



**MARUL FİDELERİNDE BAZI GENLERİN  
İFADELERİNDEKİ DEĞİŞİMLER,  
BİYOKİMYASAL ve FİZYOLOJİK  
PARAMETRELER ÜZERİNE UV-B VE  
HÜMİK ASİDİN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**Nastaran SADEGHİAN**

**Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı  
Doç. Dr. Özkan AKSAKAL  
2017**

**Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MARUL FİDELERİNDE BAZI GENLERİN İFADELERİNDEKİ  
DEĞİŞİMLER, BİYOKİMYASAL ve FİZYOLOJİK  
PARAMETRELER ÜZERİNE UV-B VE HÜMİK ASİDİN  
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**Nastaran SADEGHİAN**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM  
2017**

**Her hakkı saklıdır**



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

**“MARUL FİDELERİNDE BAZI GENLERİN İFADELERİNDEKİ DEĞİŞİMLER,  
BİYOKİMYASAL ve FİZYOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE UV-B VE HUMİK ASİDİN  
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ”**

Doç. Dr. Özkan AKSAKAL danışmanlığında, Nastaran SADEGHİAN tarafından hazırlanan bu çalışma 03/02/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Moleküler biyoloji Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği/oyçokluğu (..../....)~~ ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Handan Uysal

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özkan AKSAKAL

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu’nun **09/02/2017** tarih ve **...6...../...17.....** nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Cavit KAZAZ**  
Enstitü Müdürü

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

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### MARUL FİDELERİNDE BAZI GENLERİN İFADELERİNDEKİ DEĞİŞİMLER, BİYOKİMYASAL ve FİZYOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE UV-B VE HÜMİK ASİDİN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Nastaran SADEGHIAN

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özkan AKSAKAL

Bu çalışmada bir büyüme düzenleyicisi olan hümik asit (HA) ön uygulamasının ultraviyole B (UV-B) stresine maruz bırakılan marul (*Lactuca sativa* L.) fidelerinde fenilpropanoid yolunda görev alan bazı genlerin [fenilalanin amonyak liyaz (PAL) ve  $\gamma$ -tokofrol metiltransferaz ( $\gamma$ -TMT)] ifadelerindeki değişimler ile bazı biyokimyasal ve fizyolojik parametreler üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, 30 günlük marul fidelerine 10 mg/kg (HA I), 20 mg/kg (HA II), 30 mg/kg (HA III) HA çözeltisi verilmiş, uygulamadan 30 gün sonra fideler  $3.3 \text{ Wm}^{-2}$  UV-B radyasyonuna 12 saat maruz bırakılmış, hasat edilen marul yapraklarında moleküler, biyokimyasal ve fizyolojik değişimler incelenmiştir. UV-B uygulaması kontrol şartlarına göre malondialdehit (MDA), hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve süperoksit radikali ( $\text{O}_2^-$ ) miktarını, bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX)], askorbik asit, tokoferol, toplam fenolik madde, toplam flavonoid miktarını ve antioksidan kapasiteyi artırmıştır. Buna ilaveten, klorojenik asit, kikorik asit, kafeik asit gibi fenolik bileşiklerin konsantrasyonları da UV-B uygulaması ile artmıştır. Yalnız UV-B uygulaması ile mukayese edildiğinde farklı konsantrasyonlarda HA uygulandıktan sonra UV-B stresine maruz bırakılan fidelerde PAL ve  $\gamma$ -TMT gen ifadesi, antioksidan enzimlerin aktiviteleri, askorbik asit, tokoferol, toplam fenolik madde, toplam flavonoid miktarı ve antioksidan kapasite önemli ölçüde artmış ( $P < 0.05$ ), MDA,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $\text{O}_2^-$  miktarı önemli oranda azalmıştır ( $P < 0.05$ ).

Sonuç olarak hümik asitin enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan maddelerin birikimini artırmak yoluyla marul fidelerinde UV-B radyasyonunun sebep olduğu oksidatif hasarı azalttığı ve UV-B radyasyonunun yıkıcı etkilerine karşı bitkiyi koruduğu belirlenmiştir.

**2017, 59 sayfa**

**Anahtar Kelimeler** antioksidan enzim, hidrojen peroksit, hümik asit, kafeik asit, kikorik asit, klorojenik asit, *Lactuca sativa*, malondialdehit, PAL, UV-B,  $\gamma$ -TMT,

## ABSTRACT

Master Thesis

### DETERMINATION OF UV-B TOLERANCE AND HUMIC ACID EFFECTS ON SOME GEN CHARACTERISTICS, BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS IN LETTUCE (*LACTUCA SATIVA* L.)

Nastaran SADEGHIAN

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology  
Science of Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ozkan AKSAKAL

In this study, some genes involved in the phenylpropanoid pathway [phenylalanine ammonia lyase (PAL) and  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase ( $\gamma$ -TMT)] were detected in the lettuce (L.) seedling of ultraviolet B (UV-B) stress pretreatment of a growth regulator, ( $\gamma$ -TMT)] and the effects on some biochemical were investigated on physiological parameters. Additionally, effect of pretreatment of humic acid (HA) as a growth regulator on changes in expressions of some phenylpropanoid pathway's genes [phenylalanine ammonia lyase (PAL) and  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase ( $\gamma$ -TMT)] and also some biochemical and physiological parameters was investigated in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plant exposed to ultraviolet B (UVB) radiation stress. For this purpose, amount of 10 mg/kg (HA I), 20 mg/kg (HA II) and 30 mg/kg (HA III) HA solution were given to the 30-day lettuce seedlings, then lettuces were exposed to 3.3 Wm<sup>-2</sup> UV-B radiation, for a period of 12 h, and some molecular, biochemical and physiological changes in harvested lettuce leaves were investigated. UV-B application in compared to control conditions increased the amount of malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), the activities of some antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX)], ascorbic acid, tocopherol, total phenolic substance, total flavonoid content and antioxidant capacity. Additionally, the concentrations of phenolic compounds such as chlorogenic acid, cichoric acid, and caffeic acid were increased by UV-B application. When results of UV-B application were compared parameters like PAL and  $\gamma$ -TMT gene expression, activities of antioxidant enzymes, ascorbic acid, tocopherol, total phenolic substance, total flavonoid amount and antioxidant capacity were significantly increased (P <0.05) in lettuce esexposed to UV-B stress after HA treatment at different concentrations, while the amount of MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> were decreased significantly (P <0.05). In conclusion, the protective role of humic acid in plants against the destructive effects of UV-B radiation has been determined by decreasing oxidative damage caused by UVB radiation in lettuce seedlings via increases in the accumulation of enzymatic and non-enzymatic antioxidant substances.

2017, 59 pages

**Keywords:** Antioxidant enzymes, Chafeic acide, Chlorogenic acide, Chicoric acide, Humic acid, Hydrogen peroxide, *Lactuca sativa*, Malondialdehyde, PAL, UV-B,  $\gamma$ -TMT

## TEŞEKKÜR

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

Öncelikle bu çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde büyük emeği geçen, çalışmalarında her zaman bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, derin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Özkan AKSAKAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam esasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Aslıhan ESRİNGÜ'ye, deneysel çalışmalarına yardım eden Sayın Arş. Gör. Feyza İÇOĞLU AKSAKAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın tamamlanmasındaki bu önemli süreçte, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, eşim Parham TASLİMİ'e ve değerli aileme eğitimimi tamamlamamı sağladıkları için şükranlarımı sunarım.

