsantrasyona bağlı olarakta değişmektedir (Ashraf and Foolad 2007). Bu durumdan dolayı, eksojen olarak uygulanan prolinin optimum konsantrasyonlarını belirlemek gerekir.

Marul ülkemizde ve dünyada en çok tüketilen geniş yapraklı sebze bitkilerinden biridir. Marul antioksidanlar, fenolik bileşikler, lif ve karotinoidler gibi sağlığı destekleyen bileşikleri yüksek oranda içermektedir (Caldwell and Britz 2006; Du *et al.* 2014). Ayrıca marulun antosiyaninler ve diğer flavonoidlerin sentezini teşvik etmek veya PAL biyosentezinden sorumlu genleri aktive etmek yoluyla abiyotik streslerin etkilerine karşı bitkilerde koruma mekanizmalarını araştırmak için ideal bir bitki olduğu rapor edilmiştir (Lee *et al.* 2013).

Bu tezde UV-B stresinin marul fidelerinin yapraklarında oluşturduğu hasar ve bu hasarın azaltılmasında yapraklara püskürtülen prolinin etkisi çeşitli moleküler, biyokimyasal ve fizyolojik parametreler kullanılarak araştırılmıştır. Mevcut çalışmadan elde edilen moleküler, biyokimyasal ve fizyolojik sonuçlar marulda UV-B stresine toleransın teşvik edilmesinde prolinin merkezi rolünü ortaya koymuştur.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Literatür de UV-B radyasyonunun bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur. Ancak prolinin UV-B radyasyonuna tolerans sağlamadaki etkisi ile ilgili oldukça sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızın bu açıdan literatürdeki önemli bir boşluğu dolduracağını düşünüyoruz.

Cadwel and Britz (2006), sekiz yeşil yapraklı ve sekiz kırmızı yapraklı marul çeşidini kontrollü şartlar altında UV-A ve UV-B ışınlarına maruz bırakmışlardır. Çalışmada marulların yenebilir kısımları dondurularak kurutulmuş ve %80'lik asetonda ekstre edilip ters faz HPLC kullanılarak klorofil ve karetenoid içeriği analiz edilmiştir. Araştırma sonucunda marulların karetenoidlerden luteini en fazla bulundurduğu, az miktarda da beta karoten ve neoksantin içerdiği belirlenmiştir. Genel olarak uygulanan UV-B'nin yeşil yapraklı marullarda karetenoid ve klorofil miktarını artırdığı, buna karşın kırmızı yapraklı marullarda bu bileşikleri azalttığı tespit edilmiştir. Marul varyetelerinin yüksek oranda luteine ilave yüksek oranda klorofil a içerdiği bulunmuştur. Feofitin a ve b miktarının yeşil yapraklı marullarda kırmızı yapraklı marullardan daha yüksek oranda bulunduğu belirtilmiştir.

Tian and Lei (2007), buğday fideleri üzerine UV-B radyasyonu ve kuraklığın etkisi ve bu etkinin azaltılmasında dışardan uygulanan sodyum nitroprusidin (SNP) rolünü araştırmışlardır. Buğday fidelerine birlikte uygulanan kuraklık ve UV-B'nin fide büyümesini geciktirdiği, hidrojen peroksit ve MDA birikimini artırdığı belirlenmiştir. SOD, GPX ve APX aktivitelerinin UV-B ve kuraklık ile birlikte arttığı, CAT aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. UV-B ve kuraklığın birlikte çok daha fazla hasar oluşturduğu saptanmıştır. Dışardan uygulanan 0.2 mM SNP'nin hidrojen peroksit ve MDA miktarını azaltıp, antioksidan enzim aktivitelerini artırarak UV-B ve kuraklığın oluşturduğu hasarı engellediği rapor edilmiştir.

Oh *et al.* (2009a), beş haftalık marul yapraklarını sıcak, soğuk ve ışık stresine maruz bırakarak, marul yapraklarının toplam fenolik madde içeriğindeki değişimi araştırmışlardır. Çalışmada stres faktörlerinin toplam fenolik madde içeriğini 2-3 kat artırdığı, antioksidan kapasiteyi önemli ölçüde yükselttiği belirlenmiştir. Araştırmada tüm streslere cevap olarak Quercetin-3-O-glikozit ve luteolin 3-O-glikozit, klorik ve klorojenik asit gibi fenolik bileşiklerin önemli oranda arttığı saptanmıştır. Öte yandan yapılan analizler sonucunda soğuk uygulamasıyla birlikte fenolik bileşiklerin sentezinde yer alan fenil alanin amonyak liyaz (PAL), askorbik asitin biyosentezinde yer alan L-galaktoz dehidrogenaz ve alfa tokoferolün biyosentezinde yer alan gama tokoferol metiltransferaz gibi genlerin ifadesinin önemli ölçüde arttığı, ışık ve sıcak uygulamasıyla bu genlerin ifadelerinin değişmediği tespit edilmiştir. Çalışmada orta şiddette uygulanan çeşitli çevresel strelerin marul gelişimi üzerine olumsuz etki yapmadığı, bitkinin fitokimyasal içeriğini geliştirdiği rapor edilmiştir.

Zhang *et al.* (2009), UV-B radyasyonu altında *Arabidopsis* yapraklarında oluşan oksidatif hasara karşı nitrik oksidin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Çalışmada endojen nitrik oksit seviyesindeki azalmanın yabancı ve mutant bitkide oksidatif hasar üzerine etkisi de araştırılmıştır. Ultraviyole altında mutant bitkide yabancı bitkiden daha fazla hidrojen peroksit birikimi gözlenmiş, UV-B absorplayan bileşiklerin (flavonoidler ve antosiyaninler) miktarı ve katalaz ve askorbat peroksidaz gibi antioksidan enzim aktivitelerinin mutant bitkide daha düşük olduğu belirlenmiştir. Dışardan nitrik oksit donörü olarak sodyum nitroprosid uygulandığında antioksidan enzim aktivitelerinin artışı, antosiyanin içeriği ve flavonoid miktarının artışı yoluyla mutant bitkilerdeki oksidatif hasarın azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmada bir sinyal molekül olan nitrik oksidin UV-B tarafından oluşturulan oksidatif hasarın azaltılmasında rol oynadığı rapor edilmiştir.

Radyukina *et al.* (2011), altı hafta hidrofonic ortamda yetiştirdikleri adaçayı yapraklarına 5 mM prolin uygulmuş, 24 saat bekledikten sonra hem prolin uygulanmış hem de uygulanmamış (kontrol) adaçayı yapraklarını kısa süreli UV-B ışınına maruz bırakmışlardır. Çalışmada marul yapraklarında Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve

süperoksit dismutazın üç izoformu Mn-SOD, Fe-SOD ve Cu/Zn-SOD analiz edilmiştir. Öte yandan çalışmada RT-PCR kullanılarak bu üç izoformu aktive eden genlerin ifadesi de belirlenmiştir. Araştırma sonucunda hem tek başına UV-B ve prolin uygulamalarının hem de ikisinin birlikte uygulanmasının çeşitli hücre bölümlerinde lokalize olmuş SOD izoformlarını aktive eden genlerin ifadesini değiştirdiği saptanmıştır. Örneğin sitozolik Cu/Zn-SOD izoformlarının aktivitelerinin, kendi mRNA'sının varlığıyla sınırlandırıldığı; Fe-SOD izoformunun aktivitesinin substrat seviyesinde düzenlendiği, mitokondriyal Mn-SOD izoform aktivitesinin ise UV-B ışınması, prolin uygulaması ya da her ikisinin kombinasyonunun etkisine duyarız kaldığı belirlenmiştir. Öte yandan MSD gen transkripsiyon seviyesinin UV-B ışınmasından sonra belirgin bir şekilde arttığı, MSD gen transkripsiyonu teşvik olmasına rağmen Mn-SOD izoform aktivitesinin değişmediği, MSD genlerinin tam olarak olgun mRNA oluşturamadığı tespit edilmiştir.

Sarkar *et al.* (2011), UV-B ışınlarına maruz kalan çimen türlerinde antioksidan cevabın teşviki ve fenolik maddelerin biyosentezinde prolin ile ilişkili pentoz fosfat yolunun rolünü araştırmışlardır. Bu amaçla yatık çimen, kentaki çimeni, uzun boylu çayır gibi değişik çimen türleri üzerine UV-B ışını 1 hafta boyunca günde 10 saat uygulanmıştır. UV-B uygulamasıyla birlikte bütün çimen türlerinde fenolik maddelerin önemli oranda biriktiği ve antioksidan enzim aktivitesinin önemli oranda teşvik edildiği saptanmıştır. Bu artışın glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi ve prolin birikimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Guikagol peroksidaz aktivitesinin UV-B artışı ile birlikte önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Çalışmada fenolik maddelerin birikimi ve antioksidanların teşvikinin çimenlerde UV stresine karşı muhtemel koruyucu mekanizma olduğu rapor edilmiştir.

Yao *et al.* (2011), buğday fidelerinde UV-B radyasyonunun oluşturduğu olumsuz etkilerin giderilmesinde selenyumun potansiyel etkisini araştırmışlardır. UV-B uygulamasının büyüme parametrelerini, biyomas üretimini, klorofil miktarını değiştirdiği, MDA içeriğini ve süperoksit radikal üretimini, prolin, fenolik bileşikler, bazı antioksidan enzimler ve flavonoidlerin miktarını artırdığı tespit edilmiştir. UV-B ile birlikte uygulanan selenyumun ise MDA seviyesini azalttığı, süperoksit oluşumunu

engellediği, biyomas ve total klorofil içeriğini artırdığı, antioksidan enzim aktiviteleri ve antioksidan içeriğini artırdığı belirlenmiştir. Sonuç olarak selenyumun buğday fidelerinde antioksidan enzim aktivitesi ve antioksidan içeriği artırmak yoluyla UV-B'nin oluşturduğu hasarın azaltılmasına yardımcı olduğu rapor edilmiştir.

Bandurska *et al.* (2012), su eksikliği ve UV-B radyasyonunun arpa fidelerinde oluşturduğu stres üzerine araştırma yapmışlardır. Fidelere birlikte uygulanan su eksikliği ve UV-B radyasyonunun kuru madde ağırlığını azalttığı, prolin miktarını artırdığı, tek başına UV-B'nin kuru madde içeriğini ve prolin miktarını değiştirmedeği gözlenmiştir. MDA içeriğinin bütün uygulama gruplarında arttığı belirlenmiştir. Fenilalanin amonyak liyaz aktivitesinin tek başına su eksikliği ve birlikte uygulanan su eksikliği ve UV-B ile arttığı, buna karşın tek başına uygulanan UV-B ile değişmediği saptanmıştır. Öte yandan UV-B uygulamasının yapraklardaki antosiyanin ve flavonların birikimi ile ilişkili 4CL aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. UV-B ile birlikte su eksikliğinin antosiyanin ve flavon birikimini engellediği tespit edilmiştir.

Liu *et al.* (2012), buğdayda UV-B radyasyonunun oluşturduğu strese karşı eksojen uygulanan jasmonik asitin (JA) rolünü araştırmıştır. Çalışmada buğday fidelerine 1 ve 2.5 mM JA verildikten saat sonra 0.9 KJ m<sup>-2</sup> UV-B radyasyonu 12 saat süresince uygulanmış, buğday yaprakları hasat edilerek antioksidan enzim aktiviteleri, MDA miktarı, UV-B absorplayan bileşiklerin içeriği, fotosentetik pigmentler, prolin miktarı ve klorofil flöresans parametreleri ölçülmüştür. Buğday fidelerinde süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz aktivitelerinin, MDA içeriğinin, antosiyanin ve karetenoid içeriğinin ve bütün klorofil flöresan parametrelerinin UV-B, JA ve UV-B+JA tarafından önemli ölçüde etkilendiği rapor edilmiştir. Araştırmada UV-B stresinin fotosistem II fonksiyonu ve SOD aktivitesini önemli ölçüde azalttığı, zarlardaki lipid peroksidasyon seviyesini artırdığı belirtilmiştir. JA uygulamasının UV-B radyasyonunun zararlı etkilerini ortadan kaldırdığı, SOD aktivitesi, prolin ve antosiyanin miktarını artırdığı saptanmıştır. Bununla birlikte dışardan uygulanan jasmonik asitin MDA içeriğini artırdığı, klorofil, flavonoid ve diğer fenolik maddelerin



dışardan uygulanan JA'dan etkilenmediği belirlenmiştir. UV-B stresi ile birlikte dışardan uygulanan JA'nın CAT ve POD aktivitelerini azalttığı rapor edilmiştir.

Zlatev *et al.* (2012), stratosferik ozon azalmasına bağlı olarak artan UV-B radyasyonunun bitkiler üzerine etkilerini değerlendirmiştir. Çalışmada artan UV-B radyasyonuna bağlı olarak bitkilerde DNA hasarı, membran değişimi ve protein denatürasyonunun arttığı, fotosentezin etkilendiği ve çeşitli fizyolojik proseslerin bozulduğu belirtilmiştir. Yine UV-B artışına bağlı olarak bitki büyümesi, gelişimi ve morfolojisinin değiştiği, özellikle duyarlı tarım bitkilerinde ürün veriminin azaldığı rapor edilmiştir.

Baslam *et al.* (2013), çalışmalarında; geniş bir yayılım gösteren ve en çok tüketilen sebzelerin başında gelen, belirli mineral miktarı ve antioksidan bileşenlerin varlığıyla sağlıklı bir besin olan marulun AMF (Arbuscular mychorrhizal fungi) ile mutualist bir ilişki oluşturabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında simbiyontlar arası moleküler diyalog ve hücrel devamlılığı içeren bu yaşam şeklinin; antioksidan aktivite, fenilpropanoid ve karotenoid aktivitesini içerdiğini deneylerle açıklamışlar ve marul köklerindeki AMF kolonilerinin varlığının; sekonder metabolitleri, vitaminleri ve minerallerin birikimini teşvik ettiği gözlemlemişlerdir. Fazla marul tüketimi olmasa bile antioksidan içerikli bileşenlerin ve minerallerin alınımını artırmada AMF kolonilerinin önemli olduğu, ek olarak bu kolonilerin; sekonder metabolitlerin niteliklerini artırmada, marulun biyotik ve abiyotik strese dayanıklı olmasını sağlamada önemli olduğunu belirtmişlerdir. Kırmızı ve yeşil yapraklı marulların mineral, vitamin ve besin içeriğinin artırılmasında AMF kolonilerinin tarımsal uygulamalarda kullanılabileceğini göstermişlerdir.

UV radyasyonu ya da kuraklık gibi streslere karşı bitkilerin oluşturduğu cevap, bitkinin türü, çeşidi, bitki organı, gelişme aşaması ve hatta ekofizyolojik etkileşimlere bağlı olarak değişmektedir. UV radyasyonunun yanı sıra kuraklık stresi bitki büyüme ve üretkenliğini en olumsuz etkileyen faktörlerdendir. Rajabbeigi *et al.* (2013) marulda fenil alanin amonyak liyaz enzim aktivitesi, biyomas, primer ve sekonder metabolitler

üzerine UV-B ve kuraklık stresinin hem tek tek hem de birlikte etkisini araştırmışlardır. Yapılan analizler sonucunda UV-B ve kuraklık stresi altında biyomas üretiminin önemli ölçüde azaldığı, kuru madde, toplam fenolik ve quersetin içeriğinin önemli ölçüde değişmediği belirlenmiştir. Yalnız kuraklık stresinin antosiyanin ve luteolin birikimini artırdığı, UV-B ve kuraklık stresinin birlikte PAL enzim aktivitesinin yanı sıra prolin miktarını da artırdığı saptanmıştır.

Lee *et al.* (2013), kapalı tip bitki üretim sistemlerinde (Sera) yetiştirilen marulda büyüme ve fenolik bileşiklerin birikimi üzerine UV-A, UV-B ve UV-C'nin etkisini araştırmışlardır. Çalışmada marul tohumları 16 gün büyütme kabinde yetiştirildikten sonra fideler kırmızı-beyaz-mavi LED ışığın bulunduğu ortama alınmış ve 3 hafta daha yetiştirilmiştir. Çalışmada farklı dozlarda UV-A, UV-B ve UV-C ışını değişik sürelerle marul fidelerine uygulanarak sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda sürekli uygulanan UV-A'nın fenolik bileşimler, antioksidan birikimi, PAL gen ifadesi ve PAL aktivitesini önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. Tekrarlı veya kademeli uygulanan UV-B'nin marul gelişimini inhibe ettiği, antioksidan birikimini 3.6 kat, toplam fenolik madde miktarını 1.4 kat artırdığı, uygulanan UV-C'nin bitki gelişimini ciddi biçimde engellediği, fenolik madde miktarını artırdığı rapor edilmiştir.

Du *et al.* (2014), bazı meyve ve sebzelerin toplam çözünebilir fenolik içeriği üzerine UV-B'nin etkisini araştırmıştır. Çalışmada çilek, yaban mersini, üzüm gibi meyveler, brokoli, marul, tatlı patates, kolorado patatesi, tatlı mısır ve çeri domatesi gibi sebzeler UV-B'nin çeşitli dozlarına (1,3-5,9  $\text{kJ m}^{-2}$ ) maruz bırakılmıştır. Araştırmada toplam çözünebilir fenolik içeriğinin türe bağlı olarak değişiklik gösterdiği, tatlı mısır, çeri domatesi, üzüm ve yaban mersininde UV-B uygulamasının toplam çözünebilir fenolik madde içeriğini değiştirmediği belirlenmiştir. Çilekte özellikle UV-B'nin yüksek dozlarının toplam çözünebilir fenolik madde içeriğini artırdığı, marulda ise UV-B uygulamasının toplam çözünebilir fenolik madde içeriğini 1.2 kat artırdığı tespit edilmiştir.

Li *et al.* (2014), UV-B stresine maruz bırakılmış soya fideleri üzerine önceden uygulanan salisilik asitin etkisini araştırmıştır. Çalışmada UV-B'nin kuru ağırlık, pigment içeriği, net fotosentetik oran, stoma iletkenliği ve transpirasyon oranını azalttığı belirlenmiştir. Dışardan bitkiye uygulanan salisilik asitin UV-B'nin olumsuz etkilerini azalttığı, ancak transpirasyon oranını etkilemediği saptanmıştır. UV-B'nin soya fidelerinde MDA içeriğini artırdığı ve oksidatif strese neden olduğu, SA uygulamasının bu etkileri önemli oranda azalttığı bildirilmiştir. UV-B uygulamasının SOD aktivitesini artırdığı CAT ve POD aktivitesini azalttığı rapor edilmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

İklim dolabı	: Sanyo, Japonya ve Jenotech, Kore
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini-1240
HPLC	: Agilent Technologies
pH metre	: WTW unilab pH metre
Hassas terazi	: Shimadzu AY220
Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-30°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	: Harris, İngiltere
Karıştırıcı	: Fisons Whirlmixer
Otomatik pipetler	: Nichipet EX ve Eppendorf
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1
Homojenizatör	: Wiggen Hauser D- 500
Çalkalayıcı	: Gallenkamp
Vakum pompası	: Edwards, İngiltere
Elektroforez	: Owl Separation Systems P10DS
Mikrodalga	: Arçelik
Nanodrop	: Thermo Scientific Multiskan Go
Otoklav	: Hirayama HM
Otomatik pipetler	: Brand, Axypet ve Eppendorf
PCR Cihazı	: Qiagen Rotor Gene Q

### 3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Çalışmada kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Fluka şirketlerinden temin edilmiştir.

