

134840

JUGLON'UN KAVUN FİDELERİNDE PROTEİN VE ENZİM PARAMETRELERİ
ÜZERİNE ETKİSİ

Emel TURAN

Dumlupınar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Danışman : Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

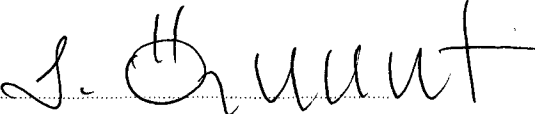
134840

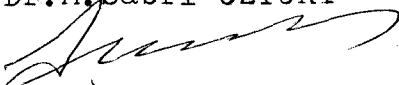
Haziran-2003

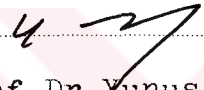
KABUL VE ONAY SAYFASI

Emel TURAN'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Juglon'un Kavun Fidelerinde Protein ve Enzim Parametreleri Üzerine Etkisi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir


17 / 07 / 2003

Üye : 
Prof. Dr. M. Sabri OZYURT

Üye : 
Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

Üye : 
Prof. Dr. Yunus ERDOĞAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 18.07.2003 gün ve ...11..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. M. Sabri OZYURT
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

JUGLON'UN KAVUN FİDELERİNDE PROTEİN VE ENZİM PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Emel TURAN

Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 2003

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

ÖZET

Bu çalışmada juglon'un kavun (*Cucumis melo* cv kış kavunu) fidelerinde kök ve gövde büyümesi ile protein miktarı ve polifenol oksidaz enzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Juglon 1 mM konsantrasyonunda testalı ve testasız olmak üzere iki grup tohum üzerinde ve farklı sürelerde uygulanmıştır.

Sonuç olarak, juglon testalı tohumlarda 0.günde (tohumlara) uygulanırsa fide büyümesini, protein miktarını ve katekol oksidaz aktivitesini artırdığı buna karşın çimlenme sonrası safhalarda (fidelere) uygulandığında ise juglon büyümeyi engelleyici etki göstermiş fakat protein miktarı ile katekol oksidaz aktivitesini azaltmıştır. Dopa oksidaz aktivitesi bütün juglon uygulamalarında artmıştır. Diğer taraftan juglon testasız tohumlara 0.günde uygulandığında ise fide uzamasını engellerken fidelerde taze ve kuru ağırlık artışına sebep olmuştur. Yapılan elektroforetik analizlerde juglon uygulanan fidelerin protein ve izoenzim bantlarında kontrole göre bazı küçük farklar görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Dopa Oksidaz, Elektroforez, Fide Büyümesi, Juglon, Katekol Oksidaz, Kavun, Protein.

EFFECT OF JUGLONE ON PROTEIN AND ENZYME PARAMETERS IN MUSKMELON SEEDLINGS

Emel TURAN

Department of Biology, M.S. Thesis, 2003

Thesis Supervisor: Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

SUMMARY

In this study, the effects of juglone on root and shoot growth of the muskmelon (*Cucumis melo* cv kış kavunu) seedlings at the same time their protein content and polyphenol oxidase enzyme activities were researched. Juglone has been applied on both intact seeds and coatless seeds at different durations, as 1mM concentration.

As conclusion, if juglone applied on intact seeds at the pregerminative stage (i.e on seeds) then it increased seedling growth protein content and catechol oxidase activity. In contrary, juglone if applied at postgerminative stages (i.e on seedlings) then it showed inhibitive effect on seedling growth but increased protein content and catechol oxidase activity. Dopa oxidase activity was increased by all the juglone applications. On the other hand, pregerminative treatment of the coatless seeds with juglone inhibited seedling elongation but it caused to increase in fresh and dry weights of the seedlings. In electrophoretic analyses, protein and isoenzyme band patterns of the juglone treated seedlings were found to show some small differences with respect to control seedlings.

Key words: Catechol Oxidase, Dopa Oxidase, Electrophoresis, Juglone, Muskmelon, Protein, Seedling Growth.

EMEL TURAN
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
MÜHÜR

TEŞEKKÜR

Bu çalıőmamın yürütülmesinde büyük emeği geçen, hiçbir zaman ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. İsmail Kocaçalışkan'a Őükranlarımı sunarım.

Çalıőmalarım sırasında desteğinden ve fikirlerinden yararlandığım hocam Yrd. Doç. Dr. İrfan Terzi'ye teŐekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalıőmalarım sırasında maddi, manevi yardımlarından istifade ettiğim aileme, arkadaőım Mesude Ceylan'a, eŐim zcan'a teŐekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Emel TURAN



İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iv
SUMMARY.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Allelopati.....	1
1.2. Ceviz Ağacı ve Juglon.....	2
1.3. Juglon'un Allelopatik Etkileri.....	3
1.4. Polifenol Oksidaz Enzimi.....	4
1.5. Juglon'un Tohum Çimlenmesi ve Fide Büyümesi Üzerine Etkileri	6
1.6. Araştırmanın Önemi ve Amacı.....	6
2. MATERYAL VE METOD.....	7
2.1. Fidelerin Yetiştirilmesi.....	7
2.2 Juglon Uygulaması.....	7
2.3. Kök ve Gövde Uzunluklarının Belirlenmesi.....	9
2.4. Taze ve Kuru Ağırlık Tayini.....	9
2.5. Özüt Hazırlanması.....	9
2.6. Protein Miktarı Tayini.....	9

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.7. PFO Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	10
2.7.1. Katekol oksidaz aktivitesi.....	10
2.7.2. Dopa oksidaz aktivitesi.....	11
2.8. Elektroforez Analizleri.....	11
2.8.1. Jelin hazırlanması.....	11
2.8.2. Numune hazırlanması.....	11
2.8.3. Numune tatbiki ve elektrik akımı uygulanması.....	12
2.8.4. Protein bantlarının boyanarak görünür hale getirilmesi.....	12
2.8.5. Dopa oksidaz ve katekol oksidaz bantlarının substratla görünür hale getirilmesi.....	13
3. BULGULAR.....	14
3.1. Juglon'un Kavunda Fide Uzaması Üzerine Etkisi.....	14
3.2. Juglon'un Kavunda Taze Ağırlık Üzerine Etkisi.....	16
3.4. Juglon'un Kavunda Protein Miktarı Üzerine Etkisi.....	18
3.5. Juglon'un Kavunda PFO Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi.....	19
3.6. Protein Elektroforezi.....	19
3.7. Dopa Oksidaz İzoenzimleri.....	20
3.8. Katekol Oksidaz İzoenzimleri.....	20
4. TARTIŞMA.....	23
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	26

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2. 1 Bitki büyütme kabini ve petripler.....	8
Şekil 2. 2. Protein tayini için kullanılan standart grafik.....	10
Şekil 3. 1. Juglon'un testalı tohumlarda kavun fide uzaması üzerine etkisi.....	15
Şekil 3. 2. Juglon'un testasız tohumlarda kavun fide büyümesine etkisi.....	16
Şekil 3. 3. Proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi.....	20
Şekil 3. 4. Dopa Oksidaz İzoenzimleri.....	21
Şekil 3. 5. Katekol Oksidaz İzoenzimleri.....	22

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3. 1. Juglon'un kavunda kök, gövde ve fide uzaması üzerine etkisi.....	14
Çizelge 3. 2. Juglon'un kavunda taze ağırlık üzerine etkisi.....	17
Çizelge 3. 3. Juglon'un kavunda kuru ağırlık üzerine etkisi.....	18
Çizelge 3. 4. Juglon'un kavun kotiledonlarında protein miktarı ve PFO aktivitesi üzerine etkisi.....	19



1. GİRİŞ

1.1. Allelopati

Allelopati “ Bir bitki tarafından sentezlenen ve salıverilen bazı kimyasal maddelerin bitki türüne bağlı olarak komşu bitkileri olumlu veya olumsuz açıdan etkilemesi “olarak tanımlanmış olup kısaca “bitkiler arasındaki kimyasal etkileşim ” olarak da tarif edilebilir. Allelopatik yönden etkili olan kimyasal maddeye allelokimyasal denir. Allelokimyasallar toksik (inhibitör) iseler veya etki ettikleri bitki türlerini çevre şartlarına duyarlı hale getiriyorlarsa stres ajanıdır. Bir allelokimyasal bitki türüne göre, olumlu veya olumsuz etki gösterebilirler. Bitkilerde görülen bu durum allelokimyasal maddenin çeşidi, konsantrasyonu ve etkileme zamanına bağlıdır. Fakat genel olarak allelokimyasal maddelerin etkileri olumsuz olmaktadır. Allelopatik etkinin olumsuz belirtileri; büyümede, fotosentez ve solunum hızında azalma, köklerde iyon alımını engelleme, deformasyon, klorozis, absisyon, kuruma, ölüm olarak sıralanabilir. Allelokimyasal madde bitkinin kök ve yapraklarından salgılanabilir. Şayet köklerden salınmışsa direk olarak toprağa geçer, yapraklardan salgılanmışsa yağmurla yıkanarak toprağa geçer ve daha sonra topraktan komşu bitkinin köklerine ulaşır ve kökler tarafından alınır. Allelokimyasallar, taşınma esnasında ortamdaki mikroorganizmalar (bakteri, mantar) tarafından değişikliğe uğratılabilir. Bazı allelokimyasal maddeler ise yapraklardan uçucu madde veya gaz şeklinde havaya verilir ve hava yoluyla başka bitkinin yapraklarından içeri alınabilir. Allelokimyasal maddelerin sentezlendiği bitkideki fizyolojik rollerinin ne olduğu henüz tam açıklanamamaktadır. Fakat bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerin fazla olması, allelokimyasal maddelerin bitkinin bir savunma silahı olabileceği gibi, az da olsa bazı bitkiler üzerinde olumlu etkilerinin de olması bakımından bunların bitkiler arasındaki komşuluk ilişkilerinin belirlenmesinde rol oynayan maddeler olabileceği düşünülmektedir [17;44].

Allelopati ile ilgili gözlemler milattan önceki yıllara kadar dayanmaktadır. İlk olarak allelopati ifadesini Molish 1937 de kullanmıştır [17]. Ancak bu sahadaki gerçek ilmi gelişmeler ve allelopatinin bir ihtisas dalı olarak ortaya çıkması 1970’li yıllardan sonra olmuştur.