**Nastaran SADEGHIAN**

**Şubat, 2017**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Ultraviyole Radyasyonu ve Bitkiler .....	1
1.2. Hümik Asit .....	7
<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 fidelerinde toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi .....	20
3.3.3. Marul fidelerinde toplam flavonoid miktarının belirlenmesi .....	20
3.3.4. Marul fidelerinde antioksidan kapasite .....	20
3.3.5. Lipid peroksidasyon aktivitesinin belirlenmesi.....	21
3.3.6. Marul fidelerinde hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) miktarının belirlenmesi .....	21
3.3.7. Marul fidelerinde süperoksit radikali (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) miktarının belirlenmesi .....	22
3.3.8. Antioksidant enzim ekstraksiyonu .....	23
3.3.8.a. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi .....	23
3.3.8.b. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin belirlenmesi.....	24
3.3.8.c. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi .....	24
3.3.9. Marul fidelerinde askorbik asit ve tokoferol miktarının belirlenmesi.....	25
3.3.10. Marul fidelerinde bazı fenolik maddelerin belirlenmesi .....	26
3.3.11. PAL enzim aktivitesinin belirlenmesi .....	27
3.3.12.Gen ekspresyonu çalışmaları.....	27

3.3.12.a. RNA'nın kantitatif tayini.....	28
3.3.12.b. cDNA sentezi .....	28
3.3.12.c. Real time PCR uygulamaları .....	29
3.3.13.Gen ekspresyonu hesaplamaları .....	29
3.3.14. İstatistiksel analiz .....	30
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>31</b>
4.1. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda HA Uygulamalarının Marul Fidelerindeki Toplam Fenolik Madde, Toplam Floavonoid Miktarı ve Antioksidan Kapasite Üzerine Etkisi .....	31
4.2. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda HA Uygulamalarının Marul Fidelerindeki Malondialdehit (MDA), Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ve Süperoksit radikali (O <sub>2</sub> ·-) Miktarı Üzerine Etkisi.....	33
4.3. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda HA Uygulamalarının Marul Fidelerindeki Bazı Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi.....	35
4.4. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda HA Uygulamalarının Marul Fidelerindeki Askorbik Asit ve Tokoferol Miktarı Üzerine Etkisi .....	36
4.5. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda HA Uygulamalarının Marul Fidelerindeki Bazı Fenolik Maddelerin Değişimi Üzerine Etkisi .....	37
4.6. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda HA Uygulamalarının Marul Fidelerindeki PAL Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	40
4.7. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda HA Uygulamalarının Marul Fidelerindeki PAL ve $\gamma$ -TMT Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi .....	40
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>46</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>51</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>60</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
HA	Hümik asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IAA	İndol Asetik Asit
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mM	Milimolar
NBT	Nitroblu 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
SNP	Sodyum nitro prussid
SOD	Süperoksit dismutaz

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bitkiler üzerine UV-B radyasyonunun etkileri.....	3
Şekil 1.2. UV-B radyasyonunun pigment sistemi II üzerine etkisi.....	3
Şekil 1.3. Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu .....	4
Şekil 3.1. Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik. ..	22
Şekil 3.2. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik .....	25
Şekil 4.1. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında toplam fenolik madde miktarındaki değişim.....	32
Şekil 4.2. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında toplam flavonoid miktarındaki değişim.....	32
Şekil 4.3. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında antioksidan kapasitedeki değişim .....	33
Şekil 4.4. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında MDA miktarındaki değişim.....	34
Şekil 4.5. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve O <sub>2</sub> <sup>-</sup> miktarındaki değişim .....	34
Şekil 4.6. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında SOD, CAT ve APX enzim aktivitelerindeki değişimler.....	35
Şekil 4.7. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında askorbik asit miktarı .....	36
Şekil 4.8. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında tokoferol miktarı.....	37
Şekil 4.9. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında klorojenik ve kikorik asit miktarlarındaki değişim.....	38
Şekil 4.10. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında kafeik asit miktarındaki değişim .....	38
Şekil 4.11. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında bazı fenolik maddelerin miktarındaki değişim.....	39
Şekil 4.12. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında bazı fenolik maddelerin miktarındaki değişim.....	39

<b>Şekil 4.13.</b> HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında PAL enziminin aktivitesindeki değişim .....	40
<b>Şekil 4.14.</b> HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında PAL geninin ifadesindeki değişim .....	41
<b>Şekil 4.15.</b> HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında $\gamma$ -TMT geninin ifadesindeki değişim .....	41
<b>Şekil 4.16.</b> Marul fidelerinde PAL ve $\gamma$ -TMT gen ekspresyonlarındaki değişim.....	42
<b>Şekil 4.17.</b> Kontrol ve HA I arasında PAL ve $\gamma$ -TMT gen ekspresyonu değişimi .....	42
<b>Şekil 4.18.</b> Kontrol ve UV-B arasında PAL ve $\gamma$ -TMT gen ekspresyonu değişimi.....	43
<b>Şekil 4.19.</b> Kontrol ve HA I+UV-B arasında PAL ve $\gamma$ -TMT gen ekspresyonu değişimi .....	43
<b>Şekil 4.20.</b> Kontrol ve HA II arasında PAL ve $\gamma$ -TMT gen ekspresyonu değişimi.....	44
<b>Şekil 4.21.</b> Kontrol ve HA II+UV-B arasında PAL ve $\gamma$ -TMT gen ekspresyonu değişimi .....	44
<b>Şekil 4.22.</b> Kontrol ve HA III arasında PAL ve $\gamma$ -TMT gen ekspresyonu değişimi.....	45
<b>Şekil 4.23.</b> Kontrol ve HA III+UV-B arasında PAL ve $\gamma$ -TMT gen ekspresyonu değişimi .....	45

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. RT-PCR için kullanılacak spesifik primerler .....	29
--	----



## 1. GİRİŞ

Güneş canlılar için başlıca enerji kaynağıdır. Güneşten gelen radyasyon ise yeryüvarı üzerindeki yaşamı devam ettiren en önemli faktörlerden biridir (Ordidge *et al.* 2010). Güneşten gelen elektromanyetik spektrumun iyonize olmayan ultraviyole bölgesi, total solar radyasyonun yaklaşık %8-9'unu oluşturur ve ultraviyole C [UV-C (200-280 nm)] ultraviyole B [UV-B (280-315 nm)] ve ultraviyole A [UV-A (315-400 nm)] olmak üzere üç sınıfa ayrılır (Hollosoy 2002; Frohnmeyer and Staiger 2003). UV-C radyasyonu organizmalar için son derece zararlıdır ve stratosferik ozon tabakası tarafından yeryüzüne ulaşmadan absorblanır (Hollosoy 2002). Öte yandan, stratosfere ulaşan halojenler, hidrokarbonlar ve diğer ozon azaltıcı kimyasallar stratosferik ozon tabakasının incelmesine yol açar (Ballare *et al.* 2011). Bu tabakadaki incelme yer yüzüne ulaşan spektral UV kompozisyonunda değişime ve UV radyasyonu miktarında önemli artışa neden olur (Mckenzie *et al.* 2011). Buna ilaveten, yeryüvarı üzerine erişen UV radyasyonu miktarı, güneşin açısı, enlem, yükseklik, bulut miktarı, gölge, günün saati, mevsim ve aerosoller tarafından da etkilenir (Ballare *et al.* 2011). UV-A total solar radyasyonun yaklaşık %6,3'ünü kapsar ve UV radyasyonunun en az hasar verici kısmını oluşturur (Hollosoy 2002). Bu radyasyon ozon konsantrasyonu tarafından etkilenmez ve stratosferik ozon tabakasını geçerek yeryüzüne ulaşır (Caldwell *et al.* 1989). UV-B ise total solar radyasyonun sadece küçük bir bileşeni (%0.5) olmasına rağmen, sahip olduğu yüksek enerjisinden dolayı yalnızca miktarındaki büyük artışlar değil küçük artışlarda canlılar üzerinde olağanüstü biyolojik hasar oluşturma potansiyelindedir (Mckenzie *et al.* 2011; Lidon *et al.* 2012).

### 1.1. Ultraviyole Radyasyonu ve Bitkiler

UV-B radyasyonuna maruz kalan bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal değişimler, kuru madde üretimi ve büyüme bakımından tür içi ve türler arasında büyük farklılıklar olduğu rapor edilmiştir (Li *et al.* 2013). Bazı bitki türleri UV-B radyasyonundan etkilenmez, hatta bazı bitki türlerinde UV-B büyümeyi teşvik edebilir, ancak tahıllar ve