1. Arnon ve Hogland besi çözeltisi: 1.02 g  $\text{KNO}_3$ , 0.492 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.23 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0.49 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.86 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1.81 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.08 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.22 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.6 mg  $\text{FeSO}_4$ , 0.6 mg tartarik asit saf su içerisinde çözülerek hacmi 1 litreye tamamlanmıştır.
2. 10 mM prolin çözeltisi: 1.15 g prolin 1000 mL saf suda çözünene kadar karıştırılarak hazırlanır.
3. 20 mM prolin çözeltisi: 2.30 g prolin 1000 mL saf suda çözünene kadar karıştırılarak hazırlanır.
4. %5 lik TCA (trikloroasetik asit) (Lipid peroksidasyon aktivitesi homojenat çözeltisi): 100 mL saf su içerisine 5 g TCA ilave edilir. TCA tam olarak çözünene kadar karıştırılarak hazırlanır.
5. %0.5 lik TBA (tiobarbutirik asit) (Lipid peroksidasyon aktivitesi reaksiyon çözeltisi): 100 mL saf su içine 20 gram TCA çözülür ve içerisine 0.5 g TBA ilave edilir ve iyice karıştırılarak hazırlanır.
6. %5'lik  $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$  (titanyum disülfat çözeltisi) ( $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarının belirlenmesinde kullanılır): 1 gram  $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$  20 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.
7. %19'luk  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarının belirlenmesinde kullanılır): 4.16 mL  $\text{NH}_3$  20 mL saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır.
8. 2 M'lık  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarının belirlenmesinde kullanılır): 40 mL %98'lik  $\text{H}_2\text{SO}_4$  alınmış 160 mL saf su içerisine ilave edildikten sonra 200 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
9. 65 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH: 7.8 (Süperoksit anyonu miktarının belirlenmesinde kullanılan tampon): 1,132 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  70 mL saf su da çözülmüş pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

- 10.** 40 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 408 µL % 30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 11.** 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan): 41 µL %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hacmi saf su ile 100mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 12.** 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH: 5.5 (Peroksidazın aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3.55 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> alınarak 200 mL saf suda çözülmüş ve pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.
- 13.** Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi: 54 µL quaiKol ve 15 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'dan (d=1.13 g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 mL 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.
- 14.** Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi: 54 µL quaiKol ve 15 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'dan (d=1.13 g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 mL 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.
- 15.** 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH: 7.8) (SOD için tampon çözeltisi): 1.7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mL saf suda çözülmüş, pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra ve hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.
- 16.** 13 mM metionin çözeltisi (SOD reaksiyon karışımı için): 0.586 g metionin alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250 mL 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 17.** 63 µM NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür (SOD reaksiyon karışımı için): 0.0128 g NBT alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250 mL 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 18.** 0.1 mM EDTA-Etilen Diamin Tetra Asetik asit (SOD reaksiyon karışımı için): 0.073 g EDTA alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250mL 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 19.** 13 µM riboflavin (SOD aktivitesi için 2. çözelti): 0.019 g riboflavin, 500 mL saf suda çözülmüş, 3 mL'lik reaksiyon karışımının 13 µM riboflavin içermesi için 390 µL riboflavin alınmıştır.
- 20.** 20x MOPS solüsyonu (Agaroz jel elektroforez için): 41.9 g MOPS, 6.8 g sodyum asetat, 2.6 g EDTA, 400 ml DEPC H<sub>2</sub>O. pH NaOH ile 7.0 ayarlanır, DEPC'li su ile 500 ml'ye tamamlanır. +4°C de muhafaza edilir.

21. 1x MOPS solüsyonu (Agaroz jel elektroforez için): 10 ml 20Xmops alınıp üzerine 190 ml saf su eklenir. Oda sıcaklığında muhafaza edilir.
22. Agaroz jel elektroforez: 4.34 ml 20Xmops, 66.5 ml dH<sub>2</sub>O, 0.7 g agaroz iki dakika mikrodalgada kaynatılır. Agarozun tam çözüldüğünden emin olunduktan sonra soğuk su altında erlen soğutulup içine 15.6 µl Formamid, 12.8 µl Etidium bromür konulup yavaşça karıştırılır. Daha sonra yükleme tankına dökülüp donması beklenir. Donan jele RNA'lar yüklenip kuvvet solüsyonu 1x MOPS olan küvete alınır. 90V, 90MA'da 30dk yürütülür.

### 3.3. Yöntemler

#### 3.3.1. Bitkilerin Büyütülmesi

Çalışmamızda Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nden elde edilen marul (*Lactuca sativa L.*) bitkisi kullanılmıştır. Marul tohumları ekimden önce etanol (%96) ile kısa süreli hızlıca yıkanmış ve %5'lik sodyum hipoklorit içerisinde 10 dakika yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra tohumlar 5 kez saf su ile yıkanmıştır. Kontrol grubu ve UV-B uygulaması yapılacak tohumlar oda şartlarında saf su içerisinde 6 saat şişmeye bırakılmıştır. Daha sonra eşit sayıda tohum önceden steril edilmiş ve içine steril kum konulmuş saksılara ekilmiş ve kontrollü şartlarda (24±°C ve %50 nemli iklim kabininde) 30 gün yetiştirilmiştir. Saksılara düzenli aralıklarla uygun dozda hoagland çözeltisi ilave edilmiştir. 30 gün sonra marul yapraklarına kontrol için saf su, diğer örnekler için 10mM ve 20mM prolin konsantrasyonları püskürtülmüş ve saksılar 24 saat iklim kabininde bekletildikten sonra üzerlerine 3.3W m<sup>-2</sup> doz UV-B (UV-B Philips TL100W/12) radyasyonu 12 saat uygulanmıştır (kontrol, prolin I ve prolin II grupları hariç). UV-B uygulamasını takiben genç ve iyi gelişmiş olan yapraklar alınarak, enzim ve hormon analizleri için hemen kullanılmış, diğer analizler için -80°C derin dondurucuya bırakılmıştır. Makro ve mikro element tayini için ise yapraklar tartıldıktan sonra 65°C'ye ayarlı etüvde 72 saat kurutulmuştur.

### 3.3.2. Marul yapraklarında toplam azot miktarının belirlenmesi

Marul yapraklarında toplam azot içeriği salisilik-sülfürik asit karışımı ile yaş yakmaya tabi tutulduktan sonra mikrokjeldahl yöntemiyle belirlenmiştir (Bremner 1965a).

### 3.3.3. Marul yapraklarında makro ve mikro elementlerin miktarının belirlenmesi

Marul yapraklarının P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Zn, Cu, S, B ve Se içerikleri nitrik asit-hidrojen peroksit (2:3) asit ile 3 farklı adımda (1. Adım; 145°C'de %75 mikrodalga gücünde 5 dakika, 2. Adım; 180°C'de %90 mikrodalga gücünde 10 dakika ve 3. Adım 100°C'de %40 mikrodalga gücünde 10 dakika) 40 bar basınca dayanıklı mikrowave yaş yakma ünitesinde (speedwave MWS-2 Berghof productts + Instruments Harresstr.1. 72800 Enien Gernmany) yakmaya tabi tutulduktan sonra P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Zn, Cu, S, B ve Se tayini ICP OES spektrofotometresinde (Inductively Couple Plasma spectrophotometer) (Perkin-Elmer, Optima 2100 DV, ICP/OES, Shelton, CT 06484-4794, USA) okunmak suretiyle belirlenmiştir (Merten 2005).

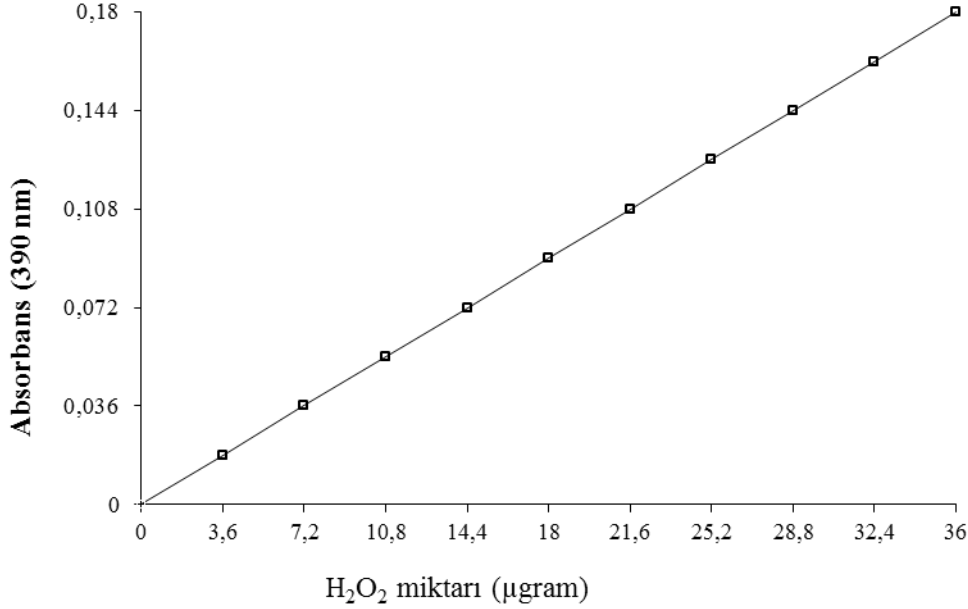
### 3.3.4. Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) miktarının belirlenmesi

Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) miktarının belirlenmesi için; 0.5 gram yaprak alınarak 5 mL soğuk %0.1 TCA içinde homojenize edildikten sonra homojenat 10.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen süpernatantın 0.5 mL'si, sırasıyla 0.5 mL 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH: 7.0) tamponundan ve 1 mL KI eklenmiştir. Absorbans değeri 390 nm'de ölçülüp kaydedilmiştir. Sonuçlar standart grafiklerle oranlanarak g doku başına düşen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı (μmolg<sup>-1</sup> doku) olarak hesaplanmıştır (Velikova *et al.* 2000).

Standart grafiği hazırlamak için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinden eppendorf tüplerine sırasıyla 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ve 18 mikrogram H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olacak şekilde hesaplanarak konulmuştur. Tüpün hacmi 1 mL olacak şekilde 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH: 7.0) tamponu ile tamamlanmıştır. Daha sonra her tüpe 1 mL KI ilave edilmiştir. Absorbans değerleri 390



nm'de köre karşı okunmuştur. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram  $H_2O_2$  değerleri kullanarak standart grafik elde edilmiştir.



**Şekil 3.1.** Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik.

### 3.3.5. Lipid peroksidasyon aktivitesinin belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu için 0.5 g yaprak alınarak 5 mL %5'lik TCA içinde homojenize edildikten sonra elde edilen homojenat  $10.000 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj edilir. Tüpün süpernatant kısmından 4 mL alınarak üzerine 1 mL %0.5'lik TBA çözeltisi ilave edilir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika inkübe edilir ve reaksiyon, tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durdurulur. Örnekler tekrar  $10000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısmı alınarak absorbansı 532 nm de okunur ve daha sonra 600 nm deki non-spesifik absorpsiyon için absorbans değeri belirlenir.

Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm'de belirlenen değeri çıkarılır ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/g):  $[(A_{532} - A_{600})/155000] \times 10^6$  formülüyle hesaplanır. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde verilir (Ananieva *et al.* 2002).

### 3.3.6. Antioksidant enzim ekstraksiyonu

Enzimlerin ekstraksiyonu için, taze bitki yapraklarından 0,5 g alınarak havan içine konulup üzerine sıvı azot ilave edilerek toz haline gelinceye kadar öğütülmüştür. Sonra üzerine 5 ml soğuk homojenat tamponu (%1 PVP ve 1 mM EDTA ihtiva eden 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH: 7,0) ilave edilmiş ve karışım bir santrifüj tüpüne aktarılarak 15000xg ve +4C°'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen süpernatant antioksidan enzimlerin aktivite ölçümleri için kaynak olarak kullanılmıştır (Angelini and Federico 1989; Angelini *et al.* 1990).

#### 3.3.6.a. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin belirlenmesi

Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de absorbandsaki azalışa bağlı olarak belirlenir (Nakano and Asada; 1981). Enzim aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponu (ph: 7.0), 250 µM askorbik asit (ASC), 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 20 µL enzim ekstraktı içeren 1 mL'lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlenir. Askorbat peroksidaz aktivitesi 290 nm'de ASC için 2.8 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplanır.

#### 3.3.6.b. Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanır. Reaksiyon karışımı (3 mL); 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 63 µM NBT, 13 µM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 3 mL spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2,58 mL alınmış ve üzerine 30 µL enzim ekstraktı pipetlenmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 13 µM'lık riboflavin çözeltisinden 390 µL pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatılmıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk. tutulmuş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. 15 dk. içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okunmuştur.

Kör; aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve değerler EU/g yaprak olarak sunulmuştur (Agarwal and Pandey 2004).

### 3.3.6.c. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

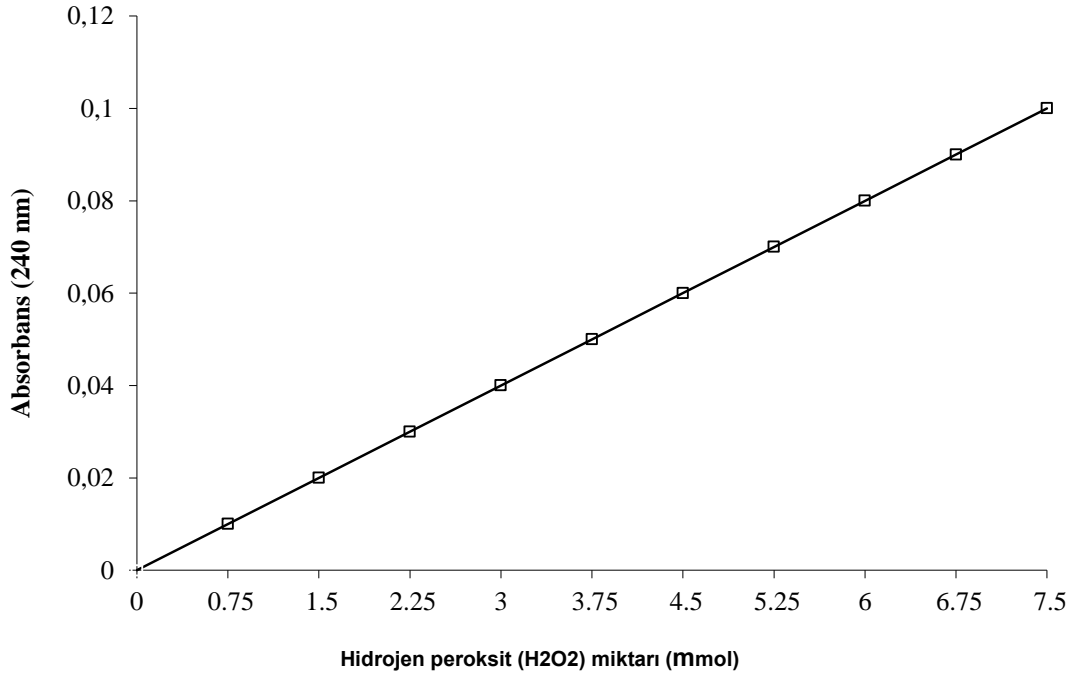
Peroksidaz (POD) aktivite tayini, guaikol ve  $H_2O_2$ 'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır. Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 100 mL 0.1 M,  $NaH_2PO_4$  (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol ve 5mM  $H_2O_2$  içeren substrat çözeltisinden 3 mL konulduktan sonra, üzerine 10 µL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. 470 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedilmiş ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanmıştır. 25°C'de 1 dakikada, absorbansı 0.01 abs artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulmuştur (Yee *et al.* 2002).

### 3.3.6.d. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için Gong *et al.* (2001) uyguladığı metot kullanılır. Bu metot, katalazın ortamdaki  $H_2O_2$ 'nin oksijen ve suya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans değişiminin 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır.

Önce reaksiyonda azalan  $H_2O_2$  miktarını belirlemek için standart grafik hazırlanır. Standart grafik hazırlamak için, 5 mM  $H_2O_2$  çözeltisinden 3 mL'lik spektrofotometre tüplerine sırasıyla; 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 mL konulmuş, tüplerin hacimleri saf su ile 1.5 mL'ye tamamlanmış ve her tüpe 1.47 mL 103.5 mM  $KH_2PO_4$  ve 30 µL su ilave edilmiştir. Spektrofotometrede 240 nm'de absorbans köre karşı okunmuş ve absorbans değerlerine karşılık gelen µM  $H_2O_2$  değerleri kullanarak standart grafik elde edilmiştir. Aktivite ölçümü için 3 mL'lik spektrofotometre küvetine,

103 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponundan 1.475 mL ve 40 mM'lık  $\text{H}_2\text{O}_2$  substrat çözeltisinden 1.5 mL konulduktan sonra, 25  $\mu\text{L}$  enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Spektrofotometrede 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okunmuş ve absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanmıştır. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla  $\mu\text{mol}$  cinsinden  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarına dönüştürülmüştür. 25°C'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1  $\mu\text{mol}$  azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulmuştur.



**Şekil 3.2.** Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik

### 3.3.7. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Marul yapraklarındaki toplam fenolik madde konsantrasyonu Folin-Ciocalteu ayırıcı kullanılarak belirlenmiştir. Yöntem kısaca şöyledir. Yaklaşık 0.2 g yaprak örneği alınarak sıvı azotta dondurulup 3 ml %80'lik asetonda ekstre edilmiş ve 4°C'de 12 saat karanlıkta inkübe edilmiştir. Daha sonra ekstre 905xg'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve

süpernatant alınmıştır. Yaklaşık 50 µl ekstre üzerine 135 µl safsu, 750 µl %10'luk folin-ciocalteu ve 600 µl %7.5'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenerek 10 saniye vortekslendikten sonra karışım 45°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Karışım oda sıcaklığına kadar soğuduktan sonra 765 nm dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak absorbansı ölçülmüştür. Gallik asit çözeltisi aynı akım şemasına göre hazırlanmış ve standart eğriler oluşturulmuştur.

### 3.3.8. Antioksidan kapasite

Marul yapraklarının antioksidan kapasitesi ABTS (aminobenzotriazole; 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid) diammonium salt) metodu kullanılarak ölçülmüştür. Yöntem kısaca şöyledir. Yaklaşık 0.2 g yaprak örneği alınarak sıvı azotta dondurulup 3 ml %80'lik asetonda ekstre edilmiş ve -20°C'de 24 saat karanlıkta inkübe edilmiştir. Daha sonra ekstre 905xg'de 2 dakika santrifüj edilerek ve süpernatant alınmıştır. Yaklaşık 0.4 gr MnO<sub>2</sub>, 20 ml ABTS stok çözeltisine ilave edilmiş ve ABTS radikal katyon (ABTS \*) oluşturmak üzere 30 dakika için karıştırılmıştır. Daha sonra, ABTS çözeltisi fazla MnO<sub>2</sub>'yi ortadan kaldırmak için bir filtre kâğıdından süzölmüştür. ABTS çözeltisi bir su banyosu içinde 30°C'de inkübe edilmiş ve 5 mmol L<sup>-1</sup> fosfat-tamponu kullanılarak 730 nm'de 0.7±0.02' lik bir absorbansta seyreltilmiştir. 1ml ABTS ve 100 µl ekstre karıştırılıp 1 dakika vortekslendikten sonra karışımın absorban değeri okunmuştur.