Büyüme inhibisyonu’nun olduğu alanlardaki bitki türlerinin gözlenmiş örnekleri ya allelopati yada kaynak rekabeti ile açıklanabilir. İlave olarak, gözlemlenen örnekleri etkileyebilen diğer üç faktör vardır. Örneğin, besinsel dinamiklerdeki değişimler, toprak mikrobiyal ekolojisi yada toprak mineralizasyonu bitki türlerinin dağılımını ve büyümeyi etkileyebilir [11].

Allelopatik araştırmalarda başarılması gereken üç durum vardır:

1. Ekolojik durum ; allelopatinin tabiattaki konumunu belirlemek.

2. Kimyasal durum ; ilgili allelokimyasalların izolasyonu, tanımı ve yapısı.
3. Fizyolojik durum; biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler seviyede etkileşiminin mekanizmasının tanımı [44].

Toprakta allelokimyasalların akıbeti, faaliyet tarzı ve mikroorganizmalar üzerine etkileri ve besin mevcudiyeti araştırılmaktadır [6]. Birkaç araştırmacı ormanda ve tarımda allelopatinin ekolojik seviyede perspektifini araştırmıştır [60]. Allelopatik etkileşimlere dahil olan allelokimyasallar çok geniş grupları kapsar [40]. Allelopatik metodoloji, allelopatinin işlevlerini ve önerilerin tespiti için gerekli altı noktayı araştırır.

1. Bir tür veya bitki bir diğerine inhibisyon etkisi göstermeli.
2. Varsayılan etkileyici bitki bir toksin üretmeli.
3. Bitkiden çevreye toksin salıverilmeli.
4. Toksin çevrede toplanmalı yada taşınabilir olmalı.
5. Etkileyen toksini absorbe etmenin bazı yolları olmalı.
6. İnhibisyonu gözlenen örnekler sadece fiziksel faktörlerle açıklanamaz [44].

Bazı bitki türleri rizosfere allelokimyasal salıvermeleriyle allelopatik potansiyele sahiptirler. Ceviz ağacı bu bitkilerin eskiden beri en çok bilinenidir [67].

1.2. Ceviz Ağacı ve Juglon

Amerika’da doğal olarak yayılım gösteren kara ceviz ağaçlarının (*Juglans nigra*) dibinde ekilen yonca otlarının yağmurlardan sonra kısa zamanda öldükleri, ceviz yapraklarından damlayan yağmur sularının saksılardaki domateslere verilmesiyle domateslerin öldükleri, ceviz ağaçlarına yakın olan elma ağaçlarının cevizden tarafta olan dal ve köklerinin kurudukları, buna mukabil ceviz dibinde üçgül ve çayır otlarının çok iyi gelişebildikleri Massey, ve Schneiderman, tarafından rapor edilmiştir [17]. Daha sonra bu etkiye sahip olan madde, cevizin kök ve yaprak özütlerinden izole edilerek bunun 5-Hidroksi-Naftakinon olduğu teşhis edilmiş ve cevizin Latince ismine izafeten “juglon” adı verilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda juglon’un sadece kara ceviz ağaçlarından değil diğer ceviz türlerinden de salıverildiği belirlenmiştir [43]. Bunlardan biri de ülkemizde yaygın ceviz türü olan *Juglans regia* L. dir. Bu ceviz türünde juglon miktarının mevsimlik değişimi incelendiğinde kışın en düşük düzeyde iken ilkbahar başlangıcından nisan sonuna kadar düzenli bir artış, daha sonra haziran sonuna kadar bir azalma ve temmuz başından ağustos ortasına kadar tekrar bir artış gösterdiği belirlenmiştir [53].

Juglon’un köklerde sentezlenip ksilem vasıtasıyla bitkinin yapraklarına taşındığı ve juglon’un bitkide Hidrojuglon şeklinde bulunduğu ancak daha sonra bunun oksitlenmesiyle toksik karakterli Juglon’a (5-Hidroksi-1,4-Naftakinon) dönüştüğü belirtilmiştir. Cevizde juglon

köklerden toprağa geçebileceği gibi yapraklardan da yağmurla yıkanarak toprağa geçebilir. Ayrıca yaprakların absisyonuyla da toprağa karışır [61].

1.3. Juglon'un Allelopatik Etkileri

Juglon'un allelopatik etkilerine dair ilk kayıtlardan yukarıda kısmen bahsedilmişti. Bu raporlar 1920'li yıllara aittir. Bundan sonra bu alandaki çalışmalarda bir yavaşlama olmuş 1970'li yıllardan sonra günümüze kadar tekrar bu alandaki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Juglon'un çeşitli bitkiler üzerindeki allelopatik etkileri daha çok çimlenme ve fide büyümesi üzerinde araştırılmıştır.

Juglon'un kozalaklı bitkilerde fide büyümesi üzerine olan etkisi araştırıldığında bazı türlerde olumsuz bazılarında da olumlu etki yaptığı ve bu etkinin konsantrasyona göre değiştiği belirlenmiştir [16]. Bir başka çalışmada kozalaklı bitkilerden Norveç ladin'i (*Picea abies*) üzerinde juglon'un etkileri araştırılmış ve juglonun olumsuz etkisinin olduğu ancak bu etkinin çimlenme sonrası fide büyümesinde daha açıkça görüldüğü tespit edilmiştir [46]. Benzer şekilde, 16 bitki türü ile yapılan bir çalışmada, juglon'un 10-3 M konsantrasyonu kuvvetli inhibitör etki göstermiştir. Bu etki bilhassa çimlenme sonrası büyüme üzerine daha kuvvetli olmuştur. Bazı bitki türleri ise Juglon'a karşı çok hassas olup 10-6 M gibi düşük bir konsantrasyonda bile zarar görmüşlerdir. Bu türler şunlardır: "*Lonicera maackii*, *Lespedeza cuneata*, *Trifolium incarnatum*, *Alnus glutinosa*, *Elaeagnus umbellata*". Buna mukabil bir kaç tür üzerinde 10-6 M juglon büyümeyi artırıcı etki göstermiştir [43]. Jose ve Gillespie [20] tarafından yapılan bir çalışmada juglon'un mısır ve soya fasülyesi üzerine toksik etkisi belirlenmiş ve soya fasülyesinin juglona mısırdan daha duyarlı olduğu tesbit edilmiştir.

Bitki türlerinin Juglon'a olan hassasiyetleri çok farklıdır [5]. Juglon'a en hassas bitkilerin başında; domates, yonca, elma, armut, böğürtlen, kızıl çam ve beyaz çam gelir. Juglon'a toleranslı bitkiler ise; *Trifolium*, *Ranunculus*, *Primula*, *Poa*, *Iris*, *Lilium*, *Helleborus*, *eGentiana*, *Vitis*, *Quercus*, *Juniprus* gibi bitkilerdir [36]. Yine aynı yazar'a göre Juglon'un zararlı etkilerinin gözle görülen ilk belirtileri; uçtaki büyüme bölgesinde zayıf gelişme, bitkide kısmen veya tamamen solma, bazı dokularda esmerleşme olarak sıralanabilir.

Ceviz ağaçlarının (*Juglans regia*) ksilem eksüdatlarındaki juglon'un ceviz aşılama çalışmalarını olumsuz olarak etkilediği ve aşılama bölgesindeki kam^{bi}yum dokusunun hücrelerini öldürüp kallus dokusunun oluşumunu engelliyerek bu başarısızlığa sebep olduğu belirlenmiştir [38; 14].

Juglon'un büyüme inhibitörü olarak etki mekanizmasının nasıl olduğu çok az araştırılmıştır. Bu hususta bir kaç çalışma mevcuttur. Bu çalışmalara göre Juglon domates ve

bakla yaprak diskleri ile kesilmiş, mısır köklerinin O₂ alımını ve dolayısıyla solunumu azaltarak büyümeye ket vurmaktadır [33]. Bir baklagil bitki olan *Vicia villosa* Roth. üzerinde juglon'un büyüme engelleyici etkisi, bu bitkinin köklerinde nodül oluşumunu azaltarak dolayısıyla azot fiksasyonunu kısıtlayarak olmuştur [37]. Soya fasülyesi ve *Lemna minör* bitkisinin büyümesindeki azalma, bu bitkilerin klorofil miktarı ve net fotosentezlerindeki azalmayla doğru ilişkili bulunmuştur [18].

1.4. Polifenol Oksidaz Enzimi

Polifenol oksidaz enzimi (PFO) fenolik maddeleri kinonlara okside ettiği için bu isim verilmektedir. Fenolik maddeleri etkilediği için kısaca fenoloksidaz ismi de verilir. PFO birden fazla farklı fenolik özellikli substrata etki edebilen bir enzimdir. Etkilediği substratlara göre isimler alır örneğin katekol'e etki edebilen enzim katekol oksidaz, dopa'ya etki edebilen enzim dopa oksidaz tirosin'e etki eden de tirosinaz olarak isimlendirilir. Enzimin IUB kod numarası 1.10.3.2 dir [31]. PFO'ın katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan kinonlar gerek fotosentezde gerekse solunumda yer alan elektron taşınım sisteminde görev yaparlar [4]. Bunun yanında kinonlar bitki dokularında kararmaya sebep olurlar.

PFO enzimi tabiatla geniş bir alana yayılmıştır. Genellikle bitkilerde bulunuyor olsa da hayvansal doku ve organlarda ve özellikle mantarlarda da bulunmaktadır. PFO enzimi muhtevası tür ve kültüre bağlı olarak değişmektedir. Enzimin bitki hücresindeki konumu meyve veya sebzenin türüne, olgunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Yeşil yapraklarda enzim aktivitesinin önemli bir kısmı kloroplastlarda tespit edilmiştir. Ispanak, yonca, lahanaya, buğday, seker kamışı gibi bazı türlerin yapraklarında enzim, kloroplastlarda gizlidir ve aktive edilmesi için tripsin veya kırmızı ışığa gereksinim duyulur. Asma yapraklarında hücre partiküllerine sıkıca bağlı bulunan PFO kafein ile aktive edilebilir. Bakla yapraklarındaki PFO aktive edilebilmesi için asidik veya bazik ortama ihtiyaç duyulmaktadır. Patates, mantar, mısır yaprağı, domates ve fasulye de hücre partiküllerine bağlı olarak bulunur veya kloroplastlarda yer alan enzim serbest haldedir [30].