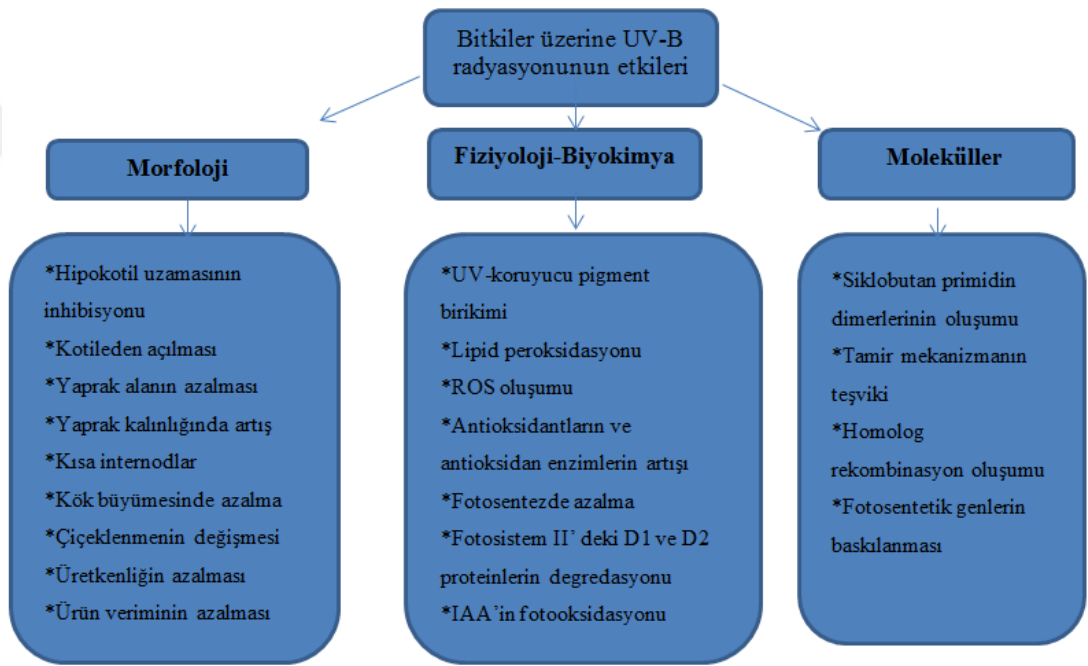
sebzelerinde içinde bulunduğu çoğu tür UV-B ışınlarına karşı hassastır ve bu ışınlardan zarar görürler (Du *et al.* 2011; Lidon 2012).

UV-B radyasyonu bitkilerde proteinler, lipidler ve DNA gibi makromoleküllerin yapılarında doğrudan veya dolaylı olarak değişiklikler meydana getirebilir (Ormrod and Hale 1995; Lidon 2012). Örneğin, bitkilerde UV-B radyasyonunun doğrudan bitki DNA'sı tarafından absorpsiyonu, siklobütan primidin dimerleri ve primidin primidinon dimerleri gibi çeşitli fotoürünlerin oluşumu ile sonuçlanır (Blaustein *et al.* 2013). Diğer taraftan UV-B radyasyonuna maruz kalan bitkilerde fotosentetik aparat içerisinde yer alan proteinler doğrudan etkilenebilir ve bozulabilir. UV-B'ye maruziyet, bitkilerde reaktif oksijen türevlerinin üretimi yoluyla dolaylı olarak DNA ve diğer biyolojik makromoleküllere de zarar verebilir. Yine bu radyasyon bitkilerde gen ifadesinde değişimlere yol açabilir (Hectors *et al.* 2007).

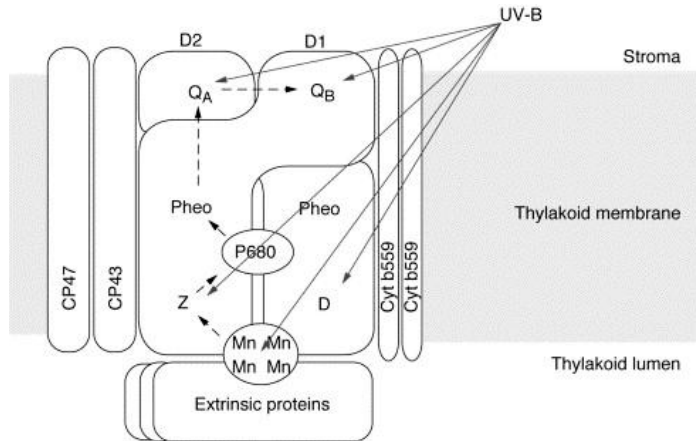
Bitkilerin UV-B radyasyonuna karşı oluşturdukları yanıtlar biyolojik olarak etkili olan UV-B miktarına ve bu radyasyonun diğer çevresel stres faktörler ile etkileşimine bağlıdır. Örneğin, UV-A, UV-B ve fotosentetik olarak aktif radyasyon (PAR) arasındaki spektral dengenin bitkilerin UV-B hassasiyetini belirlemede önemli olduğu bilinmektedir (Jansen *et al.* 1998; Bjorn *et al.* 1999; Glas *et al.* 2010). Buna ilaveten, fotosentetik olarak aktif radyasyon UV-B radyasyonunun bazı olumsuz etkilerini iyileştirebildiği bildirilmiştir (Glas *et al.* 2010). Diğer taraftan, mavi ışığın fotoliyazların üretimini teşvik etmek yoluyla UV-B radyasyonunun DNA'da neden olduğu siklobütan primidin dimerlerinin tamirinde yer aldığı rapor edilmiştir (Kakani *et al.* 2003).

UV-B radyasyonuna maruz kalan duyarlı bitkilerde bodurluk, yapraklarda renk kaybı, yaprak alanında azalma, palizat parankiması ve bekçi hücrelerde değişiklikler, biyomas ve bitki üretkenliğinde azalma, çimlenme, çiçeklenme ve meyve olgunlaşmasında gecikme gibi bir takım morfolojik ve anatomik değişiklikler ortaya çıkmaktadır (Şekil 1.1) (Caldwell *et al.* 2007). UV-B radyasyonunun neden olduğu fizyolojik değişiklikler arasında ise pigment sistemi II'de yer alan proteinlerin bozunumu ile ilişkili fotosentetik aktivitedeki azalma, klorofil ve karotinoidlerin bozunumu, rubisko aktivitesindeki azalma

ve stoma fonksiyonlarının etkilenmesi sayılabilir. UV-B etkisi ile Pigment sistemi II'nin reaksiyon merkezinde meydana gelen hasar elektron taşıma zincirinin inaktivasyonu ile sonuçlanır (Jansen *et al.* 1998). Pigment sistemi II içerisinde yer alan D1 ve D2 proteinlerinin reaksiyon merkezi, tirozin elektron vericileri, kinon elektron alıcıları ise UV-B radyasyonunun diğer hedef bölgeleridir (Şekil 1.2) (Sicora *et al.* 2006; Wu *et al.* 2011).



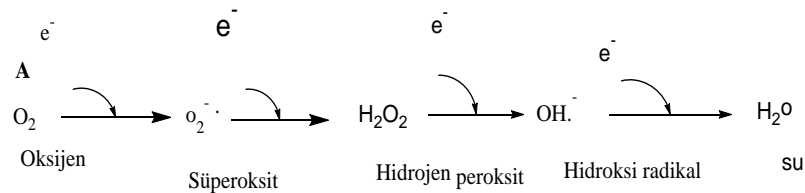
Şekil 1.1. Bitkiler üzerine UV-B radyasyonunun etkileri (Kataria *et al.* 2014)



Şekil 1.2. UV-B radyasyonunun pigment sistemi II üzerine etkisi (Jansen *et al.* 1998)

UV-B radyasyonuna maruz kalan bazı bitkilerde UV-B radyasyonunu absorblayan veya yansıtan epikütikular mumların birikiminin arttığı gözlenmiştir (Tevini and Steinmuller 1987). Bu mumlar epidermisteki flavonoidler ve lignin ile polimerize olmuş ferulik asit gibi UV-B absorblayan bileşikler ile birleşerek koruyucu bir kalkan oluşturur. UV-B radyasyonu yapraklarda yer alan bazı fenolik maddelerin birikimine de yol açar. UV-B radyasyonuna maruz kalan yapraklarda fenolik maddeler özellikle üst epidermal hücrelerde birikir ve 280-340 nm dalga boyuna sahip radyasyonu absorbe ederler. UV-B radyasyonu flavonoidlerin ve fenolik maddelerin üretiminden sorumlu fenilalanin amonyak liyaz ve  $\gamma$ -tokoferol metiltransferaz gibi enzimlerini kodlayan genlerin ifadesini de teşvik etmektedir (Blumthaler and Amback 1990; Ajavon *et al.* 2007).

Diğer taraftan UV-B radyasyonu lipid peroksidasyonunu artıran, DNA'ya hasar veren, lipid ve proteinlerin oksidasyonuna neden olan reaktif oksijen türevleri (ROS) üretmek yoluyla biyomoleküllerde hasara neden olur (Jansen *et al.* 1998; Bjorn *et al.* 1999; Frohnmeyer and Staiger 2003). UV-B ve moleküler oksijen arasındaki etkileşimler bakteri ve hayvan hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu ile sonuçlanır, UV-B radyasyonuna maruz kalan bitkilerde oksidatif stres seviyesindeki artış, benzer prosesin bitkilerde de olduğunu göstermiştir. Bilindiği gibi yüksek derecede reaktif singlet oksijen ( $^1O_2$ ) ve süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) moleküler oksijenden üretilen radikallerdir. Süperoksit radikali indirgenerek peroksit ( $O_2^{2-}$ ) iyonlarını ve/veya perhidroksi radikalini ( $HO_2^{\cdot}$ ) veya hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) oluşturur (Şekil 1.3). Süperoksit radikali fenton reaksiyonu yoluyla yüksek reaktif hidroksi radikalinin ( $OH^{\cdot}$ ) bir kaynağı olarak da hasar oluşturabilir (Gill and Tuteja 2010).