### 3.3.9. Glukoz, fruktoz, maltoz ve sükroz miktarının belirlenmesi

0.5 gr kuru yaprak örneği santrifüj tüpüne konulup, 5ml petrol eterinde yıkandıktan sonra %80'lik etanolde ekstre edilmiştir. Ekstre üzerine HPLC-grade su eklendikten sonra 65°C'de alkol uçurulmuş ve şekerler çözülmüştür. Solüsyonu dekolarize etmek için çözeltiye kömür eklenmiş ve karıştırılmıştır. Çözelti 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant alınarak HPLC'de analiz edilmiştir (Wemmos *et al.* 2013).

### 3.3.10. Organik asitlerin miktarının belirlenmesi

Organik asitlerin analitik ölçümünde 0.5 gr yaprak örnek alınarak 10 ml saf su içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilerek viallere aktarılmış, viallere aktarılan örnekler, mobil faz olarak 1ml/dk akış hızında potasyum dihidrojen fosfatın HPLC'de yürütülmesi ile belirlenmiştir.

### 3.3.11. Hormonların ekstraksiyon, saflaştırma ve analiz işlemleri

#### 3.3.11.a. Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri

Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri Kuraishi *et al.* (1991) ve Battal ve Tileklioğlu (2001) metotlarına göre ve üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Derin dondurucudan çıkarılan küçük parçalar halindeki örnekler sıvı azot içerisinde bir havan yardımıyla toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen örnekler üzerine -40°C'de bekletilen %80'lik metanol ilave edilerek (Davies 1995) 10 dk ultra doku parçalayıcıda (Ultrasonic Processor, Jencons LTD.) homojenize edildikten sonra, +4°C'de ve karanlıkta 24 saat homojenize işlemine devam edilmiştir. Örnekler Whatman No:1 filtre kâğıdından süzölmüş ve süpernatant alındıktan sonra kalan parçalar tekrar aynı işlemlere tabi tutulmuş ve sonra her iki süpernatant birleştirilmiştir. Birleştirilen süpernatantlar tekrar 0.45 µm'lik PTFE filtrelerinden (Cutting 1991) geçirilmiş ve bir evaporator pompası yardımıyla 35°C'de kurutulmuştur. Kurutulan ekstraktlar 0.1 molarlık KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8) tamponunda tekrar çözülmüştür. Çözünen ekstraktlarda bulunan yağ asitlerini ayırmak için örnekler 1 saat 4°C'de 5.000 rpm'de sanrifüj (Hermle Z 320 K) edilmiştir (Palni *et al.* 1983). Süpernatant otomatik pipetle tüplerden alınmış ve bir beher içerisine bırakılmıştır. Fenolik bileşikleri ve renk maddelerini ayırmak için (Qamaruddin 1990; Chen 1991; Kovac and Zel 1994), her örneğe ait 1 gramlık çözünmeyen Polivinilpolipirolidon (PVPP, Sigma) hazırlanmış ve süpernatantın bulunduğu beher içerisine bırakılarak, iyice karıştırılmıştır (Money and Staden 1984; Hernandez-Minea 1991).

**PVPP (Polivinilpolipirolidon)'nin Hazırlanması:** 1 gram çözünmeyen PVPP bir beher içerisine bırakılmış ve üzerine 30 mM asetik asit konarak süspansiyon şeklinde iyice karıştırıldıktan sonra süzölmüştür. Tekrar üç kat hacimdeki asetik asitle yıkanıp süzöldükten sonra kullanılmıştır.

PVPP ile karıştırılan süpernatant Whatman No:1 filtre kâğıdından süzölererek PVPP'den ayrılmıştır. Ekstrakt alınarak ya hemen kullanılmış ya da daha sonra kullanılmak üzere -4°C'de saklanmıştır (Cheikh and Jonmes 1994). Daha spesifik ayırma yapabilmek için Sep-Pak C18 (Waters) kartüjleri kullanılmıştır (Machackova *et al.* 1993). Kartüjler kullanılmadan önce aşağıdaki açıklandığı şekilde şartlandırılmıştır.

#### **3.3.11.b. Şartlandırma işlemi**

Kartüjler önce 5 ml %80'lik metanolden geçirildikten sonra, 5 ml saf suyla yıkanmak suretiyle kullanıma hazırlanmıştır. Süpernatantlar (dondurulmuşsa çözünmesi beklendikten sonra) 5 mililitrelik şırıngalarla şartlandırılmış Sep-Pak C18 kartüjlerinden (1 ml/dak) geçirilmiştir.

Kartüjler tarafından adsorbe edilen hormonlar %80'lik metanolde (1 g taze örnek için 3 ml) çözönmek suretiyle küçük şişelere alınmıştır. Küçük şişelere alınan numuneler HPLC analizleri için kullanılmıştır (Qamaruddin *et al.* 1990).

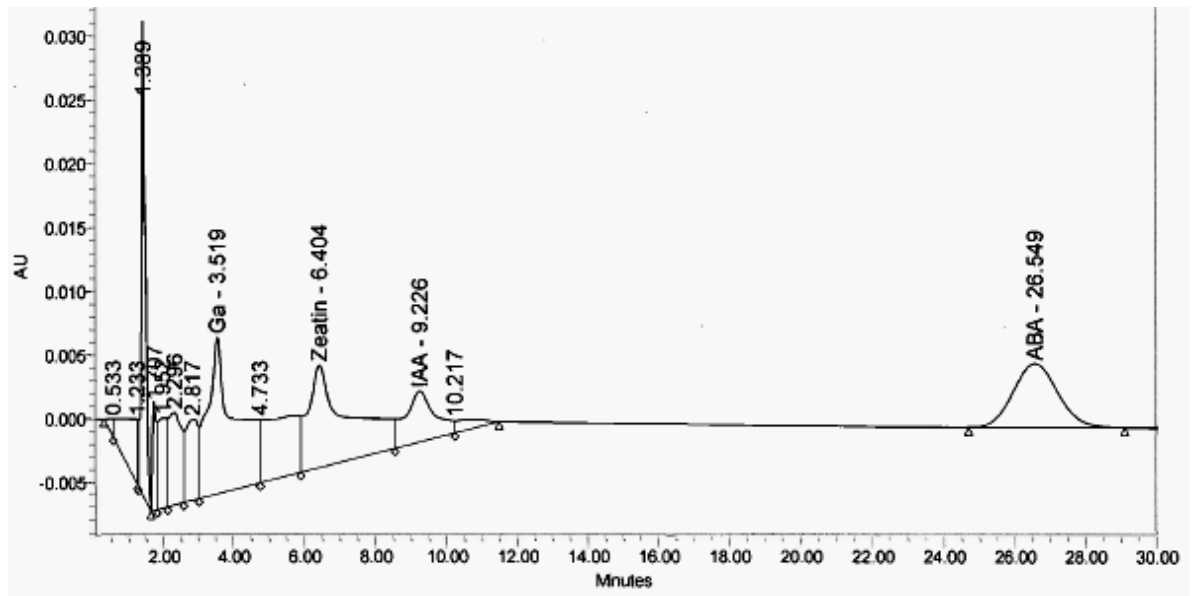
#### **3.3.11.c. Hormonların analizi**

Hormon analiz yönteminde Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılmıştır (Horgan and Kramers 1979; Koshimizo and Iwamura 1986; Morris *et al.* 1990). HPLC analizleri aşağıdaki sistemler kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.1).

**Pompa:** Araştırmamızda basıncı 20.000 psi'ye kadar çıkabilen Waters marka (Waters 1525 ) pompa kullanılmıştır (Robyt and White 1990).

**Dedektör:** Çalışmamızda Waters marka ve 4020 model UV dedektörü kullanılmıştır (Roberts and Hooley 1988; Horgan 1988). Dedektörün en uygun dalga boyunun ise 245 nm olduğu tespit edilmiştir (Featonby-Smith and Van Staden 1984; Banowetz 1994).

**Kolon:** Çalışmamızda Bondapak C18 (Waters; 30x0,2 cm) kolon kullanılmıştır (Horgan and Kramers 1979; Brenner 1981; Palni *et al.* 1983; Hernandez–Miana 1991; Chen 1991).



**Şekil 3.3.** Hormonlara ait HPLC kromatogramı

\*Alıkonma zamanları: Ga 3.519 dk., Zeatin 6.404 dk., IAA 9.226 dk. ABA 26.594 dk. Kolon: Waters Boundapak C18; Dedektör: UV Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbans Dedektor; Dalga boyu 245 nm; Mobil faz: %11'lik asetonitril (pH: 4,91); Akış hızı: 2.0 ml/dk.

**İzokratik sistem:** Bu sistemde, sabit konsantrasyondaki mobil fazın dakikadaki akış hızı ile beraber maddelerin kolonlardaki alıkonma zamanına bağlı olarak birbirlerinden ayrılabilmesi temeline dayanmaktadır. Çalışmamızda izokratik sistem kullanılmıştır (Turnbull and Hanke 1985; Taylor *et al.* 1990).

**Kaydedici (İntegratör):** Dedektörün gönderdiği uyarılar Waters marka ve Breeze Software tarafından kaydedilmiştir.



**Mobil faz:** Çalışmamızda %11'lik asetonitril (HPLC'ye özgü, Merck ) tampon olarak 40 mM trietil amonyum asetat (TEAA) ilave edilmiş ve pH'sı 4,91'e ayarlanan mobil faz kullanılmıştır (Hansen *et al.* 1984; Soejima *et al.* 1992; Kovac and Zel 1994; Chamberlain 1995).

**TEAA'nın Hazırlanması:** Belli bir miktarda trietilamin (Merck) alınarak bir mezür içerisine bırakılmış, üzerine trietilamin miktarından biraz daha az olacak şekilde asetik asit yavaş yavaş ilave edilmiştir. Daha sonra elde edilen çözelti buzdolabına bırakılmış soğuduktan sonra kullanılmıştır.

**Degaze İşlemi:** Millipore marka vakum pompası kullanılarak pH'sı ayarlanan mobil fazda oluşan gazlar uzaklaştırılmıştır.

### 3.3.12. Amino asit miktarının belirlenmesi

Marul yapraklarının serbest amino asit kompozisyonunun belirlenmesinde Aristoy and Toldra (1991) ve Antoine *et al.* (1999)'da verilen yöntemler (HPLC yöntemi) esas alınmıştır. Örneklerin serbest amino asit kompozisyonunun belirlenmesinde tek dedektörlü (UV) ve Zorbax Eclipse-AAA 4.6 x 150mm, 3.5 µm (Agilent PN 963400-902) kolonlu Agilent 1200 model HPLC kullanılmıştır. Amino asitler için türevlendirme reagenti olarak OPA (ortho-phthalaldehyde) ile FMOC (9- fluorenylmethyl chloroformate), tampon çözelti olarak ise 0.4 N Borate (Agilent PN 5061-3339) (pH'sı 10.2) kullanılmıştır. Kromatografi sisteminde mobil faz olarak; mobil faz A: 40 mM NaH<sub>2</sub>P<sub>04</sub> (pH 7,8) ve mobil faz B: Asetonitril (ACN): Metanol (MeOH) : Su /45:45:10 v/v/v çözeltileri yürütülmüştür. Sistemde yürütülen mobil faz akış oranı 2ml/dk ve kolon sıcaklığı 40°C'dir. UV dedektörde; Sistin, Valin, Hidroksiprolin, Aspartik asit, Glutamik asit, Asparagin, Serin, Glutamin, Histidin, Glisin, Tionin, Arginin, Alanin, Tirosin, Metionin, Triptofan, Fenilalanin, İzolösin, Lösin, Lisin, Prolin amino asitleri belirlenmiştir.

### 3.3.13. Gen ekspresyonu çalışmaları

Real Time PCR'da kalıp olarak kullanılacak cDNA örneklerini elde etmek için yapraklardan RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu için RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılmıştır.

Sıvı azot içerisinde ezilen yaprak örnekleri (Yaklaşık 100 mg) ependorf tüpüne aktarılmış ve sıvı azotun uçması beklenmiştir. Örnekler erimeden 450 µL RLT tamponu eklenmiş (5 µL merkaptotanol ilave edilmiş) ve vorteks yapılarak, örnekler 56°C'de 3 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. Elde edilen karışım lila kolon bulunduran toplama tüpüne aktarılmış ve 2 dakika 15,000 X g'de santrifüj edilmiştir.

Oluşan süpernatant çökeltiye (pellet) dokunulmadan yeni bir ependorfa alınmış, içerisine kendi hacminin yarısı kadar %96'lık etanol eklenmiş ve hemen pipetaj yapılmıştır. Beklenmeden numune (yaklaşık 650 µL) pembe renkli kolon barındıran toplama tüpüne aktarılmış, 15 saniyesaniye 12,000 X g'de santrifüj edilmiş, alttaki sıvı atılmıştır. Bu aşamadan sonra DNA kirliliğinden kurtulmak için On-column DNase Digestion kiti (Sigma, Almanya) uygulanmıştır.

Elimizdeki pembe renkli kolona 350 µL RW1 tamponu eklenmiş ve 15 sn 12000 X g'de santrifüj edilip, alttaki sıvı atılarak kolon dikkatlice yerine yerleştirilmiştir. 10 µL DNase I, 70 µL RDD tamponundan oluşan 80 µL'lik DNase stok solüsyonu kolona eklenmiş ve 20–30°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 350 µL RW1 tamponu eklenerek 15 sn 12000 X g'de santrifüj edilmiş, alttaki sıvı atılarak kolon dikkatlice yerine yerleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra protokole geri dönmüştür. Kolona 500 µL RPE tamponu eklenerek ve 15 sn 12000 X g'de santrifüj edilmiştir. Kolon yeni bir toplama tüpüne geçirilerek 15000 X g'de 1 dakika santrifüj edilmiş, etanolden uzaklaştırma işleminden sonra kolon 1.5 mL'lik yeni bir toplama tüpüne dikkatlice yerleştirilerek, 30 µL RNaz'lardan arındırılmış su, tam kolonun zarına gelecek şekilde eklenerek ve 5 dakika inkübe edildikten sonra 12000 X g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Total RNA'nın saflığı ve yoğunluğu agaroz jel elektroforezi yapılmasından

sonra 260/280 nm de absorbansı ölçülerek belirlenmiş ve örnekler -80°C'de saklanmıştır.

### **3.3.13.a. RNA'nın kantitatif tayini**

Total RNA'nın kantitatif tayini için nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific Multiskan Go) kullanılmıştır. Örnekler <sup>1</sup>Drop<sup>TM</sup> plate (Cat No:12391)'e 2µl yükleme yapılarak okunmuştur.

### **3.3.13.b. cDNA sentezi**

cDNA örneklerini elde etmek için RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas katalog no: K1622) kullanılmıştır. cDNA sentezi için hesaplanan RNA PCR tüpüne konulup üzerine 1µl oligo (dT) primer eklenmiştir. Toplam hacim 12µl olana kadar ise nükleaz-free su eklenmiştir. Hafif bir santrifüjden sonra pcr cihazında cDNA programında 65°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra herbir tüp içine 4 µl 5X reaction buffer, 1µl ribolock RNase inhibitör (20U/µL), 2 µl 10 mM dNTP mix, 1µl revertaid M-MuLV RT (200 U/µL) eklenerek toplam hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler cihaza yerleştirilerek 42°C'de 60 dakika, 70°C'de ise 5 dakika tutulmuştur. Elde edilen cDNA örnekleri çalışılincaya kadar -20°C'de stoklanmıştır.

### **3.3.13.c. Real time PCR uygulamaları**

cDNA elde edildikten sonra ilgili genlerin kantitatif tayininde Real-time PCR kullanılmıştır. Bu amaçla Quantitect SYBR Green kit kullanılarak üretici firma tarafından önerilen protokol doğrultusunda RT-PCR reaksiyonları yapılmıştır (PCR döngüsü: 95°C 10 dakika, 40 döngü olacak şekilde (95°C 10 saniye, 52°C 15 saniye, 72°C 20 saniye) ve 72°C 5 dakika). RT-PCR reaksiyonları için gene spesifik primerler (Çizelge 3.1) SYBR Green ile işaretleme yapılarak gen ekspresyonu kantitatif olarak belirlenmiştir. Referans gen olarak aktin geni kullanılmıştır.

**Çizelge 3.1.** RT PCR için kullanılacak spesifik primerler

GEN	Forward	Reverse
PAL	ACGAAATGGACCGTTACAG	TCCCTCTCGATCATTTTGG
$\gamma$ -tokoferol metiltransferaz	TGTTGACGCAATACCACCAC	GCCATTGTCATCGGAGGAAC
Aktin	AGCAACTGGGATGACATGGA	GGGTTGAGAGGTGCCTCAGT

### 3.3.14. Gen ekspresyonu hesaplamaları

Genlerin mRNA seviyeleri her bir örnek için  $\beta$ -aktin ile standardize edilerek  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  matematiksel modeline göre hesaplanmıştır (Livak and Schmittgen 2001).