PFO çeşitli yönleriyle araştırılan bir enzimdir. En çok enzimatik kararmaya sebep olması bakımından araştırılmıştır. Bir çok meyve ve ürünlerinde esmerleşme veya kararma genel adı ile bilinen renk değişimleri meydana gelmektedir. Bu renk değişimlerinin belirli bir miktarı istenir. Ancak çoğu kez istenilen seviyede durdurulamadığı için gıda ürününün tabii rengini bozarlar. Renk bozulmaları, enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlardan veya polifenol oksidaz enzimiyle birlikte oksijen varlığında özellikle o-difenol grubu fenolik maddelerin renkli maddelere yükseltgenmesi sonucunda meydana gelmektedir. Bu üç faktörden

yani fenolik substrat, oksijen ve PFO enziminden bir tanesinin kontrol edilebilmesi durumunda enzimatik kararmadan dolayı meydana gelen renk değişimleri kontrol altına alınabilir. Genellikle bitkisel ürünlerin toplanması ve depolanması sırasında bitki dokularının mekanik bir etki ile (yaralanma, donma, ezilme, basınç vb.) ortaya çıkan ve açık kahverengiden siyaha kadar değişen renk yelpazesi ile kendini gösteren enzimatik kararma, bazı ürünlerde istenmeyen tat, koku ve görünüm meydana getirmektedirler. Sonuçta bu istenmeyen durumlardan kaynaklanan gıda değerinde ve kalitede önemli oranda düşmeler görülmektedir. Enzimatik kararma bitki tür ve çeşidine bağlı olarak farklı seviyelerde ortaya çıkmaktadır. Daha çok PFO aktivitesinde, fenolik substratlar ve reaksiyonun doğal engelleyicisi olarak kabul edilen askorbik asit miktarındaki değişmelerin rol oynadığı bilinmektedir [29; 34].

Polifenol oksidazın bitkilerdeki mevcudiyeti sınırlı olmasına karşın doğadaki rolü oldukça fazladır. Tam olmamakla birlikte enzimin bir diğer görevi de bitkilerde meydana gelebilecek virütik veya mikrobiyal enfeksiyonlara karşı organizmanın direncini artırmaktır. Bitkilerde enfeksiyonlara karşı PFO'ın rolü hakkında yapılan araştırmada elde edilen sonuca göre enzim faaliyeti sonucunda oluşan kinon grubu maddeler ikinci bir polimerizasyon reaksiyonuna uğrayarak koyu renkli, suda çözünmeyen polimerler haline gelmektedir. Oluşan bu polimerler buldukları ortamı doldurarak enfeksiyonun diğer doku ve organlara yayılmasını engellerler. Bunun da bazı araştırmacılar tarafından enzimin birinci fonksiyonu olduğuna dair iddialar vardır [34].

Patates yumrularında da esmerleşme olayı problem teşkil eder. Bazı patates çeşitlerinde PFO'ın fazla bulunmasından dolayı bunun azaltılması yönünde çalışmalar yapılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinden benzil adenin'in patates bitkilerine çiçeklenme döneminde uygulanması halinde elde edilecek yumrulara PFO aktivitesinin ve kararma olayının normal düzeye geldiği tespit edilmiştir [23].

Yukarıdaki bilgilerden de anlaşılacağı gibi PFO'ın bitkilerdeki rolü genellikle enzimatik esmerleşme ile ilgili olarak araştırılmıştır. Halbuki PFO'ın yukarıda bahsedilen rollerine ilaveten tohum çimlenmesinde de rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Çünkü yapılan araştırmalarda PFO aktivitesinin buğday tohumlarının embriyosunda endosperme göre çok yüksek olduğu ve çimlenme sırasında PFO aktivitesinin arttığı belirlenmiştir [51; 21; 25]. Yine fasulye tohumlarının çimlenmesi esnasında da PFO aktivitesinin çimlenme ile birlikte artış gösterdiği tespit edilmiştir [39; 24].

Juglon allelokimyasalının etkisiyle bazı bitki dokularında özellikle kök bölgesinde kararmalar gözlendiği için [54] PFO enzimi çalışma kapsamına alınmıştır.

1.5. Juglon'un Tohum Çimlenmesi ve Fide Büyümesi Üzerine Etkileri

Bitkilerin neslini devam ettirmesinde önemli görevi olan tohum bir çok araştırmaya konu olmuştur. Tohum, çiçekteki döllenmeden sonra gelişen ovulum (tohum taslağı) içerisinde meydana gelen embriyo ve etrafındaki besi dokudan (endosperm) oluşan bir yapıdır. Genellikle besi dokuda nişasta, yağ ve protein gibi organik maddeler depolanmıştır. Fakat bir çok bitki tohumlarında endosperm indirgenmiştir ve depo maddeleri embriyonun kotiledonlarında bulunur. Bir çok fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere sahip olan tohumda büyümeyle doğrudan ilgili olan kısım embriyodur. Embriyodaki meristem hücrelerin bölünüp çoğalması ile yeni bir bitki teşekkül etmeye başlar. Bu iş için gerekli yapı taşları ve enerji ise besi dokudaki organik maddelerden sağlanır. Tohumdan itibaren bir bitkinin oluşumunda temel basamak çimlenmedir. Tohum su alınca solunum, protein sentezi ve diğer biyokimyasal olaylar cereyan etmeye başlar. Böylece embriyo gelişip radikula (kökçük) testadan çıkar ve tohum çimlenmiş olur [64]. Esasında çimlenme bir büyüme olayıdır. Kökçüğün testadan çıkışı çimlenmenin gözle görülen bir belirtisidir. Bundan önce tohum içinde gözle görülemeyen bir çok biyokimyasal olaylar, hormonların ve enzimlerin etkisiyle meydana gelmektedir. Bunlar çimlenme öncesi veya çimlenme sırasındaki büyüme olaylarıdır. Kökçüğün çıkışından sonraki fide gelişimi ise çimlenme sonrası büyüme olarak nitelendirilmektedir.

Çimlenmeyi etkileyen çeşitli faktörlerin yanında bazı kimyasal maddeler de çimlenmeyi etkiler. Gibereellik asit ve sitokinin hormonları çimlenmeyi teşvik ederken absisik asit hormonu, siyanür, dinitrofenol, kumarin gibi maddeler ise çimlenmeyi engeller [64]. Bunlara ilaveten bir de allelokimyasal maddeler vardır ki bunlar çimlenmeyi ya teşvik eder veya engelleyici etki yapabilirler. Bu etki tohumun çeşidine göre değişir [44]. Juglon allelokimyasallardan biridir ve genelde çimlenmeye olumsuz etkisi vardır [43]. Bitki büyümesinin başlangıcı çimlenme olduğundan ve toprakta allelokimyasallara en çok maruz kalan bitki organları kökler ve tohumlar olduğundan çalışmamızda juglon hem tohumlara çimlenme öncesi hem de kök ortamına çimlenme sonrası uygulanarak etkisi araştırılmıştır.

1.6. Araştırmanın Önemi ve Amacı

Ceviz ağaçlarının dünya üzerinde oldukça yaygın olarak bulunmaları ve dallarıyla oldukça geniş bir alan kaplamaları sonucu yapraklarından salıverilen ve juglon adı verilen allelokimyasalın ceviz ağacının altında ve yakınında yetişen komşu bitkiler üzerinde genellikle toksik etki göstermesi bu türün üzerinde araştırmaları yoğunlaştırmıştır. Juglon'un allelopatik etkisi çoğunlukla çimlenme ve fide büyümesi ile ilgili olarak araştırılmıştır. Fizyolojik ve biyokimyasal etkisi ile ilgili çalışmalar çok azdır. Daha önceki bir çalışmada juglon'un bir çok

tür üzerinde toksik etki gösterirken kavun üzerinde olumlu etki gösterdiği Kocaçalışkan ve Terzi [26] tarafından belirlenmiştir. Ancak juglon'un enzim ve protein üzerine etkileri henüz bilinmemektedir. Bu yüzden bu çalışmada bu konu araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Fidelerin Yetiştirilmesi

Bu çalışmada, bitki materyali olarak kavun (*Cucumis melo* cv. Kış Kavunu) tohumları AGROMAR A.Ş.'den temin edilmiştir. Tohumlar, ekimden önce % 1'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dk. yüzeysel sterilizasyonuna tabi tutulmuşlardır. Daha sonra 3 kez saf su ile yıkanarak, oda şartlarında saf su içerisinde 2 saat şişmeye bırakılmışlardır. Sonra filtre kağıtları üzerinde oda sıcaklığında önceki ağırlıklarına ulaşınca kadar kurutulmuşlardır. Bu tohumların içinden dolgun, sağlam görünümlü ve benzer büyüklükte olan tohumlar seçilerek ayrılmıştır.

2.2 Juglon Uygulaması

Tohum çimlendirilmesi ve juglon uygulaması petri kutularında yapılmıştır. Tabanına iki tabaka filtre kağıdı yerleştirilen petri kutuları tohum ekiminden önce etüvde 115 °C de sterilize edilmişlerdir. Daha sonra yapılacak uygulamaya göre gruplandırılan petri kutularının üzerine grup numarası yazılmıştır.

Juglon çözeltisi, 1mM juglon'un saf suda 40 °C de manyetik karıştırıcıda 24 saat karıştırılmasıyla hazırlanmıştır [26]. Bütün juglon uygulamalarında tek konsantrasyon (1mM) kullanılmıştır. Çalışmamızda iki farklı uygulama yapılmıştır. Birincisinde juglon testalı tohumlara uygulanmıştır. Bu uygulamada petriyer 6 gruba ayrılmıştır. Bu gruplara yapılan uygulamalar aşağıdaki gibidir:

1. Tohumlar doğrudan saf suya konuldu (Testalı kontrol grubu).Tohumlar doğrudan
2. juglon çözeltisine konuldu (0. gün).
3. Çimlenmek için saf suya bırakılan tohumlardan bir kısmı 2.gün sonunda juglon çözeltisine transfer edildi.
4. Çimlenmek için saf suya bırakılan tohumlardan bir kısmı 4.gün sonunda juglon çözeltisine transfer edildi.
5. Çimlenmek için saf suya bırakılan tohumlardan bir kısmı 6.gün sonunda juglon çözeltisine transfer edildi.
6. Çimlenmek için saf suya bırakılan tohumlardan bir kısmı 8.gün sonunda juglon çözeltisine transfer edildi.

Diğer juglon uygulaması ise testası çıkarılmış tohumlara yapılmıştır (7. ve 8. grup). Bunun için önce tohumların testaları ayrılmış ondan sonra petrilere ekilmiştir.