**Şekil 1.3.** Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu (Öztürk Sarıkaya 2009)

Düşük konsantrasyonda ROS hücreler arası iyon konsantrasyonunun devamı ve sinyal

transdüksiyon gibi hücrel işler için önemlidir. Bununla birlikte ROS'un yüksek konsantrasyonları nükleik asitler, proteinler ve hücrel membranlar ile etkileşim yoluyla hücrel fonksiyonları bozabilmektedir. ROS ve nükleik asitler arasındaki etkileşim protein sentezini azaltabildiği, gen düzenlenmesini etkileyebildiği, transkripsiyonu bozabildiği ve DNA'da mutasyonlara neden olan lezyonların oluşumuna sebep olabildiği için oldukça önemlidir. Bilindiği gibi DNA'daki oksidatif hasar hücre büyümesi ve gelişimi üzerinde büyük etkiye sahip olduğundan dolayı bütün organizma için ciddi sonuçlar doğurabilmektedir (Ulm and Nagy 2005; Jenkins 2009).

Bitkiler UV-B'nin neden olduğu ROS'un etkilerini azaltmak amacıyla askorbat ve tokoferol gibi antioksidanların miktarını ve süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırır (Mittler 2002; Van Breusegem *et al.* 2008). Süperoksit dismutaz (SOD) bitki hücrelerindeki en önemli ve en fazla bulunan enzimlerden biridir. Hücrenin bir çok bölümünde yer alan bu enzim ROS detoksifikasyonunun ilk basamağı olarak  $O_2^{\cdot-}$ 'inin  $H_2O_2$ 'ye katalizinden sorumludur. SOD enziminin rolü diğer antioksidan savunma mekanizmalarından önce ROS üretilen bölgede oksidatif stresin çok ciddi etkilerine karşı derhal koruma sağlamaktır (Jain *et al.* 2003; Selvakumar 2008; Han *et al.* 2009; Gill and Tuteja 2010). Oksidatif strese cevap olarak SOD aktivitesinin hızlı artışı çoğunlukla geçici bir durumdur. UV-B maruziyetinden sonraki ilk üç saatte kloroplasttaki SOD aktivitesinin olağan seviyesinden 2.4 kat artış gösterdiği, sonra bu oranın 1.3 kat seviyesine indiği kaydedilmiştir (Selvakumar 2008; Zancan *et al.* 2008). Katalaz, oksidatif strese maruz kalan hemen hemen bütün hücrelerde tespit edilmiştir (Dawar *et al.* 1998). Bitki hücrelerinde katalaz enzimi peroksizomlarda toplanır ve hidrojen peroksidin su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleme yoluyla oksidatif stresin azaltılmasında yer alır. Katalaz aktivitesi farklı abiyotik stres faktörlerine göre değişiklik göstermektedir (Selvakumar 2008; Zancan *et al.* 2008). UV-B radyasyonuna maruziyetten sonra katalaz aktivitesinde artışın olduğu kaydedilmesine rağmen bazı çalışmalarda katalaz aktivitesinin düştüğü de belirtilmiştir (Ambasht and Agrawal 2003; Yang *et al.* 2007b; Han *et al.* 2009). Örneğin Mittler (2002) UV-B stresinin üzüm yapraklarında katalaz aktivitesini artırmadığını rapor etmişlerdir. Enzimatik antioksidanlar içerisinde yer alan

askorbat peroksidaz bitkilerde sitozol ve apoplastın yanı sıra hücre organellerinde de bulunan antioksidan enzimdir (Morita *et al.* 1999; Pekker *et al.* 2002; Garg and Manchanda 2009). Bu enzim askorbik asitten protonların transferini kataliz etmek yoluyla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi detoksifiye etmektedir (Santos *et al.* 2004). UV-B radyasyonu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumunu artırmaktadır ve artan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muhtemelen ascorbate peroxidase (APX) kodlayan genlerin transkripsiyonunun artırılmasında önemli bir sinyal olmakta ve böylece APX aktivitesi UV-B radyasyonu tarafından artırılmaktadır (Zancan *et al.* 2008). UV-B radyasyonuna maruz kalan patates bitkisinde APX izoformlarının ekspresyonunun arttığı Santos *et al.* (2004) tarafından bildirilmiştir. Buna ilaveten, UV-B radyasyonuna maruz kalan bitkilerde APX aktivitesinin düzenlenmesinin UV-B hasarına cevap oluşturmada anahtar rol oynadığı da rapor edilmiştir (Jain *et al.* 2003). Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında yer alan askorbat, APX hareketi için bir substrat olarak antioksidan metabolizmasında fonksiyoneldir ve doğrudan ROS'un detoksifiye edilmesinde işlev görmektedir (Santos *et al.* 2004). Bitki hücrelerinde askorbat, oksidasyon aşamalarının bir çok basamağında görülebilir. Bitki hücreleri çeşitli abiyotik stres faktörlerine cevap oluşturmada askorbat biriktirmektedirler (Pekker *et al.* 2002; Garg and Manchanda 2009). UV-B radyasyonunun oluşturduğu oksidatif strese karşı savunmada askorbatın önemi Gao and Zhang (2008) tarafından ortaya konmuştur. UV-B radyasyonuna maruz bırakılan askorbat biyosentezi yetersiz *Arabidopsis thaliana vitamin c-1* mutantlarında klorofil içeriğinin azaldığı, PS II'nin maksimum etkinliğinin düştüğü, lipid peroksidasyonu ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının arttığı, yüksek miktarda oksidatif stresin olduğu ortaya konmuştur (Carletti *et al.* 2003).  $\alpha$ -tokoferol oksidatif hasara karşı hücre membranlarını korumada yer alan yağda çözünen bir antioksidandır (Hideg *et al.* 1997). UV-B radyasyonu tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı koruyucu özelliği Delong and Steffen (1998) tarafından rapor edilmiştir. Eksojen  $\alpha$ -tokoferol uygulamasının ıspanak tilakoid membranlarını UV-B maruziyeti ile ilişkili hasardan koruduğu bildirilmiştir (Carletti *et al.* 2003; Jain *et al.* 2003). Mısır fideleri ve biber kotiledonlarında UV-B uygulamasını takiben  $\alpha$ -tokoferol aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, askorbat gibi diğer antioksidanlar ile karşılaştırıldığında  $\alpha$ -tokoferolün UV-B'nin neden olduğu oksidatif stres esnasında antioksidan metabolizmanın daha az önemli bir bileşeni olduğu önerilmiştir (Jansen *et al.* 2008; Poiroux-Gonord *et al.* 2010; Galleano *et al.* 2010).

## 1.2. Hümik Asit

Topraktaki organik maddelerin ana içeriği humustur. Humusun en aktif biyokimyasal maddesi ise hümik asittir (Canellas *et al.* 2008; Silva-Matos *et al.* 2012). İlk olarak Sprengel tarafından 1826 yılında çürümüş bitkisel maddelerden sodyum hidroksit ekstraksiyonu ile elde edilen hümik asit doğal büyük bio-polielektrolittir (Eyheraguibel *et al.* 2008; Todorova *et al.* 2014). Bünyesinde önemli oranda polifenol polikarboksilik asit, karbonil ve peroksit barındıran hümik asit koyu kahve-siyah renklidir. Potasyum humat temelli bir çözelti olan hümik asit bitkilerin kök gelişiminde, toprak mikroorganizmalarının çoğalmasında, tarlada kalan anızların kısa sürede parçalanmasında, hafif toprakların su tutma güçlerinin arttırılmasında ve tohumların kısa sürelerde çimlenmesinde etkili olmaktadır (Zhang and Ervin 2004; Rastghalam *et al.* 2011). Ayrıca hümik asidin, azot, fosfor, potasyum, demir ve çinko gibi bitki besin elementlerinin alımını kolaylaştırdığı, ağır killi toprakların yapısının iyileştirilmesinde, topraklarda tuz birikiminin önlenmesinde ve toprakların havalanmasında da olumlu etkileri olduğu bilinmektedir (Lotfi *et al.* 2015). Hümik asit, buğday da dahil olmak üzere birçok bitkide çinko başta olmak üzere mikro besin elementlerinin alımını etkileyerek verim ve verim komponentlerinde artışlara neden olmaktadır. Hümik asidin bitki büyümesini teşvik edici özelliği hümik asitte hormon benzeri maddelerin bulunmasına atfedilmiştir (Cheng *et al.* 1995). Stres koşulları altında bitkilerin yapraklarına uygulanan hümik asit yaprakların su tutma kapasitesini, fotosentez miktarını ve antioksidan metabolizmayı arttırmaktadır (El-Nemr *et al.* 2012).