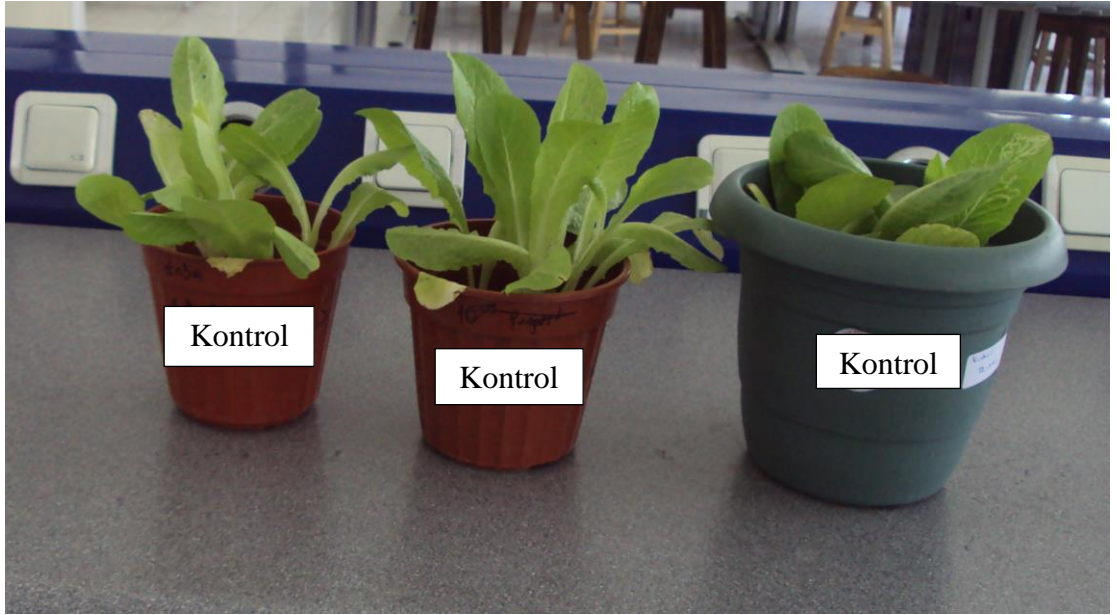
$$\Delta\Delta Ct = (\text{Hedef Gen Ct} - \beta\text{-aktin Ct})_{\text{Muamele}} - (\text{Hedef Gen Ct} - \beta\text{-aktin Ct})_{\text{Kontrol}}$$

### 3.3.15. İstatistiksel analiz

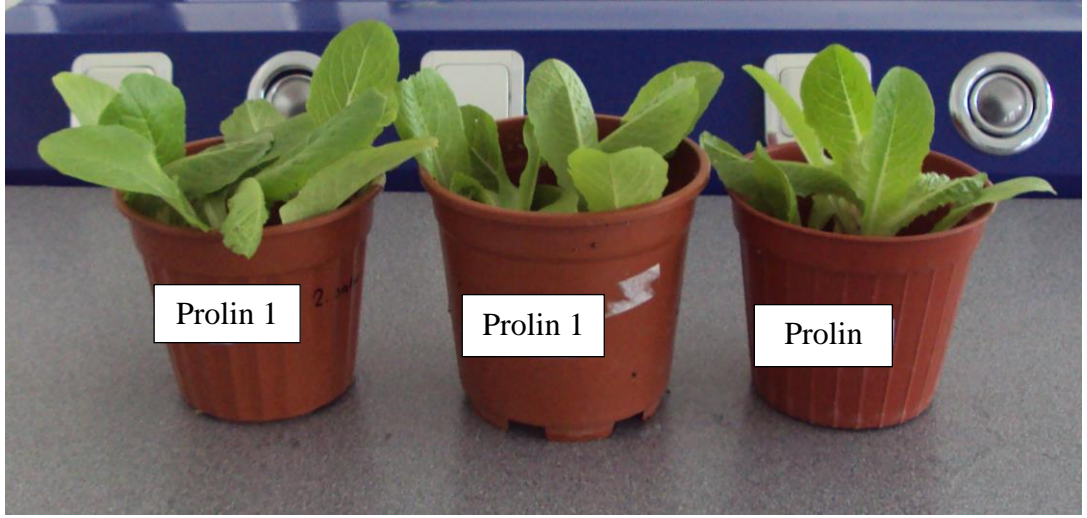
Sonuçlar, her bir uygulamadan üç örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 3 tekrür yapıldıktan sonra elde edilen 9 değerın ortalamasıdır. Sonuçların hesaplamasında, SPSS 20.0 paket programı kullanılmış ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. İstatistik anlamlar,  $p \leq 0.05$  hata seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.

#### 4. BULGULAR

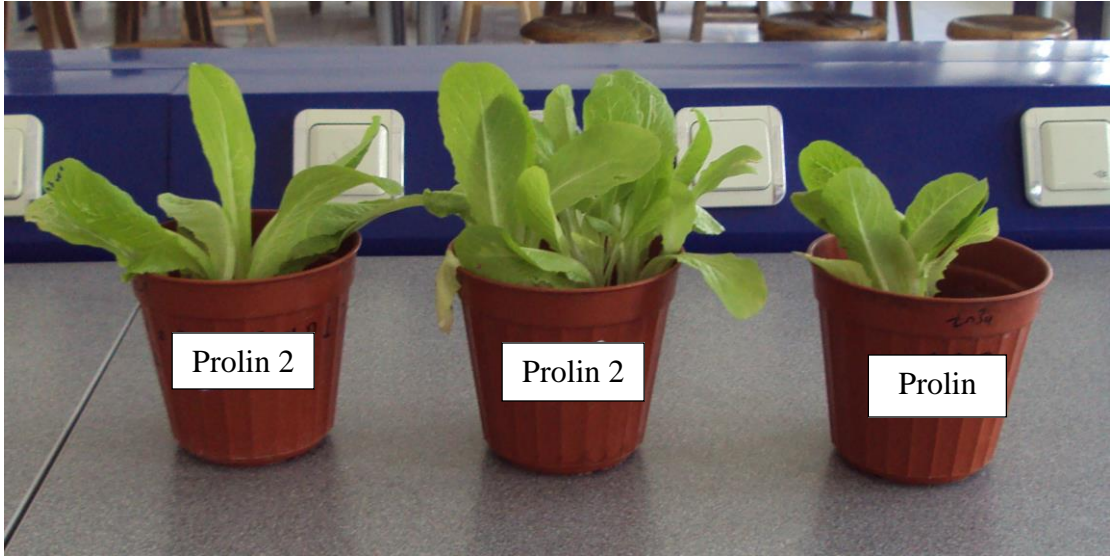
Araştırmamızda kullanılan prolin konsantrasyonları literatür verilerinden ve yapılan ön çalışmalardan elde edilen verilere göre 10 mM (prolin I) ve 20mM (Prolin II) olarak belirlenmiştir. UV-B radyasyonu dozu ve süresi ise hem yapılan ön deneylerden hem de Tossi *et al.* 2011; Tossi *et al.* 2012; Lee *et al.* 2013 tarafından önerilen veriler doğrultusunda seçilmiştir. Uzun süreli ve yüksek dozlarda UV-B uygulaması marul yapraklarında morfolojik hasara ve yanıklara neden olduğundan dolayı çalışmamızda UV-B uygulama süresi 12 saat UV-B dozu  $3.3W m^{-2}$  olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu (Şekil 4.1), prolin I (Şekil 4.2), prolin II (Şekil 4.3) On iki saat UV-B (Şekil 4.4), UV-B+prolin1 (Şekil 4.5) ve UV-B+prolin II (Şekil 4.6) uygulamasından sonra marul fidelerinin genel görünümü aşağıda verilmiştir.



**Şekli 4.1.** Kontrol grubu marul fidelerinin genel görünümü



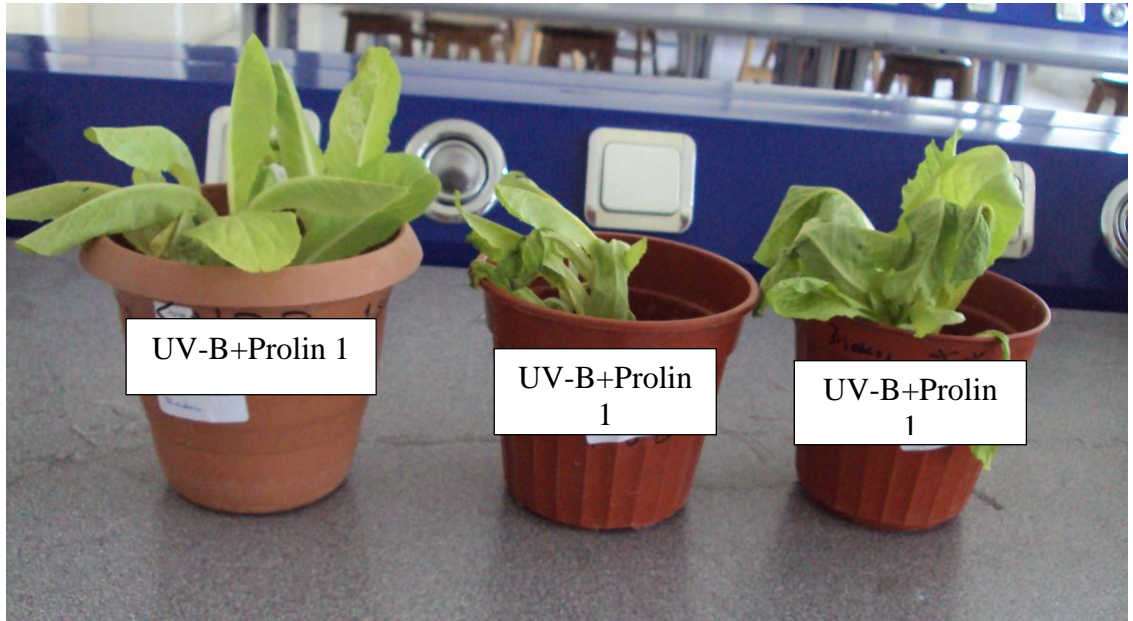
**Şekil 4.2.** Prolin-1 uygulanmış marul fidelerinin genel görünümü



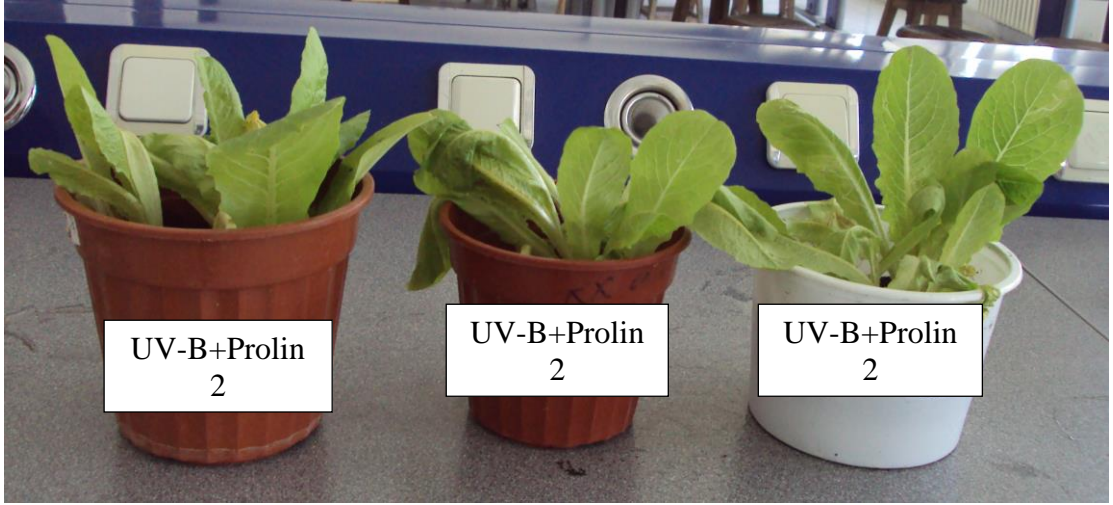
**Şekil 4.3** Prolin-2 uygulanmış marul fidelerinin genel görünümü



Şekil 4.4. On iki saat UV-B uygulanmış marul fidelerinin genel görünümü



Şekil 4.5. On iki saat UV-B+Prolin 1 uygulanmış marul fidelerinin genel görünümü



**Şekil 4.6.** On iki saat UV-B+Prolin 2 uygulanmış marul fidelerinin genel görünümü

#### **4.1. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda Prolin Uygulamalarının Marul Fidelerinde Makro-Mikro Element Üzerine Etkileri**

Marul fidelerinin makro ve mikro element içeriği üzerine farklı dozlarda uygulanan prolin ve UV-B radyasyonunun etkileri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Yapılan analizlere göre tüm makro ve mikro elementlerin konsantrasyonları kontrol grubuna göre prolin uygulaması ile birlikte artmıştır. Marul fidelerinde makro ve mikro element konsantrasyonları UV-B uygulamasından önemli biçimde etkilenmemiştir. Kontrol grubuna göre prolin ile birlikte uygulanan UV-B, marul fidelerinde makro ve mikro element içeriğini önemli oranda artırmıştır. Cu, Fe, Mn, Zn, S, B ve Se gibi mikro elementlerin konsantrasyonları prolin 1 uygulamasına göre prolin 2 uygulamasında oldukça büyük artış göstermiştir.

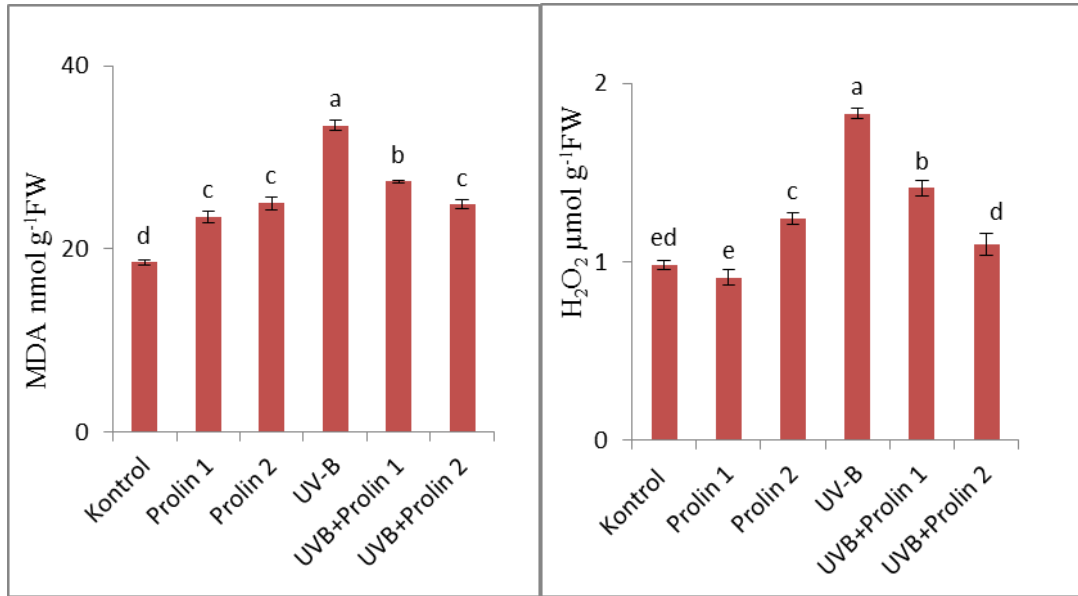


**Çizelge 4.1.** Prolin ve 12 saat UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarındaki makro ve mikro element içeriği

	Kontrol	Prolin 1	Prolin 2	UV-B	UV-B+Prolin 1	UV-B+Prolin 2
N %	1,57±0,05c	3,35±0,10b	3,62±0,01ab	1,59±0,02c	3,56±0,21ab	3,86±0,09a
P mg kg <sup>-1</sup>	1542,19±42,78d	3722,81±177,48b	4374,38±29,42a	1533,59±61,29d	2451,88±18,20c	2300,71±57,70c
Ca mg kg <sup>-1</sup>	10523,9±94,53d	17117,8±255,64c	22699,5±456,92a	10622,1±88,99d	17058,9±275,21c	21377,8±320,8b
Mg mg kg <sup>-1</sup>	2363,4±109,06d	2525,5±41,21d	5114,8±51,87b	2208,7±45,40d	3415,4±146,41c	5578,7±170,94a
Na mg kg <sup>-1</sup>	46,92±0,7c	103,90±1,20a	102,28±0,86a	47,47±0,56c	100,22±1,14a	91,41±1,87b
K mg kg <sup>-1</sup>	17111,3±152,7b	39491,1±1062,8a	41019,5±400,1a	16420,4±554,6b	41262,7±1033,2a	41127,9±771,6a
Cu mg kg <sup>-1</sup>	8,69±0,20c	10,63±0,72c	31,50±1,20a	8,32±1,85c	23,74±0,60b	30,60±0,57a
Fe mg kg <sup>-1</sup>	14,75±0,28e	17,82±0,50d	39,89±0,13b	14,44±0,18e	31,50±0,62c	55,06±1,04a
Mn mg kg <sup>-1</sup>	13,12±0,08d	18,95±0,76c	35,48±1,09a	12,67±0,14d	30,36±0,53b	35,75±0,49a
Zn mg kg <sup>-1</sup>	16,09±0,25e	41,44±0,74d	59,85±0,71b	15,65±0,68e	55,03±1,29c	66,30±1,03a
S mg kg <sup>-1</sup>	1031,6±64,97d	1434,7±17,47c	2065,2±17,09b	949,6±71,12d	2674,2±53,65a	2182,17±133,4b
B mg kg <sup>-1</sup>	7,91±0,01c	12,06±0,50b	21,35±1,46 a	7,85±0,10 c	22,81±0,81 a	22,20±1,12 a
Se mg kg <sup>-1</sup>	2,42±0,07b	3,27±0,07a	3,39±0,08 a	2,51±0,07 b	3,37±0,03 a	3,42±0,03 a

#### 4.2. Malondialdehit (MDA) ve Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Miktarı

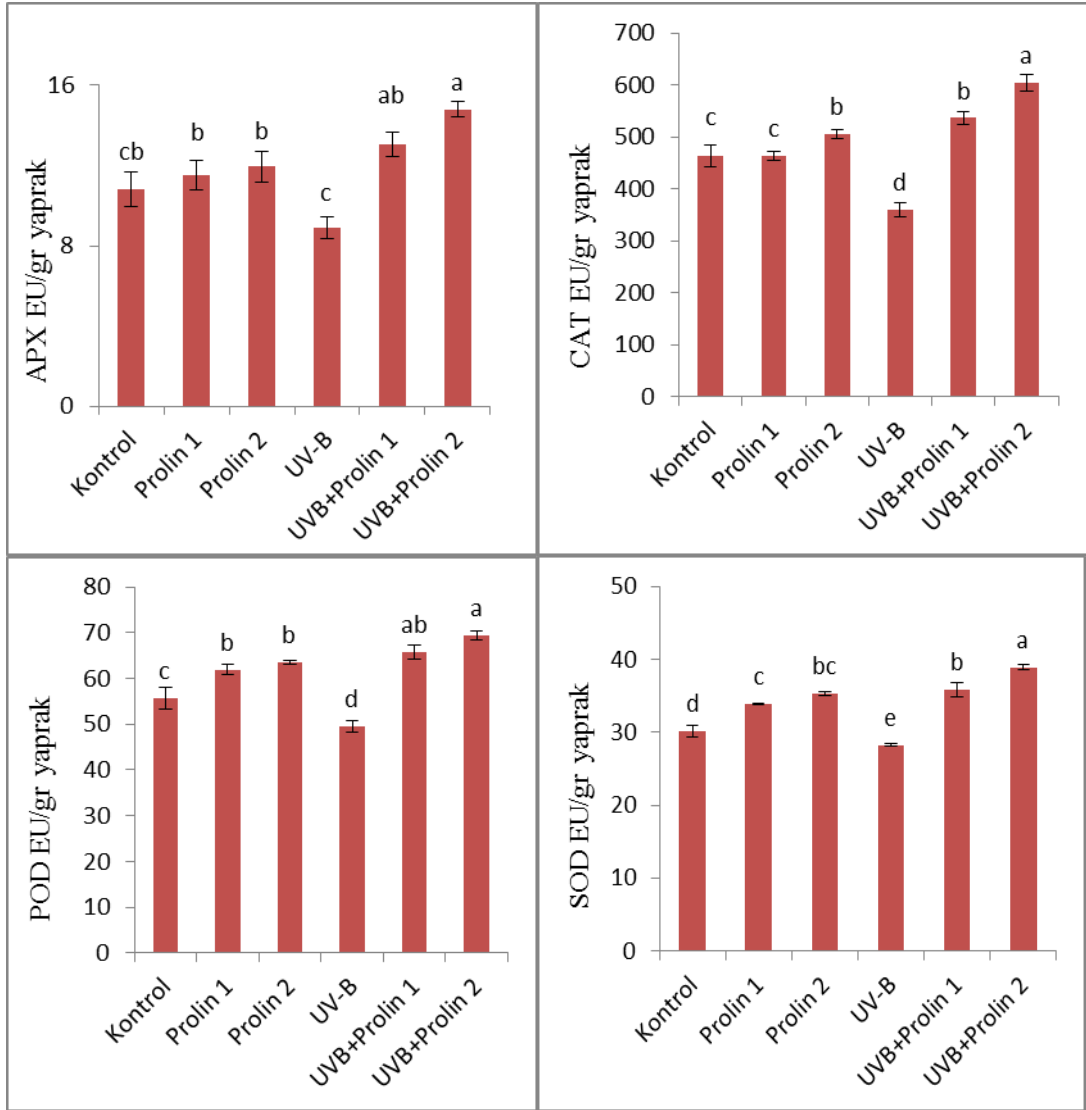
Kontrol ile kıyaslandığında hem prolin hem de UV-B, marul fidelerinde MDA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesini artırmıştır (Şekil 4.7). Tek başına uygulanan UV-B marul fidelerindeki MDA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarlarını yaklaşık %80 oranında artırmış, tek başına UV-B uygulaması ile mukayese edildiğinde UV-B ile birlikte uygulanan prolin marul fidelerindeki MDA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını önemli ölçüde düşürmüştür.