7. Testasız tohumlar doğrudan saf suya konuldu (Testasız kontrol grubu).
8. Testasız tohumlar doğrudan juglon çözeltisine konuldu (0. gün).

Saf su ve juglon çözeltileri her petriye 10 ml olarak ilave edilmiştir. Her petri kutusuna 10 adet tohum ekilmiş ve bütün petriler bir bitki büyütme kabinine yerleştirilmiştir (Şekil 2.1). Kabinin iklim şartları "14 saat ışık (20 000 Lüks)/ 24 °C sıcaklık/ % 75 nispi nem ve 10 saat karanlık / 18 °C sıcaklık / % 75 nispi nem" olarak ayarlanmıştır [50].



Şekil 2. 1 Bitki büyütme kabini ve petriler.

2. 3. Kök ve Gövde Uzunluklarının Belirlenmesi

Tohumların ekiminden 20 gün sonra fidelerin kök ve gövdeleri birleşme yerlerinden jiletle kesilerek uzunlukları milimetrik bir cetvel yardımı ile ölçülmüştür. Bir petrideki köklerin uzunlukları toplamının tohum sayısına bölünmesiyle ortalama kök uzunluğu “cm / bitki” olarak hesaplanmıştır. Ortalama gövde uzunluğu da aynı şekilde belirlenmiştir.

2. 4. Taze ve Kuru Ağırlık Tayini

Kök taze ağırlık tayini, bir petrideki köklerin topluca tartılmasından sonra tohum sayısına bölünmesi sonucu ortalama taze ağırlık “mg/bitki” olarak belirlenmiştir. Gövde taze ağırlığının belirlenmesi de aynı şekilde yapılmıştır. Kök ve gövdenin kuru ağırlıkları, bunların 70 °C de 48 saat tutulmasından sonra tekrar tartılması sonucu elde edilmiştir. Ortalama kuru ağırlık, bir petrideki toplam kök veya gövde kuru ağırlıklarının tohum sayısına bölünmesiyle “mg/bitki” olarak tespit edilmiştir.

2.5. Özüt Hazırlanması

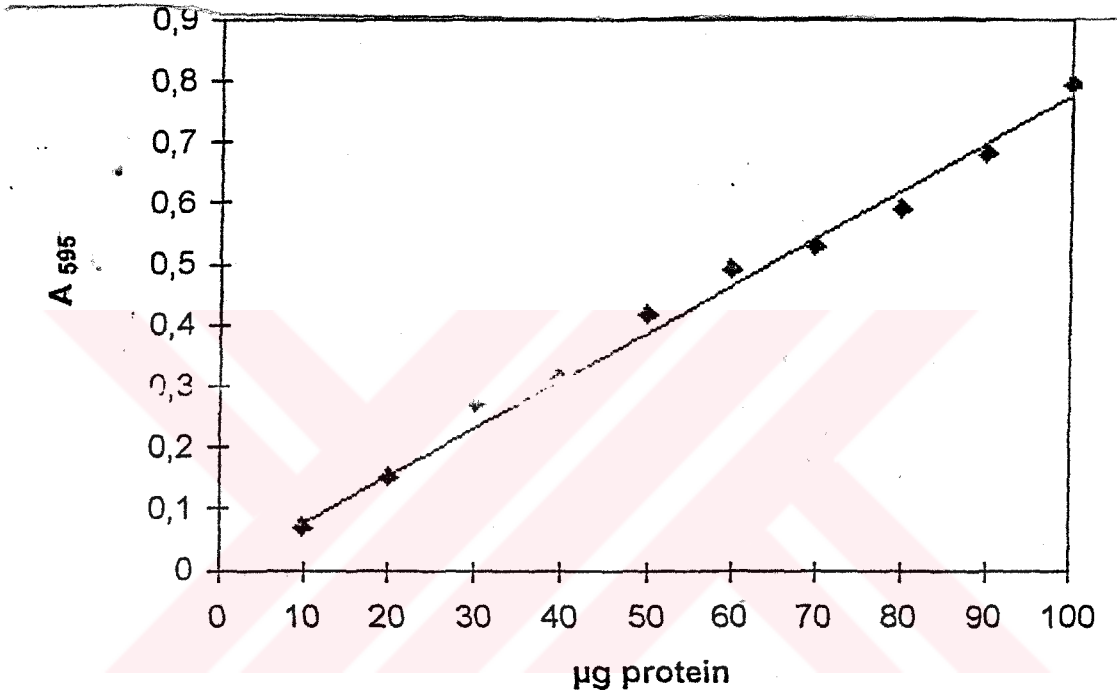
Daha önce tarif edildiği gibi büyütülen kavun fidelerinin öncelikle çenek yaprakları (kotiledonlar) keskin jilet yardımı ile gövdeden ayrıldı. Ayrılan yaprakların taze ağırlığı hassas terazide tartılıp kaydedildi. Sonra 0,5 g kotiledon dokusu ağırlığının 10 katı hacimde fosfat tamponunda (0,1M; pH=6,5) soğutulmuş havan içerisinde ezilerek homojenize edildi. Elde edilen homojenant buzdolabı içerisinde tülbent bezinden temiz bir beher içerisine süzülde. Elde edilen süzüntü yine buzdolabında soğuttuğumuz santrifüj tüplerine aktarılarak 3500x g hızda 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonunda elde edilen sıvı kısım (süpernatant) buzdolabına konuldu ve daha sonra protein miktarı ve PFO enzim aktiviteleri ölçümleri ile elektroforez analizleri için protein kaynağı olarak kullanıldı.

2.6. Protein Miktarı Tayini

Çözünebilir protein miktarı, spektrofotometrik olarak Coomassie yöntemiyle tayin edilmiştir [9]. Bu yöntem, proteine Coomassie brilliant blue G-250 boyasının bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks, 595 nm’de maksimum absorbanans gösterir. Protein tayini için gerekli standart grafik aşağıdaki gibi hazırlanmıştır. 1 ml’inde 1 mg protein içeren standart Borin Serum Albumin (BSA) çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg protein içerecek şekilde pipetlenip, tampon çözeltiyle toplam hacimleri 0,1 ml’ye tamamlanmıştır. Bu tüplere, 5 ml coomasie reaktifi ilave edilip bir karıştırıcı ile iyice karıştırılmıştır. Kör olarak, 0,1ml tampon ve 5 ml coomasie reaktifinin karışımı kullanılmıştır.

595 nm'de absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein miktarları bir grafik haline getirilerek, deney örneklerindeki protein miktarlarını belirlemede kullanılmıştır (Şekil 2.2).

Bitki yapraklarından elde edilen ve buzdolabına konan özütten 0,5 ml alınarak 0,1 ml tampon ilave edilip benzer şekilde 5 ml coomassie reaktifi ile karıştırıldıktan sonra 595 nm'de absorbansı ölçülüp, standart grafik üzerinden protein miktarları önce " μg protein / 0,5 ml özüt" olarak sonra "mg protein/ g kotiledon" olarak belirlenmiştir.



Şekil 2. 2. Protein tayini için kullanılan standart grafik.

2.7. PFO Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

2.7.1. Katekol oksidaz aktivitesi

10 mM'lık katekol çözeltisinden 1,5 ml alınıp deney tüpü içerisine konuldu. Üzerine 1,5 ml tampon çözelti ile buzdolabında bekleterek soğuttuğumuz enzim özütünden 0,2 ml ilave edildi. Katekol+enzim özütü karışımı 30°C ye ayarladığımız su banyosu (benmari) içerisinde 3 dakika bekletildi. 3. dakikanın sonunda spektrofotometrede 430 nm de absorbans değeri ölçüldü. Aktivite birimi olarak " A_{430} / g kotiledon" esas alındı [25].

2.7.2. Dopa oksidaz aktivitesi

Daha önceden hazırladığımız 10 mM'lık dopa çözeltisinden 4 ml alınıp deney tüpü içerisine konuldu. Üzerine ölçüm yapılacak enzim özütünden 0,2 ml ilave edildi ve 30 °C de beklettiğimiz su banyosunda 3 dakika bekletildi. 3 dakika sonunda absorpsiyon değeri 490 nm de ölçüldü. Aktivite birimi olarak “ A_{490}/g kotiledon ” esas alındı [25].

2.8. Elektroforez Analizleri

2.8.1. Jelin hazırlanması

Jel için protein ayırımında en çok kullanılan destek ortam olan poliakrilamid jel hazırlandı [49]. Poliakrilamid jelin hazırlanması için bazı stok çözeltiler hazırlandı. Destek ortamı olarak iki tip jel hazırlandı. Birincisi proteinlerin ayrılması için hazırlanan % 7,5 luk ayırma jelidir. Diğerlerine göre konsantrasyonu daha fazladır. İkincisi yürütme başlamadan önce yüklü moleküllerin aynı hizada olmalarını sağlayan % 3,5 luk yığıma jelidir. % 7,5 luk ayırma jelinin hazırlanması için 10 ml AB çözeltisi, 10 ml Tris çözeltisi (pH:8,8), 30 ml saf su ve 0,3 ml APS çözeltisi (0,1 gr APS ve 1 ml saf su alınarak taze hazırlanır) nden alındı ve üzerine 30 µl TEMED koyularak karıştırıldı. Hazırlanan karışım pipetle elektroforez camları arasına yavaşça koyuldu ve kabarcık oluşmamasına dikkat edildi. Jelin polimerleşmesi beklendi (yaklaşık 2 saat).

Daha sonra % 3,5 luk yığıma jel hazırlandı. Bunun için 0,7 gr akrilamid, 0,18 gr bisakrilamid, 19,5 ml saf su, 0.03 gr APS ve 40 µl TEMED alınıp sırayla beher içine koyuldu ve karıştırıldı. Karışım hemen ayırma jelinin üzerine pipetle dikkatlice koyuldu. Numune tarağı uzun ve kısa camın arasına üstten yavaşça yerleştirildi ve yığıma jelin polimerleşmesi beklendi (1 saat).

2.8.2. Numune hazırlanması

Elektroforezde kullanılacak numunelerin hazırlanması için gruplandırılmış temiz tüpler içine buzdolabında tutulan özütlerden 1 ml koyuldu. Üzerine % 40 lık sakkaroz çözeltisinden 3-4 damla damlatıldı. Sakkaroz çözeltisi numunelerin elektroforeze koyulduğu esnada tris tamponunda dağılmaması için ve tarak oyuklarında numunenin yoğun olarak kalması amacıyla kullanıldı. Bunların üzerine, yürütme işlemi başlatıldığında numunelerin takibi ve yürütme çizgisinin belirgin olması için işaret boyası bromfenol blue'dan (% 0,001) bir damla koyuldu. İşaret boyası bromfenol, elektroforezde proteinlerin hızından biraz fazla olup yürümenin alt sınırını gösteren boyadır. Son olarak tüplerdeki numuneler vortexde karıştırılıp elektroforez enjektörü ile jelin tarak boşluklarına koyuldu.