Bilindiği gibi marul UV-B radyasyonuna karşı orta derecede hassas bir bitkidir. Bu bitkinin PAL (Fenilalanin amonyak-liyaz) biyosentezinden sorumlu genleri aktive etmek, antosiyaninleri ve diğer flaonoidleri harekete geçirmek yoluyla UV-B radyasyonunu da içeren bazı stres faktörlerini elemine ettiği rapor edilmiştir (Tsormpatsidis *et al.* 2010). Marul yüksek derecede ROS süpürücü özelliği olan çok sayıda antioksidan moleküle sahiptir (Ramos *et al.* 2011). Yine UV-B radyasyonu tarafından etkilenen fenolik bileşikler, flavonoidler, vitamin C, E, kalsiyum, lutein ve lif gibi çok sayıda besleyici ve sağlığı olumlu etkileyen bileşik içermektedir. Bu tezde UV-

B stresinin sebzelerde oluşturduğu hasar ve bu hasarın azaltılmasında önceden fidelere uygulanan hümik asidin rolü bazı moleküler, biyokimyasal ve fizyolojik parametreler kullanılarak araştırılmıştır. Tezde model bitki olarak marul (*Lactuca sativa L.*) kullanılmıştır.



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

UV-B radyasyonu bitkilerde morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler prosesleri etkileyen önemli stres faktörlerinden biri olduğu için bu stres faktörünün bitkiler üzerinde oluşturduğu değişiklikler ve bu değişikliklere bitkilerin verdiği yanıtlar üzerine literatürde çok sayıda araştırma ve derleme bulunmaktadır. Literatürde yapılan çalışmaların çoğunda UV-B radyasyonunun bitkilerde çeşitli sekonder bileşiklerin birikimini artırdığı, antioksidan savunma sistemini harekete geçirdiği, reaktif oksijen türevlerinin birikimine yol açtığı, timin dimerlerinin oluşumu gibi mutasyonları uyarak DNA'da hasar meydana getirdiği rapor edilmiştir (Tossi *et al.* 2011).

Xu *et al.* (2008) UV-B radyasyonuna maruziyetin bitkilerde oksidatif hasara yol açtığını, bitkilerin UV-B'nin oluşturabileceği hasarları azaltmak için antioksidan aktivitenin artırılması veya UV koruyucu bileşiklerin birikiminin artırılması gibi bazı UV korunma mekanizmalarına sahip olduğunu bildirmiştir. UV-B radyasyonunun soya fasulyesinde antioksidan aktivite ve flavonoidler üzerine etkisini belirlemek amacıyla orta seviyede flavonoid içeren (normal) ve az flavonoid içeren (magenta) iki soya çeşidi tarla koşullarında UV-B radyasyonuna maruz bırakılmış, solar UV-B radyasyonunun her iki çeşitte oksidatif strese neden olduğu, glutatyon redüktaz, katalaz, askorbat peroksidaz enzimlerinin aktivitelerinde ve dihidroksiascorbat içeriğinde artış oluşturduğu buna karşın süperoksit dismutaz enzim aktivitesinde ve askorbik asit miktarında azalış meydana getirdiği belirlenmiştir (Xu *et al.* 2008).

Rybus-Zajac and Kubis (2010) bitkilerde antioksidan proses üzerine artan UV-B radyasyonunun etkilerini araştırmak için çimlenme aşamasındaki salatalık fidelerine UV-B radyasyonu uygulamış ve hidrojen peroksit miktarını, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde meydana gelen değişimleri ölçmüştür. Çalışmada UV-B artışına bağlı olarak antioksidan enzim aktivitelerinde artışın olduğu, UV-B radyasyonunun salatalık kotiledonlarında reaktif oksijen türevlerinin birikimine neden olduğu ve antioksidan metabolizmayı harekete geçirdiği rapor edilmiştir.

Fang *et al.* (2011), tarafından yapılan bir çalışmada, pirinçte UV-B stresine karşı oluşturulan tolerans mekanizmasında Lsi1 geninin ifadesindeki artış veya azalışın önemli rol oynadığı bildirilmiştir.

Hücre döngüsünde yer alan markır genlerin ifadesinin UV-B radyasyonu altında değiştiği, 2-6 saat UV-B radyasyonu uygulamasının G1 fazından S fazına geçişte yer alan genlerin, Histon H4 ve E2Fa genlerinin ifadesini azalttığı Jiang *et al.* (2011) tarafından rapor edilmiştir.

Yao *et al.* (2011) buğday fidelerinin gelişimi ve fizyolojik parametreleri üzerine UV-B radyasyonu, selenyum ve UV-B+Se kombinasyonunun etkisini incelemiştir. UV-B radyasyonunun MDA ve süperoksit radikali birikimine neden olduğu, bazı antioksidan moleküllerin ve antioksidan enzimlerin birikimine yol açtığı, UV-B+Se uygulamasının ise biyomas birikimini, antioksidan enzimlerin aktivitelerini, antioksidan içeriğini artırdığı, malondialdehid (MDA) ve süperoksit birikimini azalttığı belirlenmiştir.

Liu *et al.* (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, UV-B radyasyonunun buğday fidelerinde oksidatif hasara neden olduğu, antioksidan enzimlerin aktivitesini değiştirdiği, pigment sistemi II'nin fonksiyonlarını azalttığı, UV-B uygulamasından önce uygulanan jasmonik asidin UV-B radyasyonu tarafından oluşturulan oksidatif hasarı azalttığı, pigment sistemi II'nin fonksiyonlarını artırdığı kaydedilmiştir.

Bir başka çalışmada Pandey *et al.* (2012) beş gün UV-B radyasyonuna maruz kalan 10 günlük Hardal (*Brassica juncea*) fidelerinin UV-B stres toleransı üzerine tiyoürenin (TU) etkisini araştırmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında UV-B+TU uygulanan fidelerde fenolik bileşikler, flavonoidler, antosiyaninler gibi UV-B absoplayan bileşiklerin konsantrasyonlarının arttığı, yalnız UV-B radyasyonu uygulanan fidelerle karşılaştırıldığında UV-B+TU uygulamasının yaş ve kuru ağırlık oranlarını artırdığı ve klorofil hasarını azalttığı belirlenmiştir. Kontrol ile mukayese edildiğinde UV-B+TU muamelesi ile fenilalanin amonyak liyaz (PAL) ve kalkon sentaz (chs) genlerinin ifadesinin arttığı, bunun sebebinin de TU uygulamasının flavonoid biyosentetik yolunu

erkenden uyarması olduğu ifade edilmiştir. Sonuç olarak tiyoürenin UV-B stresinin hasar verici etkisinin azaltılmasına yardımcı olduğu belirtilmiştir.

Zhao *et al.* (2012) kışlık buğday tohumlarını üç farklı dozda düşük enerjili N<sup>+</sup> ışınlarına maruz bırakmış, tohumlar üç yapraklı evredeki fidelere dönüşünce fidelere UV-B (10.08 kJm<sup>-2</sup>gün<sup>-1</sup>) radyasyonu uygulamıştır. Çalışmada, tohumların karakteristik büyümesi, UV-B radyasyonu ile indüklenen membran sistemlerindeki oksidatif hasar ve önceden uygulanan N<sup>+</sup> ışınlarının radyasyon hasarını hafifletici etkisi araştırılmıştır. Uygulanan 4.0×10<sup>16</sup> iyon/cm<sup>2</sup> ışın dozunun çimlenme ve fide oranını kontrole göre arttırdığı belirlenmiştir. Yalnız UV-B uygulaması ile kıyaslandığında tohumlara önceden uygulanan 4.0×10<sup>16</sup> iyon/cm<sup>2</sup> ışın dozunun peroksit ve süperoksit dismutaz enzim aktivitesini, çözünebilir protein, glutatyon ve klorofil miktarını arttırdığı, malondialdehit miktarını önemli derecede azalttığı kaydedilmiştir. Sonuç olarak, buğday tohumlarına uygun dozda düşük enerjili iyon ışını ön uygulamasının, fide evresinde UV-B radyasyonunun hasar verici etkilerini hafiflettiği rapor edilmiştir.