Şekil 4.7. Prolin ve 12 saat UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında MDA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği

#### 4.3. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Marul fidelerinde antioksidan enzim aktiviteleri UV-B, prolin ve UV-B+prolin uygulamasından önemli ölçüde etkilenmiştir ( $p \leq 0.05$ ). Şekil 4.8'de görüldüğü gibi kontrol grubuna kıyasla 10 mM ve 20 mM prolin uygulamaları ölçülen tüm antioksidan enzimlerin (10 mM prolin uygulaması için ölçülen katalaz aktivitesi hariç) aktivitelerini önemli ölçüde artırırken, UV-B ile birlikte uygulanan 10 mM ve 20 mM prolin kontrole göre tüm enzimlerin aktivitelerini daha fazla artırmıştır. Marul yapraklarına uygulanan UV-B yapraklardaki tüm ölçülen enzimlerin konsantrasyonlarını azaltmıştır.

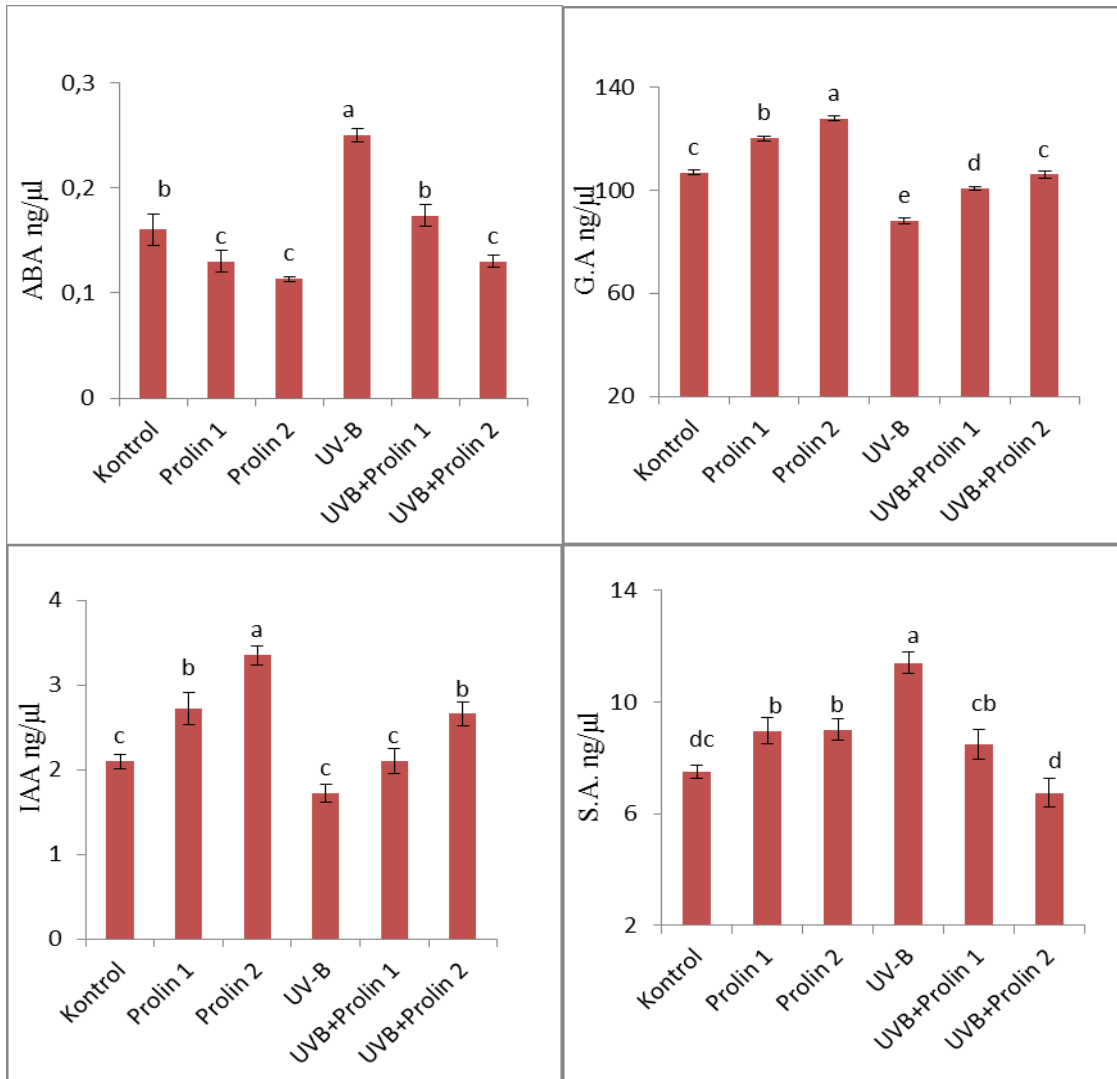


**Şekil 4.8.** Prolin ve 12 saat UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında antioksidan enzim içeriği

#### 4.4. Bazı Bitkisel Hormonların Miktarı

Kontrol grubu ile kıyaslandığında marul fidelerindeki ABA konsantrasyonu UV-B stresi altında önemli oranda artmıştır ( $p \leq 0.05$ ). Tek başına UV-B uygulaması ile karşılaştırıldığında yapraklara uygulanan 10 mM ve 20 mM prolisin ABA konsantrasyonunu önemli oranda azaltmıştır (Şekil 4.9). Öte yandan yapraklara tek başına uygulanan prolisin ise yapraklardaki ABA konsantrasyonunu düşürmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında bitkisel hormonlardan giberellik asit (GA) ve indol

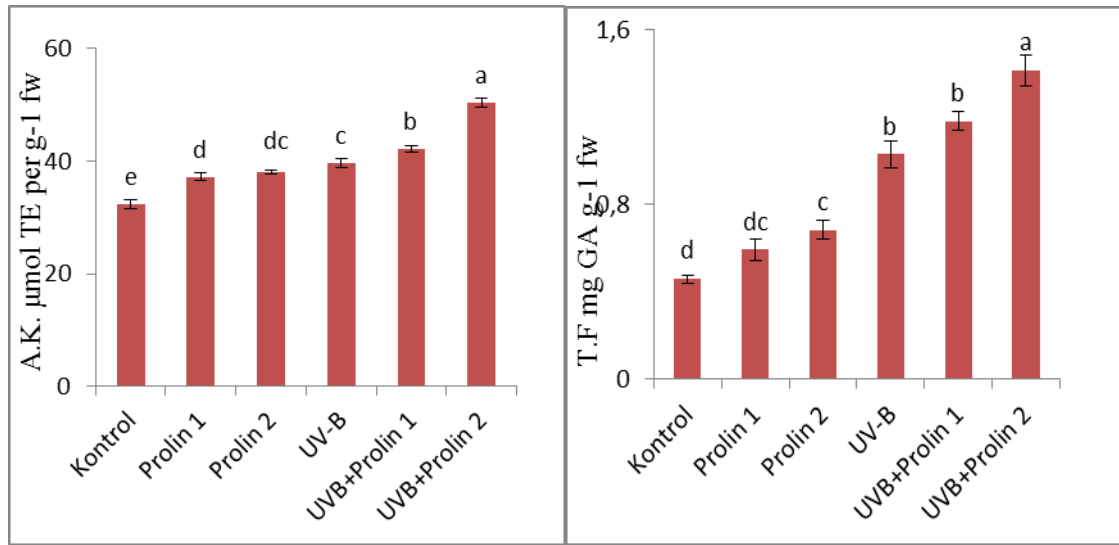
asetik asit (IAA) miktarı hem 10 mM hem de 20 mM prolin uygulaması ile birlikte önemli ölçüde artmıştır ( $p \leq 0.05$ ). Fidelere uygulanan UV-B ise her iki hormonun konsantrasyonunu önemli oranda azaltmıştır (şekil 4.9). Tek başına UV-B uygulaması ile karşılaştırıldığında, UV-B uygulamasından 24 saat önce fidelere uygulanan prolin, GA ve IAA miktarını artırmıştır. Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde salisilik asit (SA) miktarı uygulanan UV-B ile birlikte önemli ölçüde artmıştır. Tek başına UV-B uygulaması ile kıyaslandığında UV-B ile birlikte yapraklara uygulanan prolin fidelere SA miktarını önemli oranda düşürmüştür ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.9.** Prolin ve 12 saat UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında bazı hormonların içeriği

#### 4.5. Antioksidan Kapasite ve Toplam Fenolik Madde Miktarı

Marul fidelerinin antioksidan kapasitesi ve toplam fenolik madde içeriği kontrol ile mukayese edildiğinde hem prolin hem de UV-B uygulama gruplarında artmıştır (Şekil 4.10). UV-B ile birlikte yapraklara uygulanan prolin kontrol grubuna göre toplam antioksidan ve toplam fenolik madde içeriğini önemli ölçüde artırmıştır ( $p \leq 0.05$ ).

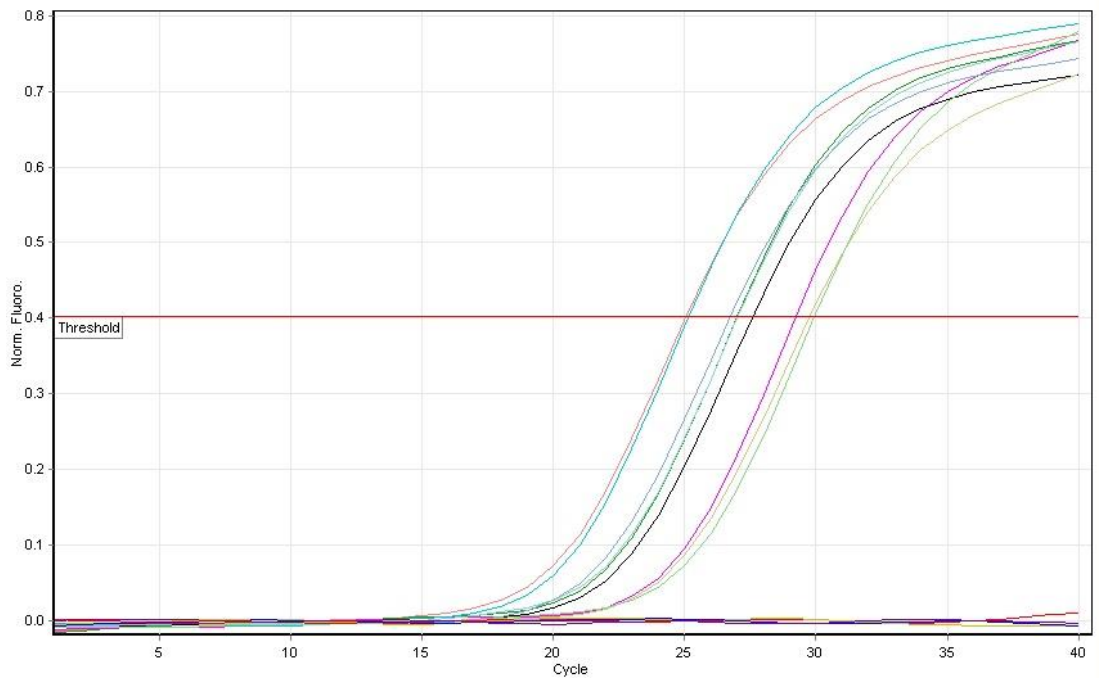


Şekil 4.10. Prolin ve 12 saat UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında toplam antioksidan ve toplam fenolik madde içeriği

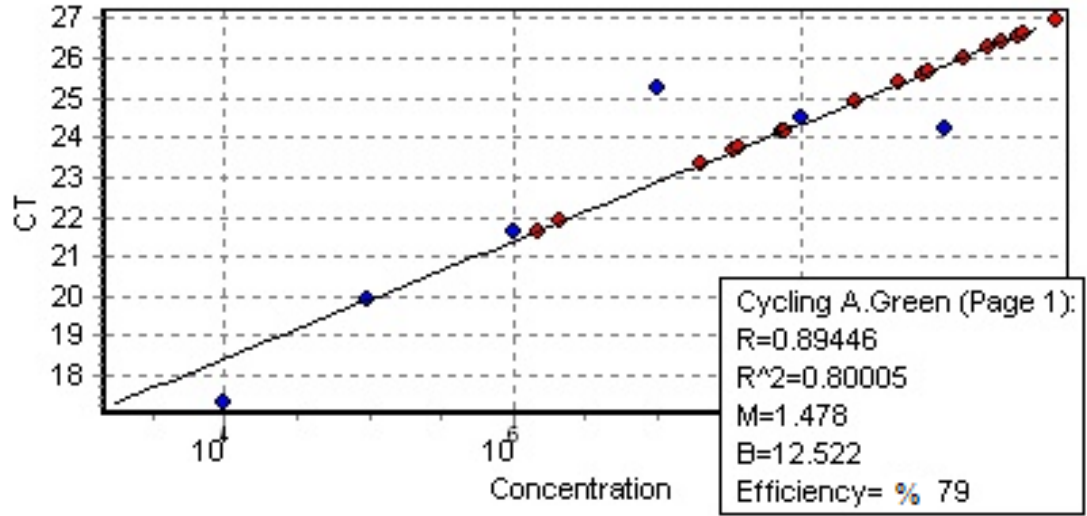
#### 4.6. Marul Yapraklarına Ait Dokulardan Elde Edilen RNA'lara Ait Konsantrasyon ve 260/280 Oranları

İzole edilen total RNA'ların saflığı 260 ve 280 nm'de ölçülen absorbanların oranıyla ( $A_{260}/A_{280}$ ) belirlenebilmektedir. Absorbanların oranları ekstraksiyon katsayısı ve bazların doğasına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Saf bir RNA'nın 260/280 oranı 2,0'a yakındır. Çalışmada nanodrop spektrofotometre ile ölçülen  $A_{260}/A_{280}$ 'nin 2,0'a yakın olması RNA izolasyonunun başarılı olduğu anlamına gelmektedir. RNA'lara ait konsantrasyonlar cDNA kütüphanesine koyulması gereken uygun total RNA'yı içermektedir (Çizelge 4.2).

Araştırma kapsamında PAL ve  $\gamma$ -TMT miktarının belirlenmesinde Rotorgene 3000 Real-time PCR kullanılarak amplifikasyon görüntüleri elde edilmiştir. Oluşan piklerin treshhold çizgisini kestiği yerler ilk anlamlı artışın olduğu nokta olup pikler yukarı çıkıp 40. döngüden sonra tekrar paralel bir düzlemde birleşmiştir (Şekil 4.11). Genlere ait örnek etkinlik oranı Şekil 4.12’de verilmiştir. Real-time PCR’da amplifiye edilen DNA’nın kopya sayıları primer etkinlik oranına bağlı olarak değişmektedir.



**Şekil 4.11.** Örnek Real-time PCR amplifikasyon görüntüsü



Şekil 4.12. Genlere ait örnek standart eğri etkinlik oranı

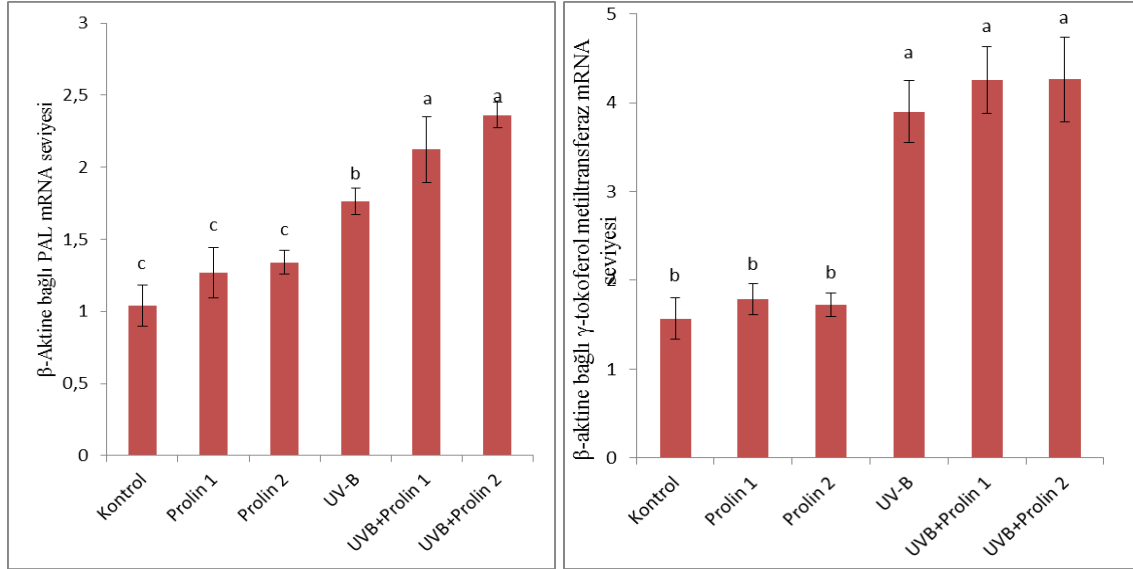
Çizelge 4.2. Uygulama gruplarına ait RNA konsantrasyon ve absorbands değerleri

Örnek adı	Konsantrasyon (ng/µl)	260/280
Kontrol	465,6154	2,0876
UV-B Kontrol	609,2308	2,0478
Prolin- I	836,6538	2,1262
Prolin- II	318,5769	2,0447
UV-B+Prolin- I	1089,3462	2,0852
UV-B+Prolin- II	641,0385	2,1147

#### 4.7. PAL ve $\gamma$ -TMT mRNA Seviyesi

Kantitatif RT-PCR; marul yapraklarında fenolik bileşikler ve vitamin E'nin aralarında bulunduğu antioksidanların biyosentez yollarının aktivasyon göstergesi olan fenil alanin amonyak liyaz (PAL) ve  $\gamma$ -tokoferol metiltransferaz ( $\gamma$ -TMT) gen ekspresyonunu ölçmek için kullanılmıştır. Hem PAL hem de  $\gamma$ -TMT mRNA seviyesi yapraklara uygulanan UV-B ile birlikte önemli oranda artmıştır (Şekil 4.13). Kontrol ile

kıyaslandığında UV-B ile birlikte yapraklara uygulanan prolin bu genlerin ekspresyonunda önemli oranda artışa neden olmuştur ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.13.** UV-B ve prolin uygulanmış marul yapraklarında PAL ve  $\gamma$ -TMT mRNA seviyesi

#### 4.8. Çözünebilir Şeker ve Organik Asit Miktarları

Marul fidelerinde çözünebilir şekerlerin miktarları hem ayrı ayrı prolin ve UV-B hem de prolin ve UV-B birlikte uygulandığında önemli ölçüde artış göstermiştir (Çizelge 4.3). Prolin ve UV-B uygulaması ile organik asitlerden bütirik, fumarik, maleik ve tartarik asit miktarları çok az miktarda düşmüş, laktik ve sitrik asit miktarları yükselmiştir. Ölçülen diğer organik asitler prolin ve UV-B uygulamalarında kararsız bir durum sergilemişlerdir (Şekil 4.14).