2.8.3. Numune tatbiki ve elektrik akımı uygulanması

Jellerin polimerleşmesi bittiğinde numune tarağı dikkatlice camlar arasından çıkarıldı. Önceden hazırlanan numunelerden, grup sırasına göre, elektroforez enjektörü kullanılarak 50 µl alındı ve herbir tarak boşluğuna koyuldu. Elektroforez gövdesi alt tampon tankına yerleştirildi ve tris tamponu (tris tamponu için 10 gr tris, 50 gr glisin alınıp 3,5 lt saf suya tamamlandı, pH:8,3), camın alt kısmından 1 cm yukarıya gelecek şekilde koyuldu. Üst tampon tankına da jelin üzerini kapatacak kadar tris tamponu koyuldu ve emniyet kılıfı ile kapatıldı. Su hortumlarının biri musluktan cihaza, diğeri cihazdan lavaboya doğru olacak şekilde takıldı. Elektrik bağlantıları da cihazdan güç kaynağına paralel olacak şekilde ayarlanıp siyah elektroda siyah kablo, kırmızı elektroda kırmızı kablo takıldı. Buraya kadar yapılan işlemlerle cihaz yürütme için hazır duruma getirilmiş oldu. Bundan sonra güç kaynağı açılarak yürütme işlemi başlatıldı.

Güç kaynağı açıldığında başlangıç olarak akım yağma jel için 100 volt, 135 miliamper, 30 watt ayarlandı ve çalıştırıldı. Yürütme çizgisi yağma jelden ayırma jele geçtiğinde volt 200'e çıkarıldı. Buradan itibaren yaklaşık 8 cm kadar işaret boyasının yürümesi ile elektrik kesildi ve yürütme durduruldu.

2.8.4. Protein bantlarının boyanarak görünür hale getirilmesi

Elektroforezde yürütme çizgisi (bromfenol=işaret boyası) 8 cm yürüdüğünde elektrik bağlantıları kesildi. Elektroforez camları gövdeden çıkarıldı. Jel cam üzerinde iken jiletle iki kısma ayrıldı (iki takımın bitiş noktası) ve grup başlangıç noktaları işaretlendi. Sona saf su dökülerek jel dikkatlice, yırtılmadan camdan alındı ve jelin yarısı önceden hazırlanmış % 50 lik triklorasetik asit (TCA) çözeltisinde % 0,1 coomassie boyası çözündürülerek hazırlanan boya çözeltisinde 30-60 dk bekletildi. Jel tepsiye düz olarak koyuldu ve karıştırıcıda hafif karıştırılarak jeldeki proteinlerin boyanması sağlandı. Boya çözeltisi hazırlamak için 150 gr TCA tartıldı ve 300 ml saf suya tamamlandı. Üzerine 0,3 gr coomassie boyası ilave edilerek karıştırıldı. Sadece protein bantlarının iyi boyanmış olarak kalması ve jelden boyanın uzaklaştırılması (destaining) için jel boya çözeltisinden çıkarılıp % 7'lik asetik asit çözeltisi olan başka bir tepsiye alındı. Bu çözelti için 21 ml asetik asit alınıp 300 ml saf suya tamamlandı. Kalan boya çözeltisi tekrar kullanılmak üzere bir kaba konulup buzdolabında bekletildi. Protein bantları belirginleşene kadar asetik asit çözeltisi ile yıkamaya devam edildi. Jeller % 7'lik asetik asit içeren çözeltide, üzeri streç film ile kapatılarak buzdolabında tutuldu. Daha sonra jel bir cam üzerine alınarak fotoğrafı çekildi.

2.8.5. Dopa oksidaz ve katekol oksidaz bantlarının substratla reaksiyona sokularak görünür hale getirilmesi

Elektroforezin cam plakalarının arasından çıkarılan ve ikiye ayrılan jelin bir parçası substrat (katekol veya dopa) çözeltisine bırakılarak jeldeki PFO enzimi ile reaksiyona sokuldu. Bunun için 15 mM konsantrasyonunda katekol ve 10 mM dopa çözeltisi 200 ml hazırlanır. Akrilamid jelin bir parçası hazırlanan bu substrat çözeltisine konularak 30°C sıcaklıkta etüvde tutuldu. Yaklaşık bir saat sonra izoenzim bantları görülmeye başladı. İzoenzimler tamamen ortaya çıkınca jel substrat çözeltisinden çıkarılarak saf suya alındı ve fotoğrafı çekildi. Hemen fotoğraf çekme imkanı olmadığında %30' luk etanole konularak bantların kaybolmaması sağlandı. Fotoğraf çekileceğinde tekrar saf suya alındı.

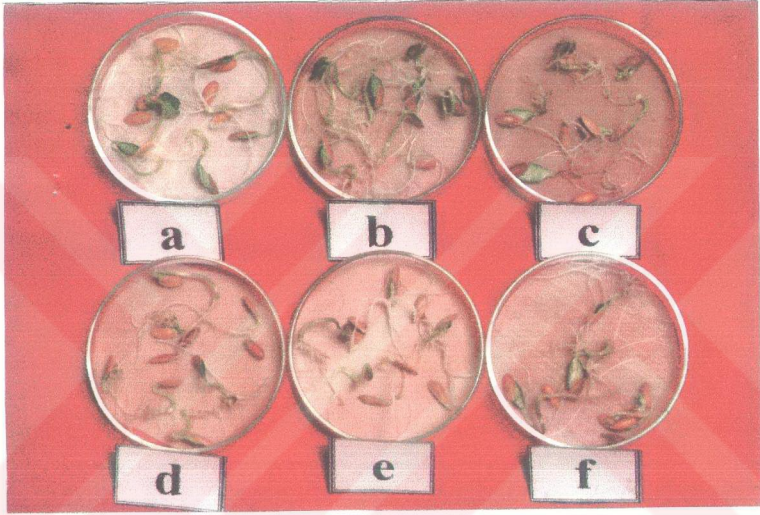
3. BULGULAR

3.1. Juglon'un Kavunda Fide Uzaması Üzerine Etkisi

Juglon testalı tohumlara uygulandığında (0. gün) fide uzamasını olumlu etkileyerek fide uzunluğunu artırmıştır. Bu olumlu etki kök ve gövde üzerinde de görülmektedir (Çizelge 3.1.). Aynı çizelgede görüldüğü gibi, juglon çimlenmiş ve fideye dönüşmüş tohumlara uygulandığında ise durum tersine dönmekte yani olumsuz etki ile fide büyümesi juglon tarafından engellenmektedir. Bu engelleyici etki çimlenmenin 2. gününden itibaren görülmekte en olumsuz etki ise çimlenmenin 8. gününde yapılan juglon uygulamasında görülmektedir ki fide büyümesi iki katına yakın kök büyümesi ise iki katından fazla engellenmiştir (Grup 6). Yukarıda bahsedilen juglon etkileri Şekil 3'te morfolojik olarak görülebilir.

Çizelge 3. 1. Juglon'un kavunda kök, gövde ve fide uzaması üzerine etkisi. Tablodaki değerler 20 gün büyütülen kavun fidelerinden elde edilmiş verilerin üç tekrarının ortalamasıdır.

Gruplar	Kök(cm)	Gövde(cm)	Fide(cm)
TESTALILAR			
1) Kontrol (saf su)	5,48	1,95	6,98
2) 0. Gün juglon	6,50	3,27	9,77
3) 2.Gün juglon	3,65	1,44	5,09
4) 4.Gün juglon	2,89	1,24	4,13
5) 6.Gün juglon	3,86	1,81	5,67
6) 8.Gün juglon	2,24	1,45	3,69
TESTASIZLAR			
7) Kontrol (saf su)	9,63	3,30	12,93
8) 0. Gün juglon	5,23	3,77	9,00



Şekil 3. 1. Juglon'un testalı tohumlarda kavun fide uzaması üzerine etkisi.

- | | |
|------------------|------------------|
| a) Kontrol | d) 4. gün juglon |
| b) 0. gün juglon | e) 6. gün juglon |
| c) 2. gün juglon | f) 8. gün juglon |



Şekil 3.2. Juglon'un testasız tohumlarda kavun fide büyümesine etkisi.

g) Kontrol, h) Juglon (0. gün)

Testası çıkarılmış tohumlarda ise juglon 0. gün yani henüz fide oluşmadan tohumlara uygulandığında testalı tohumlardakinin tersine fide büyümesi olumsuz etkilenmiş ve büyüme engellenmiştir (Grup 8). Bu durum Şekil 4'te açıkça görülebilir.

3.2. Juglon'un Kavunda Taze Ağırık Üzerine Etkisi

Testalı tohumlara juglon 0. günde uygulandığında olumlu etki sonucu fide büyümesi artırılmış olup hem kök hem de gövde büyümesinde artış gözlenmiştir (Çizelge 3.2.). Ancak çimlenmiş tohumlara (fidelere) juglon uygulandığında ise (2. gün) durum bilakis olumsuz olmakta ve kök, gövde ile birlikte fide büyümesi engellenmektedir. En olumsuz etki 4. gün yapılan juglon uygulanmasında görülmüş olup özellikle kök büyümesi kontrolle karşılaştırıldığında iki kat az olduğu görülmektedir.

Testasızlarda ise juglon uygulaması kontrole göre kök, gövde ve fide büyümesini artırmıştır. Özellikle gövde büyümesi iki katına yakın bir artış göstermiştir.

Çizelge 3. 2. Juglon'un kavunda taze ağırlık üzerine etkisi. Tablodaki değerler 20 gün büyütülen kavun fidelerinden elde edilmiş verilerin üç tekrarının ortalamasıdır.