Bandurska and Cieslak (2012) fenilalanin biyosentetik yolunu kontrol eden PAL ve benzoik asit hidroksilaz (BA2H) aktivitesinin yanı sıra salisilik asit birikimi üzerine UV-B radyasyonu, su eksikliği ve onların kombine etkilerini araştırmıştır. Su eksikliği ile birlikte salisilik asit konsantrasyonunun, PAL ve BA2H enzim aktivitelerinin arttığı, su eksikliği koşullarında salisilik asit artışının önce köklerde sonra yapraklarda gözlemlendiği belirtilmiştir. Yalnız UV-B radyasyonuna maruz kalan bitkilerde BA2H enzim aktivitesinde artış belirlenmiş, UV-B radyasyonuna maruz kalıp sonra susuz bırakılan bitkilerde ise karışık tolerans mekanizmaları gözlenmiştir.

Stratosferik ozon tabakasındaki azalmaya bağlı olarak yerküre üzerine ulaşan UV-B radyasyonundaki artışın bitkilerin fotosentez verimi ve fotosentezi üzerine olan olumsuz etkileri değerlendirilmiştir (Kataria *et al.* 2014). UV-B radyasyonunun yeşil bitkilerin fotosentetik aparatının bir çok bölgesine zarar verdiği, özellikle oksijen yayan kompleks, D1/D2 reaksiyon merkez proteinleri ve pigment sistemi II'nin alıcı ve verici bölgelerindeki diğer bileşenlerin UV-B radyasyonundan etkilendiği, UV-B

radyasyonunun ışık hasat eden kompleks II'yi inaktive ettiği ve pigment sistemi II reaksiyon merkezindeki proteinlerin sentezindeki genlerin ifadesini değiştirdiği belirtilmiştir. Buna ilaveten, su oksidasyon kompleksinin Mn kümesinin UV-B stresinin en önemli hedefi olmasına rağmen, D1 ve D2 proteinleri, kinon molekülleri ve sitokrom B'nin UV-B'nin sonraki hedefi olduğu, Rubisco'nun etkinliği ve içeriğine doğrudan etkisi olan fotosentetik karbon indirgemesinde UV-B radyasyona karşı hassas olduğu bildirilmiştir. UV-B radyasyonunun doğrudan olmayan etkileri arasında fotosentetik pigmentlerde, stoma iletkenliğinde, yaprak morfolojisinde meydana gelen değişimler sıralanmıştır. Koruyucu mekanizmaların yetersizliğinin ise PS II'yi UV-B radyasyonuna karşı daha savunmasız yaptığı rapor edilmiştir.

Choudhary and Agrawal (2014) antropojenik aktivitelerden dolayı yeryüzerine ulaşan solar UV-B miktarındaki artışın bitkiler üzerine zararlı etki oluşturduğunu belirtmiş ve bezelye bitkisi üzerine artan UV-B radyasyonunun etkisini araştırmıştır. Çalışmada özellikle UV-B radyasyonunun flavonoidler, bitkisel hormonlar ve azot metabolizması üzerine etkisi incelenmiştir. UV-B radyasyonunun direk olarak oksidatif stres oluşturmak yoluyla veya HUDP-15 ve HUP-2 gibi bezelye çeşitlerinde içsel salisilik asit miktarını artırmak yoluyla bitki büyümesini, biyomas miktarını, ürün miktarı ve kalitesini etkilediği belirlenmiştir. UV-B radyasyonu altında flavonoid birikimindeki artışın ne fotosentetik aparata yeterince koruma sağladığı ne de biyolojik azot fiksasyonu artışına yardım ettiği kaydedilmiştir. Azot fiksasyonu ve asimilasyonunun UV-B radyasyonundan olumsuz etkilendiği, nitrojenaz, nitrat redüktaz, nitrit redüktaz aktiviteleri ve leghemoglobin içeriğinin artan UV-B ile azaldığı gözlenmiştir. HUP-2 çeşidinde yüksek miktarda salisilik asit birikimi bu çeşidin UV-B radyasyonuna karşı hassasiyetinin yüksek olması ile, HUDP-15 çeşidinde antioksidan enzimler ve jasmonik asit miktarındaki artış ise uygulanan strese karşı direnç oluşturma mekanizması ile ilişkilendirilmiştir.

Todorova *et al.* (2014), aktif bileşiminde hümik asit olan kömürden biomin adında doğal bir madde ekstrakte etmiş ve UV-B radyasyonu uygulamadan 3 gün önce bu maddeyi tritikale köklerine uygulamıştır. Biomin ön uygulamasının UV-B radyasyonu

tarafından oluşturulan oksidatif hasarı azalttığı, antioksidan enzim aktivitelerini pozitif etkilediği, büyüme üzerine olumlu etki ettiği ve UV-B absorplayan bileşiklerin miktarını artırdığı tespit edilmiştir. Çalışmada tritikale bitkisine önceden biomin uygulamanın enzimatik olmayan antioksidanların miktarını ve reaktif oksijen türevlerinin detoksifikasyonunda yer alan antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırmak yoluyla UV-B radyasyonu tarafından oluşturulan oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir.

Olumsuz çevre şartlarına karşı olağanüstü toleransı bulunan tipik çöl bitkisi *Reaumaria soongorica*'nın UV-B radyasyonuna karşı oluşturduğu moleküler cevaplar Liu *et al.* (2015) tarafından araştırılmıştır. Artan UV-B radyasyonuna *R. soongorica*'nın cevap ya da tolerans mekanizmalarını test etmek için UV-B radyasyonu uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında çeşitli genlerin ekspresyonlarındaki değişim analiz edilmiş, gruplar arasında 561 genin ekspresyonunun arttığı, 1589 genin ise ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. Fonksiyonel analiz için farklı ekspresyon olan genler üç gruba ayrılmıştır. Birinci grupta fotosentezle ilişkili proteinler, ribuloz-fosfat-3-epimeraz ve ATP bağımlı Clp-proteazı içeren kloroplast lokalize proteinler gibi UV-B radyasyonu tarafından transkripsiyonu inhibe edilen genler toplanmıştır. İkinci grupta fototropinler ve GTP-bağlı proteinler gibi sinyal transdüksiyonunda yer alan proteinler yer almıştır. Üçüncü grupta ise lipid transferi ve flavonoid biyosentezi için preteinler toplanmıştır. Çalışmada lipid transferi ve flavonoid biyosentezindeki genlerin ekspresyonlarındaki artışın UV-B radyasyonuna karşı korunma mekanizmasında önemli olduğu, UV-B radyasyonunun kloroplast fonksiyonlarında bozulmaya yol açabileceği, sinyal transdüksiyon ve koruyucu proteinler için genlerin ifadesindeki değişimlerin *R. soongorica*'nın UV-B radyasyonuna cevap oluşturmada bir strateji olabileceği bildirilmiştir.

Choi *et al.* (2002) flavonoidler ve diğer fenil propanoid türevleri gibi UV absorblayan bileşiklerin ve UV geçişini azaltan epidermis tabakasının UV radyasyonunun potansiyel hasar verici etkilerine karşı bitkileri koruyan başlıca mekanizmalar olduğunu belirtmiş ve bu mekanizmaların bitkilerin değişen UV koşullarına adaptasyonunda oldukça kritik

olduğuna değinmiştir. Yazarlar çalışmalarında, zaman ve işgücü gerektirmesi, tarla koşullarında optik özelliklerin çoklu ölçümü için etkin olmaması gibi sınırlayıcı nedenlerden dolayı yaprak epidermisinden UV geçişinin geleneksel yöntemlerle ölçülmesinde sorunlar bulunduğunu ve bu yüzden hızlı, güvenilir aynı yaprak alanı üzerinde bir çok optik çalışmaya izin veren yeni bir yöntemin geliştirilmesine ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir.

Topcu *et al.* (2015) brokolinin hasat sonrası kalitesi, antioksidan aktivitesi ve antioksidan bileşikleri üzerine vejetatif dönemde uygulanan UV-B radyasyonunun etkisini araştırmıştır. Bu amaçla brokoliye bir cam tank içerisindeki topraksız sistemde faklı dozlarda (2.2, 8.8 ve 16.4 kJ/m<sup>2</sup>/gün) UV-B radyasyonu uygulanmış, hasat edilen brokoli bitkileri 0°C’de 60 gün bekletilmiştir. Çalışmada vejetatif dönemde uygulanan UV-B radyasyonunun toplam karetinoid, klorofil a ve klorofil b miktarını azalttığı, askorbik asit, toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarını artırdığı belirlenmiştir. Uygulanan bütün dozların antioksidan aktiviteyi azalttığı buna karşın sinigrin ve glukotropaeolin miktarını artırdığı tespit edilmiştir. Öte yandan depolama periyodunun uzamasının askorbik asit miktarını, toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarını azalttığı ve antioksidan aktiviteyi düşürdüğü saptanmıştır. Yine uzun süre depolama periyodunun klorofil ve karetinoid miktarında azalmaya neden olduğu için brokolide renk kaybına yol açtığına değinilmiştir.