#### 4.9. Amino Asit Miktarları

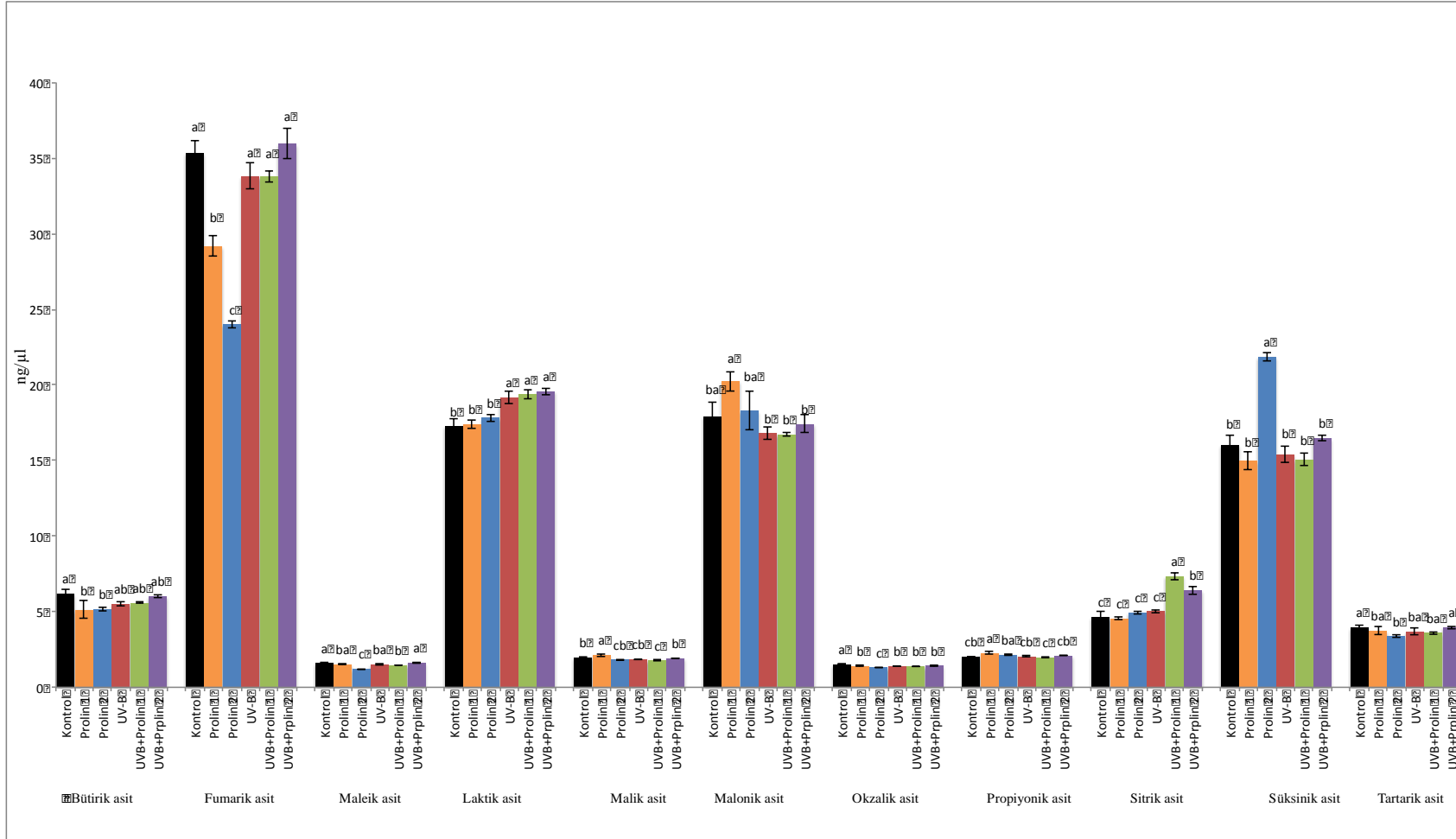
HPLC analiz sonuçlarına göre marul yapraklarında en fazla miktarda olan amino asitler sırasıyla Arginin, Asparagin, Glutamin, Serin, Treonin, Alanin ve Aspartat olarak belirlenmiştir. UV-B uygulaması ile birlikte marul fidelerinde bütün amino asitlerin



miktarı artmıştır (Çizelge 4.4). Yalnız UV-B ile kıyaslandığı zaman UV-B ile birlikte fidelere prolin uygulanması amino asit konsantrasyonlarını düşürmüştür. Tek başına uygulanan prolin (özellikle prolin 2) kontrole göre amino asit konsantrasyonunda yükselmeye neden olmuştur.

**Çizelge 4.3.** Prolin ve 12 saat UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında çözünebilir şeker içeriği (nmol g<sup>-1</sup> FW)

	Kontrol	Prolin 1	Prolin 2	UV-B	UV-B+Prolin 1	UV-B+Prolin 2
<b>Fruktoz</b>	77,54±1,73d	88,3±0,51c	91,16±0,79c	105,91±3,66b	111,96±3,32b	134,38±1,80a
<b>Glukoz</b>	778,99±50,19d	982,81±6,07c	1062,16±36,15c	1226,57±10,72b	1339,98±90,25b	1655,45±46,26a
<b>Sükroz</b>	1647,38±30,38e	2926,62±71,67d	3589,64±23,14c	3556,38±75,03c	4249,13±48,33b	5308,22±141,94a
<b>Maltoz</b>	40,70±1,71de	53,46±0,46cd	49,94±2,98de	64,22±1,91c	98,25±7,00b	114,16±3,99a



Şekil 4.14. UV-B ve prolin uygulanmış marul yapraklarında organik asit seviyeleri (ng/μl)

**Çizelge 4.4.** Prolin ve 12 saat UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında amino asit içeriği (pmol/μl)

	Kontrol	Prolin 1	Prolin 2	UV-B	UV-B+Prolin 1	UV-B+Prolin 2
Arginin	14438 ±569b	14742±316b	16473±468a	15459±643ab	14603±615b	14552±413b
Asparagin	8217 ±324c	8011±475c	9375 ±266 b	12116,63±191,40a	7941,86±94,47c	8282,08±235,41c
Aspartat	4372,21±3,52c	4595,73±131,41bc	4988,31±141,92b	6726,18±148,73a	4434,12±198,10c	4406,53±125,25c
Fenilalanin	1875,5±37,31c	1830,06±48,37c	2063,71±58,71b	2908,41±55,91a	1756,26±19,72c	1823,03±51,81c
Glisin	2785,69±62,94c	2780,70±54,48c	3254,28±92,59b	4357,52±149,65a	2806,99±50,40c	2874,74±81,71c
Glutamat	2703,17±106,59c	2635,27±156,43c	3084,08±87,74b	4365,95±114,07a	2701,77±84,50c	2724,39±77,43c
Glutamin	7092,35±161,71c	7410,02±159,66bc	8281,89±235,64b	10440,68±566,54a	7102,26±99,01c	7315,99±207,95c
Hidroksiprolin	1078,00±42,51b	1117,59±23,49b	1229,90±34,99b	2140,17±80,84a	1116,68±71,79b	1086,47±30,88b
Histidin	3139,45±123,80b	3193,94±73,79b	3581,84±101,91a	3600,16±143,58a	3071,23±42,56b	3164,10±89,93b
İzolösin	2233,63±45,60c	2275,86±102,60c	2624,44±74,67 b	3048,39±59,96a	2354,33±125,16c	2318,35±65,89c
Lisin	3320,90±79,16c	3305,83±79,03c	3612,79±32,74b	4458,49±148,45a	3219,68±71,84c	3279,78±93,22c
Lösin	2093,69±82,56c	2170,77±63,29c	2388,72±67,96b	3367,27±79,38a	2110,71±82,66c	2110,12±59,97c
Methionin	1768,49±69,73c	1790,74±46,35c	2017,68±57,40b	2175,88±11,54a	1693,30±29,55c	1782,37±50,66c
Alanin	5810,15±229,11c	5864,21±164,89c	6628,86±188,60b	7486,21±129,06a	5612,87±67,59c	5855,75±166,44c
Sarkozin	2433,95±66,20c	2602,80±65,31c	2929,05±83,33b	4160,69±124,4a	2525,02±44,23c	2487,44±57,60c
Serin	6434,39±12,54cb	6638,61±132,98b	7145,76±73,28a	7107,88±165,06a	6228,15±84,41c	6651,83±86,21b
Sistein	2274,43±46,76c	2348,96±76,77c	2670,98±75,99b	3283,89±156,05a	2341,26±74,47c	2359,47±67,06c
Treonin	5836,97±230,17cb	5957,02±128,90cb	6326,12±164,05b	7446,48±168,29a	5698,18±72,64c	5549,45±217,80c
Tirozin	4486,75±176,93b	4640,72±94,50b	5118,99±145,64b	12226,54±1102,80a	4321,88±57,83b	4521,97±128,53b
Triptofan	1279,06±26,85c	1281,11±25,41c	1421,27±40,4b	1532,64±63,16a	1189,97±23,0c	1255,51±35,68c
Valin	650,80±15,36b	654,79±13,05b	727,29±20,69b	960,48±37,06a	676,89±58,84ab	642,47±18,26b

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkiler çeşitli çevresel streslere maruz kaldıklarında reaktif oksijen türevlerinin üretimi ve antioksidanların aktivitesi arasındaki denge bozulur ve bu durum oksidatif hasara neden olur. Çok sayıdaki çalışmada UV-B stresinin bitki hücrelerinde oksidatif hasara neden olan ROT oluşumunu teşvik ettiği belirtilmiştir (Sarkar *et al.* 2011; Zlatev *et al.* 2012; Liu *et al.* 2012). ROT yüksek derecede reaktiftir ve etkili koruma mekanizmalarının yokluğunda nükleik asitler, proteinler, lipidler ve çeşitli pigmentlerde oksidatif hasar oluşturarak normal bitki metabolizmasını bozmaktadır. Araştırmamızda marul fidelerine uygulanan UV-B, yapraklarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve MDA'yı (lipid peroksidasyonunun indeksi olarak ölçülmüştür) önemli ölçüde artırmıştır (p≤0.05). Yapraklara UV-B uygulanmasından 24 saat önce uygulanan prolin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve MDA konsantrasyonlarında düşüşe neden olmuştur. Çalışmamız sonucunda elde edilen bu veriler UV-B veya diğer çevresel stres şartları altında marul yapraklarında belirlenen ve Santa-Cruz *et al.* (2010), Tian and Lei (2007), Liu *et al.* (2012), Xu *et al.* (2008), tarafından rapor edilen verilerle örtüşmektedir. Yine Radyukina *et al.* (2011), UV-B'nin adaçayı yapraklarında MDA içeriğini önemli oranda artırdığını, yapraklara önceden uygulanan prolinin MDA miktarını önemli ölçüde azalttığını rapor etmiştir. Aynı yazarlar tarafından prolinin tuz stresi altındaki adaçayı yapraklarında MDA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını azalttığı kaydedilmiştir (Radyukina *et al.* 2011). UV-B doğrudan ROT üretmez ancak antioksidan savunma sistemini etkilemek ve lipid peroksidasyonunu teşvik edip bitkilerde MDA miktarını artırmak yoluyla oksidatif strese neden olmaktadır. Marul fidelerine UV-B uygulamasından önce uygulanan prolin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimini azaltıp ve MDA miktarını düşürerek muhtemel oksidatif hasardan hücre membranlarını korumaktadır.

Çeşitli stres koşulları altında, bitkilerde antioksidan enzimler ve düşük moleküler ağırlıklı antioksidan moleküllerden oluşan antioksidan sistemin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Antioksidan enzimleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun da stres koşullarında arttığı bildirilmiştir. Stres koşullarında oluşan ROT'lara karşı ilk harekete

geçen antioksidan enzim SOD'dır. SOD süperoksit radikalının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ise APX, CAT ve POD tarafından elemine edilir.

Çalışmamızda marul yapraklarına uygulanan UV-B'nin SOD aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir. Öte yandan kontrol grubu ile veya yalnız UV-B ile kıyaslandığında yapraklara UV-B uygulamasından 24 saat önce uygulanan 10 mM veya 20 mM prolinin SOD aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. Prolinin strese karşı koruyucu özelliğinden dolayı UV-B radyasyonu altında prolinin antioksidan gibi hareket ettiği ya da SOD'm da dahil olduğu antioksidan enzimlerin prolin aracılığı ile stimüle edildiği söylenebilir. Radyukina *et al.* (2011) UV-B'nin adaçayı yapraklarında SOD aktivitesini azalttığını, UV-B uygulanmasından önce dışardan yapraklara uygulanan 5 mM prolinin SOD aktivitesinde artışa neden olduğunu kaydetmişlerdir. Yine UV-B stresine maruz kalmış sürünücü çimen ve karaçayır yapraklarında SOD aktivitesinin azaldığı Sarkar *et al.* (2011) tarafından rapor edilmiştir.

Kontrol ile kıyaslandığında yalnız UV-B uygulaması marul yapraklarında APX, CAT ve POD aktivitesini azaltmıştır. Öte yandan UV-B ile birlikte yapraklara uygulanan prolin üç enzimin aktivitelerinde de artışa neden olmuştur. Düşük moleküler ağırlıklı metabolitler içinde yer alan prolin stres koşulları altında bitkide bir kaç kat atmaktadır (Radyukina *et al.* 2010). Eksojen olarak uygulanan prolinin ıspanak fidelerinde bazı antioksidan enzimlerin aktivitesini etkilediği gösterilmiştir. Özellikle 10 mM prolinin ıspanak yapraklarında peroksidaz aktivitesini artırdığı Öztürk and Demir (2002) tarafından rapor edilmiştir. Soya fidelerine uygulanan UV-B'nin APX ve CAT aktivitelerinde önemli oranda azalmaya yol açtığı buna karşın soya fidelerine UV-B uygulamasından önce uygulanan SNP'nin fidelerde bu enzimlerin aktivitelerinde artışa neden oluşu Santa-cruz *et al.* (2010) tarafından bildirilmiştir. Yine soya fidelerinde UV-B nedeniyle CAT aktivitesinde azalış Xu *et al.* (2008) tarafından tespit edilmiştir. Prolin aracılığı ile antioksidan enzim aktivitelerindeki artış, UV-B stresi altında oksidatif mekanizmanın geliştirilmesi üzerine prolinin etkisini göstermektedir. Bu rol uygulanan doza bağlı olarak küçük farklılıklar gösterse de istatistiki olarak önemlidir ( $p \leq 0.05$ ). Stres üzerine prolinin pozitif etkisi UV-B (Radyukina *et al.* 2011), tuz (Radyukina *et al.*

2008) ve deniz suyu stresine (Dawood *et al.* 2014) maruz kalmış bitkilerde de gösterilmiştir.

Kontrol ile mukayese edildiğinde yalnız UV-B uygulaması toplam fenolik madde ve antioksidan kapasiteyi önemli oranda artırmıştır. Marul yapraklarına UV-B ile birlikte uygulanan prolin yapraklardaki toplam fenolik madde miktarını ve antioksidan kapasiteyi tek başına UV-B uygulamasına göre daha çok artırmıştır. Çalışmamızda toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite arasında pozitif bir korelasyon da belirlenmiştir. Cadwell and Britz (2006) ve Lee *et al.* (2013) UV-B'nin marul yapraklarında antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde içeriğini artırdığını tespit etmişlerdir. Öte yandan Sarkar *et al.* (2011) UV-B stresi altındaki çimen türlerinde, Yao *et al.* (2011) UV-B radyasyonuna maruz kalmış buğday yapraklarında toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasitenin arttığını belirlemişlerdir. UV-B ve UV-B+prolin uygulamasına bağlı olarak toplam fenolik madde birikimi ve antioksidan kapasitedeki artış, fenolik maddelerin ve antioksidanların bitki hücrelerindeki muhtemel multifonksiyonel rollerine bağlanabilir. Fenolik maddeler yapraklarda UV-B radyasyonunu absorplayabilir ya da UV-B tarafından oluşturulan ROT'ni süpürücü antioksidanlar gibi hareket edebilir. Hatta UV-B stresi altında lipid peroksidasyonunu inhibe eden ya da serbest oksijen radikallerini süpüren antioksidan enzim cevabını teşvik edebilir. Öte yandan fenolik maddeler genellikle yaprakların epidermal bölgelerinde toplanır ve UV-B stresine karşı fotosentetik dokuları korur. UV-B radyasyonuna karşı fenolik madde artışı PAL aktivitesindeki artıştan kaynaklanabilir. PAL fenilpropanoidlerin biyosentetik yolundaki ilk reaksiyonu katalizleyen enzimdir ve bitkilerde fenolik maddelerin birikimine neden olur. Kantitatif RT-PCR analiz sonuçlarına göre marul yapraklarındaki PAL ve  $\gamma$ -TMT genlerinin ekspresyonu, uygulanan UV-B ve prolin ile artmıştır. Çalışmamızdan da görüldüğü gibi UV-B stresi marulda fitokimyasalların biyosentezinde yer alan anahtar genleri aktive edebilir. Garcia marcias *et al.* (2007) ve Oh *et al.* (2010, 2011) soğuk, sıcak, kuraklık, yüksek ışık gibi çevresel streslerin marulda antioksidan kapasite, fenolik bileşiklerin miktarı, PAL ve  $\gamma$ -TMT genlerinin ekspresyonunu artırdığını rapor etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar neticesinde marulda UV-B stresine karşı biriktirilen antioksidanların ve

fitokimyasalların birikiminin hem genetik kontrol hem de biyosentetik yolların kimyasal ve fizyolojik kontrolü altında olduğu söylenebilir.