Gruplar	Kök(mg)	Gövde(mg)	Fide(mg)
TESTALILAR			
1) Kontrol (saf su)	26,8	31,2	58,0
2) 0. Gün juglon	45,5	53,3	98,8
3) 2.Gün juglon	19,6	25,9	45,2
4) 4.Gün juglon	13,3	20,0	33,3
5) 6.Gün juglon	26,8	39,1	65,9
6) 8.Gün juglon	20,9	27,9	48,8
TESTASIZLAR			
7) Kontrol (saf su)	56,0	32,7	88,7
8) 0. Gün juglon	64,5	66,3	130,8

3.3. Juglon'un Kavunda Kuru Ağırlık Üzerine Etkisi

Testalı tohumlarda 0. gün tohumlara uygulanan juglon kök, gövde ve fide büyümesini artırmıştır. Bu artış fide ve kök büyümesinde iki katından fazla tesbit edilmiştir (Çizelge 3.3.). Oysa juglon fidelere uygulandığında bu etki tersine dönmüş yani fide büyümesini engellemiştir. Bu olumsuz etki hususu 8. günde daha çok olmakla birlikte uzama ve taze ağırlık üzerine olan olumsuz etki kadar kuvvetli değildir.

Testasız tohumlarda juglon kök, gövde ve fide büyümesini artırmıştır. Özellikle gövde büyümesi daha çok etkilenmiş ve üç katına yakın bir artış görülmüştür.

Çizelge 3. 3. Juglon'un kavunda kuru ağırlık üzerine etkisi. Tablodaki değerler 20 gün büyütülen kavun fidelerinden elde edilmiş verilerin üç tekrarının ortalamasıdır.

Gruplar	Kök(mg)	Gövde(mg)	Fide(mg)
TESTALILAR			
1) Kontrol	2,2	1,5	3,7
2) 0.Gün juglon	4,6	3,4	8,0
3) 2.Gün juglon	2,3	1,7	4,0
4) 4.Gün juglon	2,1	1,4	3,5
5) 6.Gün juglon	2,6	2,1	4,7
6) 8.Gün juglon	2,0	1,5	3,3
TESTASIZLAR			
7) Kontrol	3,8	1,3	5,1
8) 0. Gün juglon	4,3	3,5	7,8

3.4. Juglon'un Kavunda Protein Miktarı Üzerine Etkisi

Juglon, testalı tohumlarda 0. gün uygulandığında protein miktarını artırmıştır. Buna mukabil fidelere uygulandığında protein miktarını azaltmıştır (Çizelge 3.4.). Kontrolle karşılaştırıldığında, protein miktarındaki azalma en çok 2. gün uygulanan juglon grubunda tesbit edilmiştir.

Testasız tohumlarda ise juglon protein miktarını azaltmakla birlikte bu çok önemli bir etki olarak ortaya çıkmamıştır.

Çizelge 3. 4. Juglon'un kavun kotiledonlarında protein miktarı ve PFO aktivitesi (Katekol oksidaz ve dopa oksidaz) üzerine etkisi. Tablodaki değerler 20 gün büyütülen kavun fidelerinden elde edilmiş verilerin üç tekrarının ortalamasıdır.

Gruplar	Protein (mg /g kotiledon)	Katekol oksidaz (A ₄₃₀ / g kotiledon)	Dopa oksidaz (A ₄₉₀ / g kotiledon)
TESTALILAR			
1) Kontrol(saf su)	1,08	22,10	26,65
2) 0.Gün juglon	1,30	27,60	25,60
3) 2.Gün juglon	0,76	21,40	25,55
4) 4.Gün juglon	0,78	20,55	27,80
5) 6.Gün juglon	0,94	21,50	27,40
6) 8.Gün juglon	0,92	25,15	27,35
TESTASIZLAR			
7) Kontrol(saf su)	1,26	19,55	26,50
8) 0. Gün juglon	1,20	19,10	24,90

3.5. Juglon'un Kavunda PFO Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi

Juglon testalı tohumlarda 0.gün uygulandığında katekol oksidaz aktivitesini artırırken dopa oksidaz aktivitesini biraz azaltmıştır. Fidelere uygulanan juglon ise katekol oksidaz aktivitesini azaltmış fakat 8. günde uygulanan juglon aktivitesi kontrole göre artırmıştır. Dopa oksidaz aktivitesi ise juglon uygulamalarında çoğunlukla düşük bulunmuştur (Çizelge 3.4). Testasız tohumlarda her iki enzimin aktivitesi de juglon tarafından azaltılmıştır.

3.6. Protein Elektroforezi

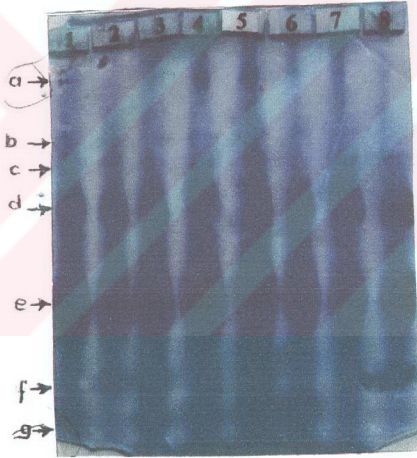
Yapılan natürel protein elektroforezinde bütün gruplarda 7 adet protein bandı elde edilmiştir (Şekil 5). Bandlar karşılaştırıldığında sadece (a) ve (g) bandlarında yoğunluk açısından farklar görülmektedir. (a) bandı, 2. ve 8. gruplarda neredeyse hiç görülmezken diğer gruplarda bariz görülmektedir. (g) bandı da 2. ve 8. gruplarda çok zayıf olarak bulunurken diğer gruplarda çok yoğun ve bariz görülmektedir. Yoğunluğu en fazla olan protein bandı ise ortalarda yer alan (e) bandı olup bütün gruplarda aynı şekilde yüksek yoğunlukta bulunmaktadır.

3.7. Dopa Oksidaz İzoenzimleri

Şekil 6'da görüldüğü gibi dopa oksidaz izoenzimleri 6 band olarak belirlenmiştir. Bunlardan ilk üçü (a,b,c) zayıf bandlardır. Diğerleri (d,e,f) ise oldukça yoğun bandlardır. Gruplar karşılaştırıldığında c,d ve e bandlarının juglon uygulanan gruplarda daha zayıf olarak ortaya çıktığı görülmektedir. Bütün bandlar jelin ortalarında yer almaktadır.

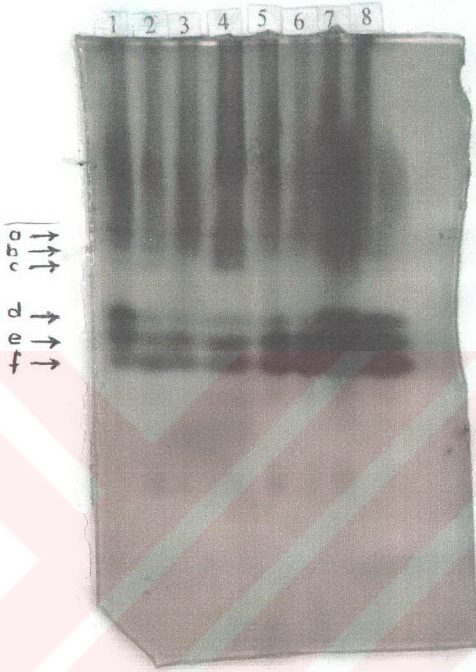
3.8. Katekol Oksidaz İzoenzimleri

Şekil 7'de görüldüğü gibi katekol oksidaz izoenzim bandları 3 adet olarak belirlenmiştir. Gruplar karşılaştırıldığında öncelikle (a) bandları juglon uygulanan gruplarda yok denilecek kadar zayıf yoğunlukta görülmektedir. Bütün gruplarda en yoğun band (c) bandlarıdır. Bütün bandlar jelin orta kısmında yer almaktadır.



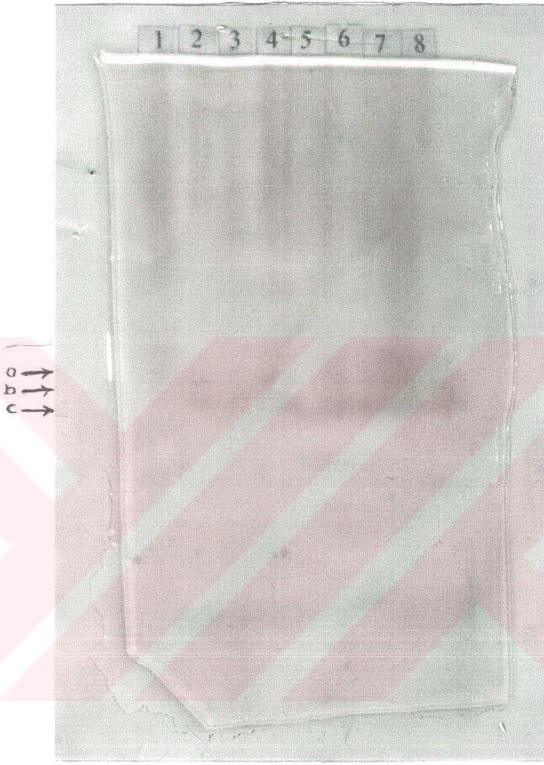
Şekil 3. 3. Proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi

- 1) Testalı Kontrol, 2) Testalı 0.gün juglon, 3) Testalı 2. gün juglon, 4)Testalı 4. gün Juglon, 5) Testalı 6.gün juglon, 6) Testalı 8. gün juglon, 7)Testasız kontrol, 8) Testasız 0. gün juglon.



Şekil 3. 4. Dopa Oksidaz İzoenzimleri.

- 1) Testalı Kontrol, 2) Testalı 0. gün, 3) Testalı 2. gün, 4) Testalı 4. gün, 5) Testalı 6. gün,
6) Testalı 8. gün, 7) Testasız kontrol, 8) Testasız 0. gün.



Şekil 3. 5. Katekol Oksidaz İzoenzimleri.

- 1) Testalı Kontrol, 2) Testalı 0. gün, 3) Testalı 2. gün, 4) Testalı 4.gün, 5) Testalı 6. gün,
- 6) Testalı 8. gün, 7) Testasız kontrol, 8) Testasız 0. gün juglon.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada juglon'un etkisi iki yönden araştırılmıştır:

1. Tohumlar ve fideler üzerinde juglon'un etkisi
2. Testalı ve testasız tohumlar üzerinde juglon'un etkisi

Tohumlar ve fideler üzerinde juglon'un etkisi karşılaştırıldığında, eğer juglon tohumlara uygulanırsa (çimlenme öncesi) hiçbir toksik etki göstermediği gibi büyümeyi artırıcı yönde olumlu etki göstermektedir. Bu etki juglon için nadir görülen bir etkidir. Çünkü juglon genelde bitkiler üzerinde toksik etki gösteren bir allelokimyasaldır. Zaten bu yüzden juglon maddesinin salgılandığı ceviz ağaçlarının altında her bitki gelişmemektedir. Juglon'un ve cevizden elde edilen yaprak özütlerinin kavun üzerinde olumlu etkisi daha önceki bir çalışmada da belirlenmiştir [26]. Dolayısıyla bu çalışmamız öncekini teyid etmektedir. Juglon'un fidelere uygulanması (çimlenme sonrası) en az çimlenmeden 2 gün sonra olmak üzere olumsuz etki göstererek fide büyümesini engellemektedir. Daha önce Terzi ve Kocaçalışkan [55] tarafından yapılan bir çalışmada da benzer şekilde juglon kavun fidelere uygulandığında olumsuz etkisi görülmüştür.