Takshak and Agrawal (2015), transplantasyondan 30, 60 ve 90 gün sonra tarla koşullarında *Coleus forskohlii* türünün fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal karakterlerinin değişimi zerine UV-B radyasyonun etkilerini araştırmış, UV-B stresi altında flavonoidler ve fenolik maddeler gibi sekonder metabolitlerin miktarının arttığını, direk olarak UV-B radyasyonuna maruz kalan yapraklarda bu artışın en fazla olduğunu kaydetmiştir. Yine fenilalanin amonyak liyaz, sinnamol alkol dehidrogenaz, kalkon flavon izomeraz gibi fenil propanoid yolunda yer alan enzimlerin aktivitelerinde belirgin bir artışın olduğu, UV-B radyasyonuna maruz kalan yaprak ve gövde gibi organlarda hem enzimatik (askorbat peroksidaz, katalaz, glutatyon redüktaz, peroksidaz

polifenol oksidaz, süperoksit dismutaz) hem de enzimatik olmayan antioksidanların (askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol) miktarının önemli derecede arttığı tespit edilmiştir.

Jiao *et al.* (2016), tarafından yapılan çalışmada, soya fasulyesinde UV-B radyasyonu tarafından oluşturulan izoflavon birikimi, antioksidan sistem ve içsel nitrik oksit sinyal transdüksiyon yolları arasındaki ilişki araştırılmış, UV-B radyasyonunun fenilalanin amonyak liyaz, kalkon sentaz gibi anahtar enzimlerin genlerinin ifadesini artırmak yoluyla izoflavon birikimine neden olduğu, glutatyon redüktaz askorbat peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinde artışa yol açtığı, yine çeşitli antioksidanların miktarlarında artışa neden olduğu belirlenmiştir. Buna ilaveten, önemli bir sinyal molekül olarak nitrik oksitin UV-B ile birlikte soya fidelerinde antioksidan sistemi harekete geçirdiği ve izoflavon birikimine neden olduğu rapor edilmiştir.

Esringu *et al.* (2016), marul fidelerine eksojen olarak uygulanan sodyum nitroprusidin (SNP) süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini, toplam fenolik madde miktarını, antioksidan kapasiteyi, fenilalanin amonyak liyaz gen ifadesini artırmak yoluyla UV-B stresine toleransı teşvik ettiğini bildirmiştir.

### 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 mg/kg hümik asit çözeltisi: 10 mg HA 1000 mL saf suda çözünene kadar karıştırılarak hazırlanır.
3. 20 mg/kg hümik asit çözeltisi: 20 mg HA 1000 mL saf suda çözünene kadar karıştırılarak hazırlanır.
4. 30 mg/kg hümik asit çözeltisi: 30 mg HA 1000 mL saf suda çözünene kadar karıştırılarak hazırlanır.
5. %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.
6. %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.
7. %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.
8. %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.
9. 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.

- 10.** 65 mM  $K_2HPO_4$ , pH: 7.8 (Süperoksit anyonu miktarının belirlenmesinde kullanılan tampon): 1,132 g  $K_2HPO_4$  70 mL saf su da çözülmüş pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 11.** 40 mM  $H_2O_2$  çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 408  $\mu$ L %30'luk  $H_2O_2$  hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 12.** 5 mM  $H_2O_2$  çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan): 41  $\mu$ L %30'luk  $H_2O_2$  hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 13.** 0.1 M  $Na_2HPO_4$ , pH: 5.5 (Peroksidazın aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3.55 g  $Na_2HPO_4$  alınarak 200 mL saf suda çözülmüş ve pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.
- 14.** Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi: 54  $\mu$ L quairol ve 15  $\mu$ L  $H_2O_2$ 'dan ( $d=1.13$  g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 mL 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.
- 15.** Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi: 54  $\mu$ L quairol ve 15  $\mu$ L  $H_2O_2$ 'dan ( $d=1.13$  g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 mL 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.
- 16.** 50 mM  $KH_2PO_4$  (pH: 7.8) (SOD için tampon çözeltisi): 1.7 g  $KH_2PO_4$  200 mL saf suda çözülmüş, pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra ve hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.
- 17.** 13 mM metionin çözeltisi (SOD reaksiyon karışımı için): 0.586 g metionin alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250 mL 50mM  $KH_2PO_4$  tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 18.** 63  $\mu$ M NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür (SOD reaksiyon karışımı için): 0.0128 g NBT alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250 mL 50mM  $KH_2PO_4$  tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 19.** 0.1 mM EDTA-Etilen Diamin Tetra Asetik asit (SOD reaksiyon karışımı için): 0.073 g EDTA alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250 mL 50 mM  $KH_2PO_4$  tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 20.** 13  $\mu$ M riboflavin (SOD aktivitesi için 2. çözeltisi): 0.019 g riboflavin, 500 mL saf suda çözülmüş, 3 mL'lik reaksiyon karışımının 13  $\mu$ M riboflavin içermesi için 390  $\mu$ L riboflavin alınmıştır.

21. 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°de muhafaza edilir.
22. 1x MOPS solüsyonu (Agaroz jel elektroforez için): 10 mL 20Xmops alınıp üzerine 190 ml saf su eklenir. Oda sıcaklığında muhafaza edilir.
23. 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 24 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 fidelerine kontrol için yalnızca hoagland çözeltisi, diğer örnekler için hoagland çözeltisine ilave 10 mg/kg hümik asit (HA I), 20 mg/kg hümik asit (HA II) ve 30 mg/kg hümik asit (HA III) verilmiş ve saksılar düzenli aralıklarla uygun dozda HA ve hoagland çözeltisi ilave edilerek 30 gün iklim kabininde bekletildikten sonra üzerlerine 3.3W m<sup>-2</sup> doz UV-B (UV-B Philips TL100W/12) radyasyonu 12 saat uygulanmıştır (kontrol, HA I, HA II ve HA III grupları hariç). UV-B uygulamasını takiben genç ve iyi gelişmiş olan yapraklar

alınarak, ROT ve enzim analizleri için hemen kullanılmış, diğer analizler için -80°C derin dondurucuya bırakılmıştır.

### **3.3.2. Marul fidelerinde 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.

### **3.3.3. Marul fidelerinde toplam flavonoid miktarının belirlenmesi**

Marul yapraklarındaki toplam flavonoid miktarı bir kalorimetrik yöntem kullanılarak (Choi *et al.* 2002) belirlenmiştir. Bu amaçla 0.5 ml bitki ekstraktı içerisinde 2 mL distile su ve 0.15 mL %5'lik NaNO<sub>2</sub> bulunan 15 mL'lik polipropilen tüpe konularak 5 dakika inkübe edilmiş, üzerine 0.15 mL %10'luk AlCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O çözeltisi eklenmiş, karışım 5 dakika bekletilerek üzerine 1mL 1M NaOH ilave edilmiştir. Çözelti iyice karıştırılarak 15 dakika inkübe edildikten sonra 415 nm'de absorbans değeri ölçülmüştür.

### **3.3.4. Marul fidelerinde 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  $MnO_2$  20 ml ABTS stok çözeltisine ilave edilmiş ve ABTS radikal katyon (ABTS\*) oluşturmak üzere 30 dakika için karıştırılmıştır. Daha sonra, ABTS çözeltisi fazla  $MnO_2$ 'yi ortadan kaldırmak için bir filtre kağıdından 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 vorteksledikten sonra karışımın absorbens değeri okunmuştur.

### **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 x 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 x g'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısmı alınarak absorbens 532 nm de okunur ve daha sonra 600 nm deki non-spesifik absorpsiyon için absorbens değeri belirlenir.