Marul yapraklarına uygulanan UV-B bitki büyüme düzenleyicilerinden ABA ve SA miktarını artırmış, GA ve IAA miktarını azaltmıştır. UV-B uygulamasından 24 saat önce marul yapraklarına uygulanan prolin GA ve IAA miktarında artışa, ABA ve SA miktarında azalışa yol açmıştır. Çevresel stres şartlarına cevap olarak bitki hormonlarında değişimler çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Huang *et al.* 1997; Peng and Zhou 2009). IAA ve GA büyüme, çimlenme, farklılaşma, çiçeklenme, kök ve gövde gelişimi gibi birçok olayın bitkilerde düzenlenmesine katılan majör hormonlardır. Araştırma sonuçlarımıza göre UV-B stresi marul fidelerinde ROT oluşumunu teşvik etmiştir. ROT hasarı tarafından oluşturulan fotooksidasyondan dolayı marul yapraklarındaki GA ve IAA miktarı azalmış olabilir. UV-B stresi altında GA ve IAA konsantrasyonunda azalma soya yapraklarında Peng and Zhou (2009) tarafından kaydedilmiştir. Kuvvetli serbest radikal reaksiyonları ve biyomakromolekül metabolizması ve bozunumundaki düzensizlikler biyokimyasal olayların moleküler temelini oluşturmaktadır. Çalışmamızda UV-B koşullarında serbest radikal artışı ve metabolizmadaki değişimden dolayı bitki büyümesinde yavaşlama belirlenmiştir. Bu yavaşlamaya bitki hormonlarından büyümeyi teşvik eden GA ve IAA'nın miktarının azalmasına bağlanabilir. Öte yandan prolinin bitkilerde UV-B hasarını iyileştirici etkisi onun reaktif oksijen türevlerini etkili biçimde süpürmesinden kaynaklanabilir. Prolin UV-B stresi tarafından artırılan serbest radikalleri azaltarak GA ve IAA bozulmasını önleyebilir ve böylece bitkinin korunmasına katkıda bulunabilir.

Çalışmamızda ABA miktarının UV-B stresine bağlı olarak arttığı, UV-B ile birlikte uygulanan prolinin ABA miktarını azalttığı belirlenmiştir. ABA'nın fonksiyonlarından biri stoma bekçi hücrelerinin aktivitesini düzenlemektir. Olumsuz şartlarda bitki dokularında ABA birikimi, stoma iletkenliğini azaltır, stoma kapanmasına neden olur, fotosentezi inhibe eder, sekonder kök oluşumunu azaltır ve su kullanım etkinliğini artırır. UV-B radyasyonunun stoma kapanmasını teşvik ederek transpirasyonu azalttığı çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. ABA'nın neden olduğu stoma kapanmasında



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gereklidir. Çalışmamızda UV-B tarafından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının artırıldığı belirlenmiştir. UV-B tarafından ABA miktarının artırılması turgor kaybı, sentetik ABA'nın ayrılma inhibitör etkisi ve kloroplast membran permeabilitesinin artışından kaynaklanıyor olabilir. UV-B ile birlikte uygulanan prolinin ABA miktarını azaltması kloroplast zarındaki serbest radikal hasarının kısmen prolin tarafından azaltılması, fotosentetik aparatındaki hasarın kısmen prolin tarafından giderilmesi, osmotik basıncın prolin teşviki ile devamı ve kök sinyallerinin prolin tarafından zayıflatılmasından kaynaklanabilir.

Araştırma sonuçlarımıza göre kontrol ile kıyaslandığında yalnız UV-B uygulaması marul yapraklarında SA birikimini artırmış, UV-B+prolin uygulaması SA miktarını azaltmıştır. Çeşitli abiyotik stres faktörlerine bitkinin cevap oluşturmasında SA'nın rolü hakkındaki bilgilerimiz ve bu regülatörün seviyesindeki artıştan sorumlu mekanizmalar çok az veya belirsizdir. Literatürde UV-B stresine bağlı olarak SA miktarının arttığı kaydedilmiştir (Bandurska and Cieslak 2013). Örneğin 3.2 µMol m<sup>-2</sup> dozunda UV-B radyasyonu uygulanmış *Arabidopsis thaliana* fidelerinde SA miktarının yaklaşık yedi kat arttığı gözlemlenmiştir (Surplus *et al.* 1998). Yine arpa fidelerine uygulanan UV-B radyasyonunun fidelede SA seviyesini önemli miktarda artırdığı kaydedilmiştir (Bandurska and Cieslak 2013). Bitkilerde strese bağlı olarak SA miktarının artabileceği, eğer bu artış fazla ise oksidatif hasara neden olacağı bildirilmiştir (Choudhary and Agarwal 2014). Yine stres koşullarında bitkilerde SA artışının APX ve katalaz aktivitesi üzerine inhibitör etki yapabileceği ve bu durumun bitkide oksidatif hasara yol açabileceği ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimine neden olabileceği rapor edilmiştir (Rao *et al.* 1997; Vicente and Plasencia 2011; Choudhary and Agrawal 2014). Çalışmamızda UV-B stresi altında SA birikiminin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının arttığı belirlenmiştir. Dahası marul yapraklarında UV-B stresi altında CAT ve APX aktivitesi de azalmıştır.

Bitkilerdeki makro ve mikro element konsantrasyonları üzerine UV-B'nin etkisi tam açık değildir. Bazı araştırmacılar UV-B radyasyonunun artışı ile bitkinin besin elementi alınımının arttığını kaydetmişlerdir (Yao *et al.* 2014, Musil and Wand 1994). Yine UV-B'nin bitkilerdeki makro ve mikroelement konsantrasyonu üzerine etkisinin UV-B

süresi ve dozuna göre değiştiği belirtilmiştir (Yao *et al.* 2014). Çalışmamızda kontrol ile mukayese edildiğinde tek başına UV-B uygulaması marul yapraklarında N, P, Ca, Mg ve Na gibi elementlerin konsantrasyonunu değiştirmemiştir. Ancak UV-B ile birlikte yapraklara dışardan uygulanan prolin bu elementlerin miktarında artışa neden olmuştur. Yao *et al.* (2014) UV-B'nin buğdayda P alınımini azalttığını ve N ve K miktarını değiştirmediğini tespit emişlerdir. Correia *et al.* (2012) UV-B stresi altında mısır yapraklarında P, N, Cu, Zn ve Mn konsantrasyonunun azaldığını rapor etmişlerdir. Fe, Mn, Zn, Cu marul yapraklarında esansiyel mikrobeseleyici elementlerdir ve bitkilerdeki antioksidan enzimlerin aktivatörü ya da kofaktörleridir. Çalışmamızda UV-B stresine bağlı olarak bu elementlerin içeriğinde önemli değişim kaydedilmemiştir. Ancak UV-B ile birlikte marul yapraklarına uygulanan prolin bu elementlerin konsantrasyonunu kontrole göre önemli oranda artırmıştır. UV-B ve prolinin kombine uygulandığında antioksidan enzimlerin konsantrasyonundaki artışı bu enzimlerin ihtiyaı olan Fe, Mn, Zn, Cu gibi kofaktörlerinde artışına neden olmuş olabilir.

Amino asitler canlı metabolizmasında bir çok fonksiyona sahiptir. Esansiyel amino asitlerin çoğu bitkilerden temin edilir, çünkü insan ve hayvanlar bu amino asitleri yeterince sentezleyemezler. Bitkilerde serbest amino asitlerin üretimi ve dağılımı çevresel faktörler tarafından etkilenir. Çalışmamızda marul yapraklarında en fazla bulunan amino asitler Arginin, Asparagin, Glutamin ve Serin olarak belirlenmiştir. Ramos *et al.* (2011) marul aksesyonları üzerine yaptıkları araştırmada çalışmamıza benzer biçimde yapraklarda en fazla bulunan amino asitlerin Arginin, Asparagin, Glutamin ve Serin olduğunu belirlemişlerdir. Mevcut araştırmamızda marul yapraklarındaki amino asit konsantrasyonunun UV-B tarafından önemli ölçüde etkilendiği, yapraklara tek başına uygulanan UV-B'nin yapraklardaki amino asitlerin konsantrasyonlarını artırdığı, buna karşın UV-B ile birlikte uygulanan prolinin amino asit konsantrasyonlarını düşürdüğü tespit edilmiştir. Ramos *et al.* (2011) selenyum uygulanan marul yapraklarının amino asit kompozisyonunda kontrol gruplarına göre değişimlerin olduğunu tespit etmişlerdir. Öte yandan UV-B stresinin üzüm meyvelerinde Arjinin, Glutamin ve GABA gibi bazı amino asitlerin konsantrasyonlarını artırdığı, buna karşın Serin, Glisin gibi bazı amino asitlerin konsantrasyonlarını

düşürdüğü belirlenmiştir (Martinez Lüscher *et al.* 2014). Yüksek miktardaki ışığın hardal yapraklarında amino asit konsantrasyonunu artırdığı saptanmıştır (Li *et al.* 2013). UV-B koşulları altında hücre hasarının önlenmesi ve reaktif oksijen türevlerinin birikiminin engellenmesinde anahtar rol oynayan amino asitlerin birikimi stres şartlarından bitkinin korunmasında önemlidir. Bu durum Gregan *et al.* (2012) ve Keller and Torres-Martinez (2004) tarafından da belirtilmiştir.

Marul yapraklarına uygulanan UV-B ve prolin yapraklardaki organik asit konsantrasyonlarında değişime neden olmuştur. Çevresel stres koşullarına bitkilerin cevap oluşturmasında farklı organik asitlerin hücre içi iyonik dengenin sürdürülmesinde farklı rolleri vardır. Stres koşullarında organik asitlerin metabolik düzenlenmesinde bir veya daha çok anahtar enzim rol oynayabilir. Bu anahtar enzimler TCA döngüsü, glikoliz gibi temel metabolik yollara katılan enzimler olabilir. Enzim aktivitesi sentez seviyesinde (transkripsiyon, translasyon ve yeni polipeptidlerin modifikasyonu) veya aktivatör ve inhibitörler tarafından sentezden sonra düzenlenebilir. UV-B stresine bağlı olarak organik asit birikiminin rolü açık biçimde tanımlanabilirse bu durum bitkinin UV-B toleransındaki anahtar genlerin klonlanmasını ve belirlenmesini mümkün kılar. UV-B stresi altında marul yapraklarındaki organik asit miktarlarındaki değişim hücre içi iyonik dengenin sürdürülmesi, membranların ve makromoleküllerin stabilitesi için gerekli olabilir.

UV-B absorplayan maddeler ve fenolik bileşiklerin sentezi için şeker tüketimi gerektiğinden dolayı (Lister *et al.* 1997), çalışmamızda çözünebilir şeker konsantrasyonlarındaki değişim analiz edilmiştir. Kontrol ile mukayese edildiğinde marul yapraklarına uygulanan UV-B ve UV-B ile kombine uygulanan prolin monosakkaritlerden glukoz ve fruktoz, disakkaritlerden sükroz ve maltoz miktarını önemli oranda artırmıştır. Sonuçlarımıza paralel olarak Rybus-Zajac *et al.* (2014) salatalık yapraklarına uygulanan UV-B'nin yapraklardaki glukoz, fruktoz ve sükroz miktarını artırdığını belirtmişlerdir. Yine UV-B koşulları altında çimen, meşe yaprakları ve limonda çözünebilir şekerlerin konsantrasyonlarının arttığı rapor edilmiştir (İnterdonato *et al.* 2011). Öte yandan Comont *et al.* (2013) *Lolium perenne*

yapraklarında çözünebilir şeker konsantrasyonunun UV-B tarafından etkilenmediğini kaydetmiştir. Çözünebilir şekerler arasında özellikle glukoz, fruktoz ve sükroz hücre metabolizması ve bitki yapısının düzenlenmesinde merkezi rol oynarlar. Ayrıca oksidatif hasara karşı bitki hücrelerini korurlar. UV-B veya diğer çevresel stres koşullarında artan ROT birikimine karşı hücreler toplam çözünebilir şeker miktarını artırırlar (Shahid *et al.* 2014).

### **Sonuçlar:**

Prolin uygulaması marul bitkisinin de UV-B hasarını düşürerek bitkinin UV-B radyasyonuna uyumunu artırmıştır.

UV-B uygulamasıyla artan PAL ve  $\gamma$ -TMT genlerinin ifadesi prolin uygulamasıyla daha fazla artması, prolinin genlerin ifadesini artırmak yoluyla antioksidan moleküllerin miktarında artışa neden olduğunu, böylece reaktif oksijen türevlerinin azaltılmasına katkıda bulunduğu söylenebilir. Ayrıca PAL ve  $\gamma$ -TMT genlerinin ifadesindeki artışa paralel olarak UV-B uygulaması marul yapraklarında antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde miktarını artırmış, yapraklara uygulanan prolin hem antioksidan kapasitede hem de toplam fenolik madde miktarında daha fazla artışa neden olmuştur.

Zararlı reaktif oksijen türlerinden olan ve genelde stres şartlarında miktarları artan  $H_2O_2$ 'nin UV-B etkisiyle miktarı artmıştır. prolin uygulamasıyla bu reaktif oksijen türünün miktarları azalmıştır. Bu durum bitkinin UV-B'ye toleransını artırabilir.

Tüm streslerde miktarı artan ve stresin bir ölçütü olarak kullanılan lipid peroksidasyonun (LPO) UV-B uygulamasıyla artması ve prolin uygulamalarında ise miktarının düşmesi prolinin UV-B stresinin yıkıcı etkisini düşürerek bitkinin bu şartlara uyumunda etkili olduğu tezini desteklemektedir.

UV-B uygulamasıyla marul yapraklarındaki antioksidan enzim aktiviteleri azalırken prolin uygulaması ile bu enzimlerin aktiviteleri artırmıştır. Bu sonuç yapraklara

dışardan uygulanan prolinin antioksidan enzimlerin artışını teşvik ederek oksidatif hasarın engellendiğini göstermesi açısından önemlidir.

UV-B uygulaması bitkisel hormonlardan ABA ve SA miktarını artırırken GA ve IAA miktarını düşürmüştür. Yapraklara püskürtülen prolin yapraklardaki GA ve IAA miktarını artırmıştır. Prolin içsel hormon miktarının düzenlenmesine yardım ederek bitkinin olumsuz şartlarda hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır.

UV-B uygulaması çözünebilir şekerlerin miktarlarında artışa neden olmuş, prolin uygulaması bu şekerlerin konsantrasyonlarında daha fazla artışa yol açmıştır. Şekerlerin miktarındaki artış bitki metabolizmasının düzenlenmesinde rol almalarından dolayıdır ve eksojen prolinin bitki metabolizmasının düzenlenmesindeki katkısını göstermektedir.

Marul yapraklarına prolin, UV-B ve prolin+UV-B uygulaması yapraklardaki organik asitlerin konsantrasyonlarında da değişime yol açmıştır. Prolin stres koşullarında bir takım organik asitlerin birikiminde katkı yapmıştır.

Marul yapraklarındaki çeşitli makro-mikro elementlerin miktarları ve amino asitlerin konsantrasyonları hem UV-B hem de prolin tarafından etkilenmiştir.

**KAYNAKLAR**

- Abdelhamid, M.T., Rady, M., Osman, A., Abdalla, M.A., 2013. Exogenous application of proline alleviates salt-induced oxidative stress in *Phaseolus vulgaris* L. plants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, (88), 439–446.
- Agarwal, S. and Pandey, V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, (48), 555-560.
- Agati, G. and Tattini, M., 2010. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytology*, (186), 786–793.
- Ali, Q., Ashraf, M., Athar, H.R., 2007. Exogenously applied proline at different growth stages enhances growth of two maize cultivars grown under water deficit conditions. *Pakistan Journal of Botany*, (39), 1133–1144.
- Ali, Q., Ashraf, M., Shahbaz, M., Humera, M., 2008. Ameliorating effect of foliar applied proline on nutrient uptake in water stressed maize (*Zea mays* L.) plants. *Pakistan Journal of Botany*, (40), 211–219.
- Ali, Q. and Ashraf, M., 2011. Induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: growth, photosynthesis, water relations and oxidative defence mechanism. *Journal of Agronomy and Crop Science*, (197), 258–271.
- Ananieva, E.A., Alexieva, V.S., Popova, L.P., 2002. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, (159), 685-693.
- Angelini, R., Federico, R., 1989. Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *Journal of Plant Physiology*, (135), 212-217.
- Angelini, R., Manes, F., Federico, R., 1990. Spatial and functional correlation between diamine oxidase and peroxidase and their dependence upon deetiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta*, (182), 89-96.
- Antoine, F.R., Wei, C., Otwell, W.S., Sims, C.A., Littell, R.C., Hogle, A.D., Marshall, M.R., 2002. Gas chromatographic analysis of histamine in Mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). *Journal of Agricultural and food chemistry*, (50), 4754-4759.
- Aristory, M.C., Toldra, F., 1991. Deproteinization techniques for HPLC amino acid analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. *Journal of Agricultural and food chemistry*, (39), 1792-1795.
- Ashraf, M. and Foolad, M.R., 2007. Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, (59), 206–216.
- Bandurska, H., Pietrowska-Borek, M., Cieślak, M., 2012. Response of barley seedlings to water deficit and enhanced UV-B irradiation acting alone and in combination. *Acta Physiologiae Plantarum*, (34), 161–171.
- Bandurska, H. and Cieślak, M., 2013. The interactive effect of water deficit and UV-B radiation on salicylic acid accumulation in barley roots and leaves. *Environmental and Experimental Botany*, (94), 9-18.

- Banowitz, G.M., 1994. Immunoanalysis of Cytokinins. Cytokinins. (Editors: Mok, D. W. S., Mok, M. C.) CRC Press, 305-315 p, London, England.
- Baslam, M., Esteban, R., Garcia-Plazaole, J.I., Goicoechea, N., 2013. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of major carotenoids, chlorophylls and tocopherol in green and red leaf lettuces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (97), 3119-3128.
- Battal, P. ve Tileklioğlu, B., 2001. The Effects of Different Mineral Nutrients on the levels of Cytokinins in Maize (*Zea mays* L.) *Turk.J.Bot*,25:123-130.
- Bremner, J.M., 1965a. Total nitrogen in: Methods of soil analysis part 2. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, 1145-1178.
- Caldwell, C.R. and Britz S.J., 2006. Effect of supplemental ultraviolet radiation on the carotenoid and chlorophyll composition of green house-grown leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*,(19), 637–644.
- Chen, W.S., 1991. Changes in cytokinins before and during early flower bud differentiation in lychee (*Litchi chinensis* Sonn). *Plant Physiology*, (96), 1203-1206.
- Chick, N., Jonmes, R.J., 1994. Disruption of maize kernel growth and development by heat stress. *Plant Physiology*, (106), 45-51.
- Comont, D., Winters, A., Gomez, L.D., McQueen-Mason, S.J., Gwynn-Jones, D., 2013. Latitudinal variation in ambient UV-B radiation is an top of form important determinant of *Lolium perenne* forage production, quality and digestibility. *Journal Experimental Botany*, (64), 2193-2204.
- Carletti, P., Masi, A., Grill, D., Tausz, M., Ferretti, M., 2003. Changes in antioxidant and pigment pool dimensions in UV-B irradiated maize seedlings. *Environmental and experimental botany*, (50), 149-157.
- Correia, C.M., Coutinho, J.F., Bacelar, E.A., Gonçalves, B.M., Björn, L.O., Pereira, J.M., 2012. Ultraviolet-B radiation and nitrogen affect nutrient concentrations and the amount of nutrients acquired by above-ground organs of maize. *Science World Journal*, 1-11.
- Chamberlain, J., 1995. *The Analysis of Drugs in Biological Fluids* (Second Edition). CRC Press, 139-145 p, New York, USA
- Cheikh, N. and Jones, R., 1994. Disruption of Maize Kernel Growth and Development by Heat Stress (Role of Cytokinin/Abscisic Acid Balance). *Plant Physiology* (106), 45-51.
- Chen, C. and Dickman, M.B., 2005. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (102), 3459–3464.
- Choudhary, K.K., Agrawal, S.B., 2014. Cultivar specificity of tropical mung bean (*Vigna radiata* L.) to elevated ultraviolet-B: Changes in antioxidative defense system, nitrogen metabolism and accumulation of jasmonic and salicylic acids. *Environmental, Experimental Botany*, (99), 122-132.
- Cutting, J.G.M., 1991. Determination of the cytokinin complement in healthy and witchesbroom malformed protease. *Journal of Plant Growth Regulation*, (10), 85-89.