Bu iki etki farkı yani çimlenmenin tohumlara juglon uygulandığında olumlu fakat çimlenmiş tohumlara yani kök ve gövde oluştuktan sonra fideye uygulandığında ise olumsuz etki göstermesinin sebebi henüz bilinmemektedir. Bu yüzden bu çalışma bu etki farkının altındaki esrar perdesini aralamak amacıyla planlanmıştır. Daha önceki çalışmada [55], juglon'un bu farklı etkisini testanın varlığına bağlanmıştır. Çünkü testa (tohum kabuğu) juglon'un tohum içine girişine kısmen bir engel oluşturabilir [46]. Tohuma uygulanan juglon'un ne kadarının tohum tarafından absorbe edildiğini bilemediğimizden böyle bir ihtimal söz konusudur. Halbuki çimlenmiş tohuma yani fideye juglon uygulandığında arada bir engel bulunmadığından juglonun köklerin emme gücüne bağlı olarak büyük oranda ortamdaki absorbe edilmesi muhtemeldir. Bu yüzden fazla miktarda juglon'un fideye girişi toksik etki gösterebilir. Daha önce bir çalışmada Terzi ve Kocaçalışkan [55] tarafından ileri sürülen bu hipotezi doğrulamak veya reddetmek için bu çalışma yapıldı.

Bu çalışmadan elde edilen büyüme ile ilgili sonuçlara bakıldığında yukarıda bahsedilen hipotez kısmen doğrulanmaktadır. Çünkü juglon testalı tohumlara uygulandığında olumlu etki görüldüğü halde, juglon testası çıkarılmış çıplak tohumlara uygulandığında toksik etki göstererek fide büyüme parametrelerinden en önemlisi olan fide uzamasını engellemiştir. Diğer büyüme parametrelerinden taze ve kuru ağırlık üzerinde engelleyici etki göstermemiştir. Bu da

juglon uygulandığında protein miktarı fazla, testasız tohumlara uygulandığında ise düşük bulunmuştur. Bu sonuç da yukarıdaki hipotezi doğrular niteliktedir. Çünkü protein miktarı da bitkilerde büyüme parametresi olarak kabul edilmektedir [27].

Polifenol oksidaz enzimlerinden katekol oksidaz ve dopa oksidaz enzimleri bitkilerde stres sırasında [17; 25], ve tohum çimlenmesi sırasında, [25] aktive olan enzimlerdir. Bu yüzden bu çalışmada juglon'un bu iki farklı etkisi ile enzim aktiviteleri arasında bir bağlantı olup olmadığını belirlemek için bu enzimler çalışılmıştır. Aktivite ölçümlerine bakıldığında; her iki enzimin aktivitesi de istikrarlı bir etkilene göstermemektedir. Yani juglon uygulanan grupların bazısında aktivite kontrole göre yüksek bazısında düşük olmaktadır. Dolayısıyla daha önceki çalışmalara göre stres şartlarında aktivitesinin arttığı belirtilen [17; 25] bu enzimlerin aktivitelerinin bu çalışmada çoğunlukla düşük bulunması juglon'un kavunda bu enzimlerin aktivitelerini artıracak önemli bir strese sebep olmadığını düşündürmektedir.

Kavun kotiledonlarından elde edilen proteinler elektroforezde natürel şartlarda ayrılarak band profilleri incelendiğinde başlıca 6 adet band belirlenmiştir. Bunlardan (a) ve (g) bandlarında yoğunluk farkları dikkati çekmektedir. Her iki band da 2. ve 8. gruplarda çok zayıf veya hiç görülmezken diğer gruplarda bariz yoğunlukta bulunmaktadır. 2. ve 8. gruplar 0. saatte yani doğrudan tohumlara yapılan uygulamalardır (Şekil 5). Dolayısıyla doğrudan tohumlara yapılan juglon uygulamasının protein sentezini etkileyerek (a) ve (g) bandlarında bulunan proteinlerin sentezini azalttığını söyleyebiliriz. Juglon tarafından sentezinin azatıldığını tahmin ettiğimiz bu proteinlerden birisi (a) bandı jelin üst kısmında yer aldığından molekül ağırlığı yüksek proteinlere sahip olduğunu, (g) bandının ise jelin alt kısmında yer aldığından düşük molekül ağırlığındaki proteinler olduğunu söyleyebiliriz.

Aynı kimyasal reaksiyonları katalizleyen fakat molekül yapıları farklı olan enzimlere izoenzim denir. Zira izoenzimler aynı enzimin genetik bakımdan farklı şekilde kodlanmış değişik formlarıdır [32]. İzoenzimler bitki türüne göre, bitkinin hayat devresine ve maruz kaldığı stres çeşidine göre sayıca farklılık gösterebilmektedir. Mesela çalıştığımız polifenol oksidaz enziminin izoenzim sayısı şeftalide 4 adet [63], yer fıstığında 5 adet [48], armutta 3 adet [47], patatesten 11 adet [22] olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise kavunda dopa oksidaz 6 adet katekol oksidaz 3 adet izoenzim göstermiştir.

Dopa oksidaz izoenzimleri kavun kotiledonlarında 6 adet olarak belirlenmiştir (Şekil 6). Bunlardan a,b,c bandları zayıf, d,e,f bandları ise daha yoğun izoenzimleri temsil etmektedir. Juglon uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre c, d ve e bandları daha zayıf görülmektedir.

Bunun sebebi, juglonun dopa oksidaz izoenzimlerin sentezini azaltması olabilir, veya bu izoenzimlerin inhibitörü olarak bu izoenzimlerin aktivitesini engellemiş olabilir.

Katekol oksidaz izoenzimleri 3 adet olarak belirlenmiştir (Şekil 7). Bunlardan (a) bandına ait izoenzimlerin juglon uygulanan gruplarda çok zayıf yoğunlukta bulunması juglonun bu izoenzimlerin sentezini azalttığını yada bu izoenzimleri inhibe ederek aktivitelerini düşürdüğü varsayımını ortaya çıkarmaktadır.

Hem dopa oksidaz hem de katekol oksidaz izoenzimlerinin jelin ortalarında yer almaları bu iki enzimin orta büyüklükte enzimler olduklarını göstermektedir. Protein bandları ile karşılaştırıldıklarında dopa oksidazın a,b,c izoenzimlerinin (d) bandı proteinlerine karşılık geldiğini, dopa oksidazın d,e,f ve katekol oksidazın bütün bandlarının proteinlerden (e) bandı proteinlerine tekabül ettiği anlaşılmaktadır. Dolayısıyla protein bandlarından (d) ve (e) bandları çalıştığımız enzimlerin izoenzimlerini kapsamaktadır. Yani dopa oksidaz ve katekol oksidaz enzim proteinleri (d) ve (e) protein bandlarının bulunduğu proteinler arasındadır.