- Dahlback, A., 2002. Recent changes in surface ultraviolet solar radiation and stratospheric ozone at a high arctic site. *UV Radiation and Arctic Ecosystems*, 3-22.
- Davies, P.J., 1995. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Du, W., Avena-Bustillos, R.J., Breksa, A.P., McHugh, T.H., 2014. UV-B light as a factor affecting total soluble phenolic contents of various whole and fresh-cut specialty crops. *Postharvest Biology and Technology*, (93), 72-82.
- Featonby-Smith, B.C., Van Staden, J., 1984. Identification and seasonal variation of endogenous cytokinins in *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenf. *Botanica Marina*, (27), 527-531.
- Fedina, I., Hidema, J., Velitchkova, M., Georgieva, K., Nedeva, D., 2010. UV-B induced stress responses in three rice cultivars. *Biologia plantarum*, (54), 571-574.
- Frohnmeier, H. and Staiger, D., 2003. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiology*, (133), 1420-1428.
- Garcia-Macias, P., Ordidge, M., Vysini, E., Waroonphan, S., Battey, N.H., Gordon, M.H., Hadley, P., Jhon, P., Lovegrove, J.A., Wagstaffe, A., 2007. Changes in the flavonoid and phenolic acid contents and activity of Red leaf lettuce (*Lollo rosso*) due to cultivation under plastic films varying in ultraviolet. *Agricultural and food chemistry*, (25), 10168-10172.
- Gong, Y., Toivonen, P.M.A., Lau, O.L. and Wiersma, P.A., 2001. Antioxidant system level in 'Braeburn' apple in related to its browning disorder. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 42, 259-264.
- Guo, J. and Wang, M., 2010. Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis and PAL expression in tomato (*Solanum lycopersicum L.*). *Plant Growth Regul*, (62), 1-8.
- Gregan, S.M., Wargent, J.J., Liu, L., Shinkle, J., Hofmann, R., Winefield, C., Trought, M., Jordan, M., 2012. Effects of solar ultraviolet radiation and canopy manipulation on the biochemical composition of sauvignon blanc grapes. *Australian Journal Grape Wine Research*, (18), 227-238.
- Hahlbrock, K. and Scheel, D., 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Plant Molecular Biology*, (40), 347-369.
- Hamilton, E.W., Heckathorn, S.A., 2001. Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiology*, (126), 1266-1274.
- Hansen, C.E., Venzler, H., Meins, F., 1984. Concentration gradient of trans-zeatin riboside and *trans*-zeatin in the maize stem. *Plant Physiology*, (75), 959-963.
- Hernandez-Minea, F.M., 1991. Identification of cytokinins and the changes in their endogenous levels in developing *Citrus sinensis* leaves. *Journal of Horticultural Science*, (66), 505-511.
- Hideg, E., Jansen, M., Strid, A., 2013. UV-B exposure, ROS and stress: inseparable companions or loosely linked associates. *Trends in Plant Science*, (18), 107-108.
- Hoque, M.A., Banu, M.N., Okuma, E., Amako, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y., 2007. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-



- cultured cells. *Journal of Plant Physiology*, (164), 1457–1468.
- Horgan, C.A., 1988. Recent Developments Concerning Saint-Venant's Principle: A Second Update. *Applied Mechanics Reviews*, (49), 101-111.
- Horgan, R. and Kramers, M.R., 1979. High-performance liquid chromatography of cytokinins. *Journal of Chromatography A* (173), 263–270.
- Huang, S.B., Dai, Q.J., Peng, S.B., 1997. Influence of supplemental ultraviolet-B on indolacetic acid and calmodulin in the leaves of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology*, (21), 59-64.
- Interdonata, R., Rosa, M., Nieva, C.B., Gonzalez, J.A., Hilal, M., Prado, F.E., 2011. Effect of low UV-B doses on the accumulation of UV-B absorbing compounds and total phenolics and carbohydrate metabolism in the peel of harvested lemons. *Environmental and Experimental botany*, (70), 204-211.
- Jansen, M.A.K., Gaba, V., Greenberg, B.M., 1998. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Science*, (3), 131–135.
- Jenkins, G.I., 2009. Signal transduction in responses to UV-B Radiation. *Annual Review Plant Biology*, (60), 407–431.
- Jiang, L., Wang, Y., Björn, L.O., Li, S., 2011. UV-B-induced DNA damage mediates expression changes of cell cycle regulatory genes in *Arabidopsis* root tips. *Planta*, (233), 831-841.
- Keller, M. and Torres-Martinez, N., 2004. Does UV radiation affect Winegrape composition. *Acta Horticulturae*, (640), 313-319.
- Kishor, P.B.K., Hong, Z., Miao, G.H., Hu, C.A.A., Verma, D.P.S., 1995. Overexpression of pyrroline-5-carboxylate synthetase increase proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, (108), 1387–1394.
- Koshimizo, K. and Iwamura, H., 1986. Cytokinins. *Chemistry of Plant Hormones*, (Ed. N.Takahashi), CRC Press Inc., Florida. 154-199.
- Kovac, M., Zel, J., 1994. The effect of aluminium on the cytokinins in the mycelia of *Lactarius piperatus*. *Planta Science*, (97), 137-142.
- Kuraishi, S., Tasaki, K., Sakurai, N., Sadatoku, K., 1991. Changes in levels of cytokinins in etiolated squash seedlings after illumination. *Plant Cell Physiol.*, 32(5): 585-591.
- Lee, M-J., Son, J.E., Oh, M-M., 2013. Growth and phenolic compounds of *Lactuca sativa* L. grown in a closed-type plant production system with UV-A, -B, or -C lamp. *Research Article*, (94), 197-204
- Lehman, S., Funck, D., Szabados, L., Rentsch, D., 2010. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids*, (39), 949-962.
- Li, X., Kim, Y.B., Uddin, M.R., Lee, S., Kim, S-J., Park, S.U., 2013. Influence of light on the free amino acid synthesis in *Brassica juncea* seedlings. *Journal of Agricultural and food chemistry*, (61), 8624-8631.
- Li, X.M., Ma, L.J., Bu, N., Li, Y.Y., Zhang, L.H., 2014. Effect of salicylic acid pretreatment on cadmium and /or UV-B stress in soybean seedling. *Biologia Plantarum*, (58), 195-199.
- Lidon, F.J.C., 2012. Decay of the chloroplast pool of ascorbate switches on the oxidative burst in UV-B-irradiated rice. *J. Agron Crop Science*, (198), 130–144.

- Lister, C.E., Lancaster, J.E., Sutton, K.H., Walker, J.R.L., 1997. Aglycone and glycoside specificity of apple skin flavonoid glycosyltransferase. *Journal Science Food Agriculture*, (75), 378–382.
- Liu, X., Chi, H., Yue, M., Zhang, X., Li, W., Jia, E., 2012. The Regulation of Exogenous Jasmonic Acid on UV-B Stress Tolerance in Wheat. *Plant Growth Regul.*, (31), 436–447.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* (25), 402–408.
- Machackova, I., Sukhova, L.S., Eder, J., Bibik, N.D., Korableva, N.P., 1993. Changes in the levels of free IAA and cytokinins in potato tubers during dormancy and sprouting. *Biologia Plantarum*, (35), 387–391.
- Mahdavian, K., Ghorbanli, M., Kalantari, Kh. M., 2008. Role of salicylic acid in regulating ultraviolet radiation-induced oxidative stress in pepper leaves. *Fiziologiya Rastenii*, (4), 620–623.
- Mansour, M.M.F., 1998. Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, (36), 767–772.
- Martinez-Lüscher, J., Torres, N., Hilbert, G., Richard, T., Sanchez-Diaz, M., Delrot, S., Aguirreola, J., Pascual, I., Gomes, E., 2014. Ultraviolet-B radiation modifies the quantitative and qualitative profile of flavonoids and amino acids in grape berries. *Phytochemistry*, (102), 106–114.
- Merten, D., Geletneky, J., Bergmann, H., Haferburg, G., Kothe, E., Büchel, G., 2005. Rare earth element patterns: A tool for understanding processes in remediation of acid mine drainage. *Chemie der Erde Geochemistry*, (65) 97–114.
- Miller, G., Suzuki, N., Çiftçi-Yılmaz, S., Mittler, R., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stress. *Plant, Cell & Environment*, (33), 453–467.
- Money, P.A., Staden, J.V., 1984. Seasonal changes in the levels of endogenous cytokinins in *Sargassum heterophyllum* (Phaeophyceae). *Botanica Marina*, (17), 437–442.
- Morris, J.W., Doumas, P., Morris, R.O. and Zaer, J.B. 1990. Cytokinins in vegetative and reproductive buds of *Pseudotsuga m.* *Plant Physiol.* 9:67–71.
- Mpoloka, S.W., 2008. Investigating evidence for UV-B induced mutagenesis in *Dimorphotheca sinucata* using the 18s rRNA and rbcL gene sequence. *Advances Environmental Biology*, (2), 81–88.
- Munne-Bosch, S., 2005. The role of  $\alpha$ -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal Plant Physiology*, (162), 743–748.
- Musil, C.F. and Wand, S.J.E., 1994. Differential stimulation of an arid-environment winter ephemeral (*Dimorphotheca pluvialis* L.) Moench by ultraviolet-B radiation under nutrient limitation. *Plant, Cell and Environment*, (17), 245–255.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiology*, (22), 867–880.
- Nanjo, T., Fujita, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., 2003. Toxicity of free proline revealed in an *Arabidopsis* T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant and Cell Physiology*, (44), 541–548.

- Nawkar, G.M., Maibam, P., Park, J.H., Sahi, V.P., Lee, S.Y., Kang, C.H., 2013. UV-Induced Cell Death in Plants. *International Journal of Molecular sciences*, (14), 1608-1628.
- Oh, M.M., Carey, E.E., Rajashekar, C.B., 2009a. Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, (47), 578–583.
- Oh, M.M., Trick, H.N., Rajashekar, C.B., 2009b. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and Stress tolerance in lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, (176), 180-176.
- Oh, M.M., Carey, E. E., Rajashekar, C. B., 2010. Regulated water deficits improve phytochemical concentration in lettuce. *Society for Horticultural Science*, (135), 223-229.
- Oh, M.M., Carey, E.E., Rajashekar, C.B., 2011. Antioksidant phytochemicals in lettuce grown in high tunnels and open field. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, (52), 133-139.
- Ormrod, D.P. and Hale, B.A., 1995. Physiological responses of plants and crops to ozone stress . *Handbook of plant and crop physiology*, Newyork, 735-760.
- Ozturk, L. and Demir, Y., 2002. In Vivo and In Vitro Protective Role of Proline. *Plant Growth Regul*, (38), 259–264.
- Palni, L.M.S., Susmons, R.E., Letham, D.S., 1983. Mass spectro analysis of cytokinins in plant tissues. *Plant Physiology*, (7), 858-863.
- Peng, Z., Zhou, X., Li, L., Yu, X., Li, H., Jiang, Z., Cao, G., Bai, M., Wang, X., Jiang, C., Lu, H., Hou, X., Qu, L., Wang, Z., Zuo, J., Fu, X., Su, Z., Li, S., Guo, H., 2009. Arabidopsis Hormone Database: a comprehensive genetic and phenotypic information database for plant hormone research in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, (37), 975-982.
- Pietta, P.G., 2009. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, (63), 1035-1042.
- Potters, G., Pasternak, T.P., Guisez, Y., Jansen, M.A.K., 2009. Different stress, similar morphogenic responses: intergrating a plethora of pathways. *Plant, Cell&Environment*, (32), 158-169.
- Qamaruddin, M., Dormling, I., Eliasson, L., 1990. Increase in cytokinin levels in scots pine in relation to chilling and bud burst. *Physiologia Plantarum*, (79), 236-241.
- Radyukina, N.L., Shashukova, A.V., Shewyakova, N.I., Kuznetsow, V., 2008. Proline involment in the common sage antioxidant system in the presence of NaCl and paraquat. *Russian Journal of Plant physiology*, (55), 649-656.
- Radyukina, N.L., Shashukovaa, A.V., Makarovab, S.S., Kuznetsova, VI.V., 2011. Exogenous Proline Modifies Differential Expression of Superoxide Dismutase Genes in UV-B–Irradiated *Salvia officinalis* Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, (1), 51-59.
- Rai, R., Meena, R.P., Smita, S.S., Shukla, A., Rai, S.K., Pandey-Rai, S., 2011. UV-B and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. – An antimalarial plant. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, (105), 216-225.
- Rajabbeigi, E., Eichholz, I., Beesk, N., Ulrichs, C., Kroh, L.W., Rohn, S., Huyskens-Keil, S., 2013. Interaction of drought stress and UV-B radiation – impact on

- biomass production and flavonoid metabolism in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, (86), 190-197.
- Ramos, S.J., Rutzke, M.A., Hayes, R.J., Faquin, V., Guilherme, L.R.G., Li, L., 2011. Selenium accumulation in lettuce germplasm. *Planta*, (233), 649-660.
- Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., 1996. Ultraviolet-B and ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology*, (110), 125-136.
- Roberts, J.A. and Hooley, R., 1988. *Plant growth regulation*. Faculty Agriculture Science University Nottingham, Sutton Bonnington, Loughborough, Leics. LE12 5RD, UK.
- Robyt, J.F. and White, B.J., 1990. *Biochemical techniques: theory and practice*. Waveland Press, Prospect Heights, IL, 329-331.
- Rybus-Zajac M., Kubis, J., Bocianowski, J., 2014. UV-B radiation does not limit carbohydrate metabolism in cucumber leaves. *Communications in biometry and crop science*, (9), 3-14.
- Santa-Cruz, D.M., Pacienza, N.A., Polizio, A.H., Balestrasse, K.B., Tomaro, M.L., Yannarelli, G.G., 2010. Nitric oxide synthase-like dependent NO production enhances heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B-irradiated soybean plants. *Phytochemistry*, (71), 1700-1707.
- Saradhi, P.P., AliaArora, S., Prasad, K.V.S.K., 2002. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced prooxidation. *Biochemical and Biophysical research communications*, (209), 1-5.
- Sarkar, D., Bhowmik, C., Kwan, Y.I., Shetty, K., 2011. The role of proline-associated pentose phosphate pathway in cool-season turfgrasses after UV-B exposure. *Environmental and Experimental Botany*, (70), 251-258.
- Shahid, M.A., Balal, R.M., Pervez, M.A., Abbas, T., Aqeel, M.A., Javaid, M.M., Garcia-Sanchez, F., 2014. Exogenous proline and proline-enriched *Lolium perenne* leaf extract protects against phytotoxic effect of nickel and salinity in *Pisum sativum* by altering polyamine metabolism in leaves. *Turkish Journal of Botany*, (38), 914-926.
- Singh, R., Singh, S., Tripathi, R., Agrawal, S.B., 2011. Supplemental UVB radiation induced changes in growth, pigments and antioxidant pool of bean (*Dolichos lablab*) under field conditions. *Journal Environmental Biology*, (32), 139-145.
- Sivakumar, P., Sharmila, P., Saradhi, P.P., 1998. Proline suppresses rubisco activity in higher plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (252), 428-432.
- Soejima, H., Sugiyama, T., Ishihara, K., 1992. Changes in cytokinin activities and mass spectrometric analysis of cytokinins in root exudates of rice plant (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology*, (94), 1724-1729.
- Surplus, S.L., Jordan, B.R., Murphy, A.M., Carr, J.P., Thomas, B., Mackerness, S.A.H., 1998. Ultraviolet B induced responses in *Arabidopsis thaliana*: role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis related proteins. *Plant, Cell & Environment*, (21), 685-694.
- Szabados, L. and Savoure, A., 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, (15), 89-97.

- Taylor, J.S., Thompson, B., Pate, S.J., Atkins, C.A., Pharis, R.P., 1990. Cytokinins in the phloem sap of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Physiology*, (94), 1714-20.
- Tekchandani, S. and Gruprasad, K.N., 1988. Modulation of a guaiacol peroxidase inhibitor by UV-B in cucumber. *Plant Science*, (136), 131-137.
- Tian, X.R., and Lei, Y.B., 2007. Physiological responses of wheat seedlings to drought and UV-B radiation effect of exogenous sodium nitroprusside application. *Russian Journal of Plant Physiology*, (54), 676-682.
- Tossi, V., Amenta, M., Lamattina, L., Cassia, R., 2011. Nitric oxide enhances plant ultraviolet-B protection up-regulating gene expression of the phenylpropanoid biosynthetic pathway. *Plant, Cell and Environment*, (34), 909-921.
- Tossi, V., Lombardob, C., Cassiaa, R., Lamattinaa, L., 2012. Nitric oxide and flavonoids are systemically induced by UV-B in maize leaves. *Plant Science*, 193-194, 103-109.
- Turnbull C.G.N. and Hanke D.E., 1985. The control of bud dormancy in potato tubers. *Planta*, (165), 359-365.
- Velikova, V., Yordanow, I., Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain treated bean plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, (151), 59-66.
- Vicente, M.R. and Plasencia, J., 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of experimental botany*, (62), 3321-3338.
- Winkel-Shirley, B., 2002. Biosynthesis of flavonoids and effect of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, (5), 218-223.
- Yao, X., Chu, J., He, X., Ba, E., 2011. Protective role of selenium in wheat seedlings subjected to enhanced UV-B radiation. *Russian Journal of Plant Physiology*, (58), 283-289.
- Yao, X., Chu, J., He, X., Si, C., 2014. Grain yield, starch, protein and nutritional element concentrations of winter wheat exposed to enhanced UV-B during different growth stages. *Journal of Cereal Science*, (60), 31-36.
- Yee, Y., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. and Lu, C.Y., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguira gymnorhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environ. Exp. Bot.*, 1-13.
- Zhang, L., Zhou, S., Xuon, Y., Sun, M., Zhao, L., 2009. Protective damage in *Arabidopsis* leaves under ultraviolet-B irradiation. *Journal of Plant Biology*, (52), 135-140.
- Zlatev, Z.S., Lidon, F.J.C., Kaimakanova, M., 2012. Plant physiological responses to UV-B radiation. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, (6), 481-501.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1988 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2007 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümünden 2011 yılında mezun oldu. Aynı yıl başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.