Sonuç olarak, kavun tohumları üzerinde uygulanan juglon tohumlara (çimlenme öncesi) uygulandığında fide büyümesini olumlu etkilerken fidelere (çimlenme sonrası) uygulandığında olumsuz etki gösterdiği belirlenmiş olup juglon'un bu etkileri ile protein miktarı doğru orantılıdır. Ancak enzim aktiviteleri bu etkiyle ilişkili bulunmamıştır. Elektroforez sonucu elde edilen protein ve izoenzim bandlarından juglon uygulanan bandlardan bazılarının kontrollerine göre zayıf yoğunlukta olmaları juglon'un protein sentezini ve enzim aktivitelerini etkilediğini göstermektedir. Bu etkinin şekli hakkında detaylı bilgi sahibi olmak için ise bu bandların izole edilerek yapısının analiz edilmesi gerekir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Arnon, D. L., 1949, Copper enzymes in isolated Chloroplasts PPO in Beta Vulgaris, Plant Physiol., 24,1-15.
- [2] Balke, N. E., Davis, M. P., and Lee, C. C. 1987, Conjugation of allelochemicals by plants. In: allelochemicals: Role in Agriculture and forestry Waller, G. R., ed., American chemical Society Washington, D. C. A. C. S. Symposium Series, 330, 214-227.
- [3] Baltepe, Ş. ve Mert, H. H., 1973, Bazı Cucurbita Türlerinin Hipokotil Büyümesi üzerinde Giberellik Asit ve İndol Asetik Asitin etkileri, Tübitak IV. Bilim Kongresi, Ankara.
- [4] Bidwell, R. G. S., 1979, Plant Physiology., Collier macmillan publisher, London.P.727.
- [5] Bettina, S., Leopold, D.J. and Walton, D.C., 1990, Seasonal patterns of juglone in soilbeneath *juglans nigra* (Black walnut) and influence of *J. nigra* on understory vegetation, Journal of Chemical Ecology., 16, 1111-1130.
- [6] Blum, U., Shafer, S, R. and Lehman M. E., 1999, Evidence for inhibitory Allelopathic interactions involving phenolic acids in Field Soils: Concepts v.s. an Experimental Model, Critical Reviews in plant sciences, 18, 673-693.
- [7] Boes, T. K., 1986, Allelopathy: Chemical Interactions between plants, Am. Nurs, 163, 67-72.
- [8] Bozcuk, S., 1978, Domates (*Lycopersicum esculentum* Mill.) arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) bitkilerin büyüme ve gelişmesinde tuz-kinetin etkileşimi üzerine araştırmalar, (Doçentlik tezi), H.Ü., Fen Fakültesi, Botanik Böl., Ankara.
- [9] Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, Analytical Biochem., 72, 248-254.
- [10] Daghish, C., 1950, The isolation and identification of a hydrojuglone glycoside occurring in the walnut, Biochem. J, 47, 452-457.
- [11] Dakshini, K. M. M., Foy, C. L. and İnderjit, 1999, Allelopathy: One compenent in a multifaceted approach to ecology, pp. 3-14, in İnderjit, K. M. M. Dakshini, and C. L. Foy (eds.), Principles and Pratices in Plant Ecology, Allelochemicals İnteractions: CRC Press, Boca Raton, Florida.
- [12] Davis, E. F., 1928, The toxic principle of *juglans nigra* as identified with synthetic juglone and its toxic effects on tomato and alfalfa plants, Am. J. Bot., 15, 620.
- [13] Einghelling, F. A., 1986, Mechanisms and modes of action of allelochemicals. 171- 188, in A. R. Putman and C. S. Tang (eds.), The Sciences of Allelopathy., Wiley interscience, New York.
- [14] Eriş, A. ve Barut, E., 1989, Cevizlerde (*Juglans regia* L.) kanamanın şiddeti üzerine bir araştırma, Bahçe., 18, 3-7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- [15] Facelli, J. M. and Picket, S. T. A., 1991, Plant litter: its dynamics and effects on plant community structure, *Bot. Rev.*, 57: 1-32.
- [16] Funk, D. T., Case, P. J., Rietveld, W. J. and Pares, R. E., 1979, Effects of juglone on the growth of coniferous seedlings, *Forest Sci.*, 25 452-454.
- [17] Hale, M. G. and Orcut, D. M., 1987, *The physiology of plants under stress*, Blacksburg, Virginia, USA, 206 p.
- [18] Hejl, A. M., Einhellig, F. A. and Rasmussen, J. A., 1993, Effects of juglone on growth, photosynthesis and respiration, *Journal of Chemical Ecology.*, 19, 559-568.
- [19] İnal, S., 1946, Ceviz Ağacı iktisadi önemi ve yetiştirilmesi (Frankhaser'den çeviri). Türkiye Ormancılar Cemiyeti Yayın no:1.
- [20] Jose, S., and Gillespie, A. R., 1998, Allelopati in black walnut (*Juglans nigra L.*) alley cropping, *Plant and soil* 203: 191-197, USA.
- [21] Kabar, K. and Kocaçalışkan, İ., 1990, Interaction among salinity (NaCl) Polyphenol oxidase, and growth regulators in the germination of wheat seeds, *Tr. J. of Botany.*, 14. 235-245.
- [22] Kocaçalışkan, İ., 1986, Patateste yumru gelişim sürecine bağlı olarak bitki hormonlarının polifenol oksidaz enzimi ve enzimatik kararma üzerine etkileri, (Doktora tezi), Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi. Erzurum.
- [23] Kocaçalışkan, İ., 1990, Büyüme düzenleyici maddelerin patateste enzimatik esmerleşme, fenolik madde ve askorbik asit miktarına etkileri, *Tr. Journal of Botany.*, 14:32-38.
- [24] Kocaçalışkan, I and Kabar, K., 1991, Effect of salinity on polyphenol oxidase during seed., 15, germination, *Tr. J. of Botany* 41-49.
- [25] Kocaçalışkan, İ. Demir, Y. And Kabar, K., 1995, A study polyhenol oxidase activity during seed germination, *Phyton.*, 35, 37-43.
- [26] Kocaçalışkan, İ., Terzi, İ., Allelopathic effect of walnut leaf extracts and juglone on seed germination seedling growth, *J. Hort. Sci. Biotech.* 76, 436-440 (2001).
- [27] Kocaçalışkan, İ., "Bitki Fizyolojisi", ISBN :975-8201-39-5 (2002).
- [28] Köeppe, D. E., 1972, Some reactions of isolated corn mitochondria influenced by juglone, *Physiol Plant.*, 27, 89-94.
- [29] Matheis, G., 1983, Enzymatic Browning of Foods, *Z. Lebensm Unters Forsch.*, 176: 454 - 462.
- [30] Mayer, A. M. and Harel, E., 1979, Polyphenoloxidases in plants, *Phytochemistry.*, 18, 193 -215.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- [31] Mayer, A. M., 1987, Polyphenol Oxidase in plants. Recent progress, *Phytochemistry.*, 26, 11-20.
- [32] Milnew-White, E.J. (1984). Isoenzymes, isoproteins and introns, *Tibs*, December.
- [33] Neave, I.A. and Dawson, J.O., 1989, Juglone reduces growth, nitrogenase activity and root respiration of actinorhizal black alder seedlings, *Journal of Chemical Ecology.*, 15, 1823-1836.
- [34] Oktay, M., 1992, Amasya Elmasından izole edilen polifenol oksidaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin araştırılması, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Fen Bilimleri Eğitimi Anabilim Dalı. Doktora Tezi.
- [35] Ölez, H. 1971, Marmara Bölgesi Cevizlerinin (*Juglans regia* L.) Seleksiyon yolu ile ıslahı üzerinde araştırmalar (Tez projesi), Ankara Ziraat Fakültesi.
- [36] Piedrahita, O., 1984, Black walnut toxicity, *Factsheet*, 11, 7-8.
- [37] Ponder, F., Tadros, M.G. and Tadros, S.H., 1992, Effects of juglone on growth and nodulation of hairy vetch, *North Central Forest Experiment Station*, 46-50.
- [38] Prataciera, A.G., Kuniyuki, A.H. and Ryugo, K., 1983, Growth inhibitors in xylem exudates of persian walnuts (*Juglans regia* L.) and their possible role in graft failure, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 108, 1043-1045.
- [39] Rao, P. U. and Deosthale, Y. G. 1987, Polyphenoloxidase activity in germinated Legume seeds, *Journal of Food Science.*, 52, 1549 –1551.
- [40] Rice, E. L., 1979, Allelopathy - an update, *The Botanical Review.*, 45, 15-109.
- [41] Rice, E. L., 1984, *Allelopathy*, Academic Press New York. 422 pp.
- [42] Rice, E. L., 1995, *Biological Control of Weeds and Plant Deases Advances in Applied Allelopathy* University Oklahoma Press, Norman.
- [43] Rietveld, W. J., 1983, Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species, *J. Chem. Ecol.*, 9, 295-308.
- [44] Rizvi, S. J. H. and Rizvi, V., 1992, *Allelopathy*, Chapman and Hall, New York, USA, 480 pp.
- [45] Salisbury, R. and Ross, C.W., 1992, *Plant Physiology.*, Wordsworth. Publ. Comp., Belmont, California, 682 pp.
- [46] Segura-Aguilar, J., Hakman, I. and Rydström, J., 1992, The effect of 5 OH-1, 4-Naphthoquinone on Norway spruce seeds during germination, *Plant Physiol.*, 100, 1955-1961.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- [47] Smith, D. M. And M. W. Montgomery (1985). Improved methods for the extraction of polyphenol oxidase from d'Anjon pears, *Phytochemistry*, 24:901-904.
- [48] Srivastava, O. P. and R.B. Van-Huystee (1973). Evidence for close association of peroxidase, polyphenol oxidase and IAA oxidase isozymes of penaut suspension culture medium, *Can. J. Bot.*, 51:2207-2215.
- [49] Şakiroğlu, H., 1994, Kuşburnu meyvasından izole edilen polifenol oksidaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi (Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum.
- [50] Şeniz, V., 1993, Genel Sebzeçilik, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ders Notları No: 53, 230 sayfa.
- [51] Taneja, S. R. and Sachar, R. C., 1974, Induction of polyphenol oxidase in germinating wheat seeds, *Phytochemistry*., 13. 2695-2707.
- [52] Tekintaş, E., Tanrısever, A. ve Mendilcioğlu, K., 1988 a, Juglon'un tohum çimlenmesine etkileri üzerine bir araştırma, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Dergisi.*, 25, 203-213.
- [53] Tekintaş, E., Tanrısever, A. ve Mendilcioğlu, K., 1988 b, Cevizlerde juglon izolasyonu ve juglon içeriğinin yıllık değişimi üzerinde araştırmalar, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Dergisi.*, 25, 215-225.
- [54] Terzi, İ., 1995, Ceviz yaprak özütlerin bazı tohumların çimlenmesi üzerine allelopatik etkileri, (Yüksek lisans tezi) Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. KÜTAHYA.
- [55] Terzi, İ., Kocaçalışkan, İ., Benlioğlu, O., Solak, K., Effects of juglone on growth of muskmelon seedlings with respect to physiological and anatomical parameters, *Biol. Plant.*, In press (2003).
- [56] Thijs, H. , Shann, J. R., Weiderhamer, J. D., 1994, The effect of phytotoxins on competitive outcome in a model system, *Ecology.*, 75; 1959-1964.
- [57] Tukey, H. B. and Mecklenburg, R. A., 1964, Leaching of metabolites from foliage and subsequent reabsorption and redistribution of the leachate in plants, *Amer. J. Bot.*, 51, 737-742.
- [58] Vardar, Y. , 1972, Bitki Fizyolojisi Dersleri, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayın No, 37. 331 sayfa.
- [59] Vardar, Y., 1975, Bitki Fizyolojisi Dersleri II, Yayın no: 69 221 sayfa.
- [60] Wardle et al., 1998, An ecosystem-level perspective of allelopathy. *Biol. Rev.*, 73: 305- 358.
- [61] Whittaker, R. H. and Feeny, P. P., 1971, Allelochemicals: Chemical interactions between species, *Science*, 171, 757-770.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- [62] Willis, R. J. 1985, The historical bases of the concept of allelopathy, J. History Biol, 18; 71-102.
- [63] Wong, T. C., B. S. LUH and J. R. Whitaker (1971). Effect of phloroglucinol and resorcinol on the cilingstone peach polyphenol oxidase-catalysed oxidation of 4-methylcatechol, Plant Physiol.,48:24-30.
- [64] Yentür, S., 1981, Tohum çimlenmesi, Doğa;Temel Bilimler, 6, 175-186.
- [65] Yentür, S., 1984. Bitki Anatomisi, İst. Üniv. Fen. Fak. Yay. No: 191. 563 sayfa.
- [66] Yıldız, N. ve Bircan, H., 1994, Araştırma ve Deneme Metodları, Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, 266 sayfa.
- [67] Yu, J. Q and Matsui, Y., 1997, Effects of root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals on uptake by cucumber and seedlings, Journal of Chemical Ecology., 23; 817-827.
- [68] Zackrisson, O., and Nilsson, M. C 1992, Allelopathic effects by *Empetrum hermaphraditum* on seed germination of two boreal tree species, Can. J. For. Res., 22; 1310-1319.