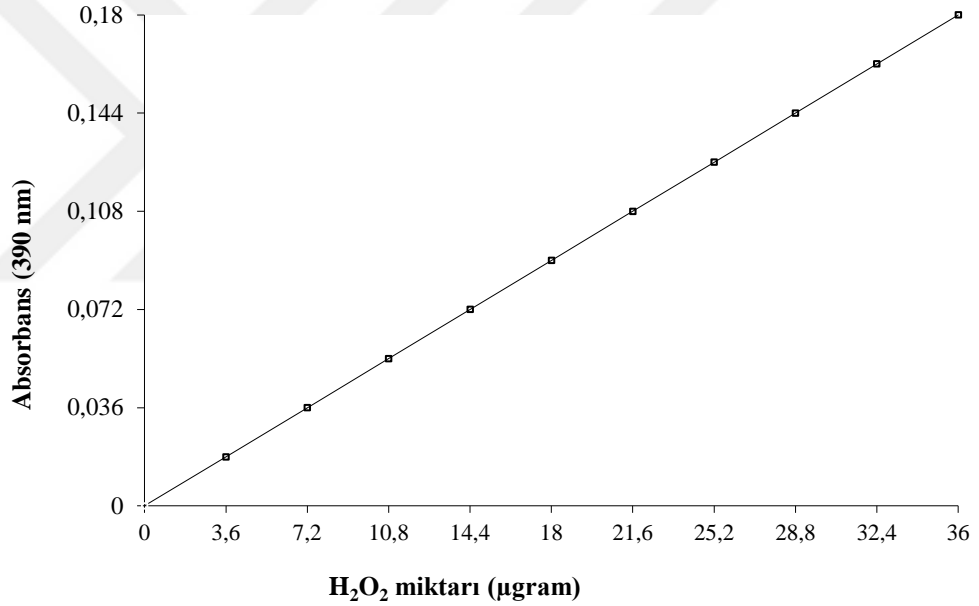
Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbens değerinden 600 nm'de belirlenen değeri çıkarılır ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/g):  $[(A_{532} - A_{600})/155000] \times 10^6$  formülüyle hesaplanır. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde verilir (Frohnmeier and Staiger 2003).

### **3.3.6. Marul fidelerinde 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  $H_2O_2$  miktarı ( $\mu\text{molg}^{-1}$  doku) olarak hesaplanmıştır (Velikova *et al.* 2000).

Standart grafiği hazırlamak için  $H_2O_2$  çözeltisinden eppendorf tüplerine sırasıyla 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ve 18 mikrogram  $H_2O_2$  olacak şekilde hesaplanarak konulmuştur. Tüpün hacmi 1 mL olacak şekilde 10 mM  $KH_2PO_4$  (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.).



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

### 3.3.7. Marul fidelerinde süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) miktarının belirlenmesi

0.5 g marul yaprağı sıvı azot ile öğütüldükten sonra 2 mL 65 mM (pH: 7.8) fosfat tamponu ile homojenize edilmiş ve homojenat  $5000 \times g$ 'de 10 dk. ve  $+4^\circ\text{C}$  de santrifüj edilmiştir. Süpernatantan 1 mL, 10 mM hidroxilamin'den 0.1 mL ve aynı fosfat tamponundan 0.9 mL alınıp  $25^\circ\text{C}$ 'de 20 dakika inkübe edilmiş, bu karışımdan 1 mL alınarak üzerine 1 mL 17 mM aminobenzene sülfonik asit ve 1 mL 17 mM 1-naftilamin

eklenmiş ve 25°C de 20 dakika inkübe edildikten sonra spektrofotometre de 530 nm'de ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar NaNO<sub>2</sub> standart grafiğine göre değerlendirilmiştir (Eltner and Heupel 1976).

### **3.3.8. Antioksidan 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 +40C'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).

#### **3.3.8.a. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi**

Süperoksit 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).

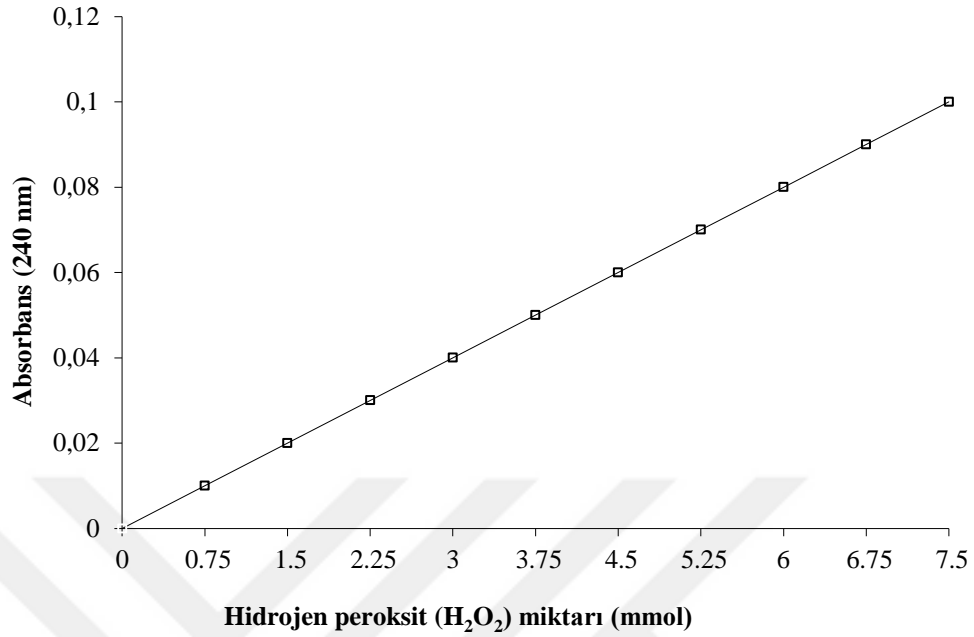
### 3.3.8.b. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin belirlenmesi

Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de absorbansdaki azalışa bağı olarak belirlenir (Mittler 2002; Van Breusegem *et al.* 2008). Enzim aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponu (ph: 7.0), 250  $\mu$ M askorbik asit (ASC), 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 20  $\mu$ L 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.

### 3.3.8.c. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için Yanarelli *et al.* (2006) uyguladığı metot kullanılır. Bu metot, katalazın ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin oksijen ve suya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans değişiminin 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır.

Önce reaksiyonda azalan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını belirlemek için standart grafik hazırlanır. Standart grafik hazırlamak için, 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 30  $\mu$ L su ilave edilmiştir. Spektrofotometrede 240 nm'de absorbans köre karşı okunmuş ve absorbans değerlerine karşılık gelen  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> değerleri kullanarak standart grafik elde edilmiştir (Şekil 3.2.). Aktivite ölçümü için 3 mL'lik spektrofotometre küvetine, 103 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponundan 1.475 mL ve 40 mM'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrat çözeltisinden 1.5 mL konulduktan sonra, 25  $\mu$ 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  $\mu$ mol cinsinden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarına dönüştürülmüştür. 25°C'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1  $\mu$ 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

### 3.3.9. Marul fidelerinde askorbik asit ve tokoferol miktarının belirlenmesi

Marul yapraklarının askorbik asit içeriğinin belirlenmesinde Abdunabi *et al.* (1997) metodunun modifiye edilmiş versiyonu kullanılmıştır. Bu amaçla, 10 g yaprak dokusu 0.3 M meta-fosforik asit ve 1.4 M asetik asit içerisinde homojenize edilmiş ve alüminyum folyo ile sarılmış konik bir tüpe aktarılmış, homojenat oda sıcaklığında 12.000g de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Karışım filtre kağıdından (Whatman No. 1) süzildükten sonra askorbik asit miktarı ters faz HPLC tekniği yolu ile belirlenmiştir.

Tokoferol miktarının belirlenmesi için bir ekstraksiyon tüpüne 4-5 g marul yaprağı konulmuş, üzerine pirogallol (%6 m/v) içeren 20 ml etanol eklendikten sonra topaklanmayı önlemek amacıyla tüp iyice çalkalanmıştır. 10 dakikalık sonikasyon işleminin ardından, %60 oranında potasyum hidroksit içeren 5 ml deiyonize su tüpe ilave edilmiştir. Ekstraksiyon tüpünden 1 dakika boyunca azot gazı geçirildikten sonra hava kondensatörüne bağlanmıştır. Örnekler 70°C'ye ayarlı su banyosunda 30 dakika çalkalanarak bileşenlerine ayrılmıştır. 10 dakikalık sonikasyon işleminden sonra buz banyosunda soğutulmuştur. Her bir tüpe 20 mL %2 lik sodyum klorür çözeltisi ilave

edilmiştir. Yağlanmış karışım yüzde 0.05'lik BHT içeren 10 mL'lik ekstraksiyon solventi (Hekzan etil asetat 85:15 V/V) ile iki kere ekstrakte edilmiş ve 50 mL'lik tüplere konulmuştur. Hacim ekstraksiyon solventi ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Sonra 0,45 mm'lik naylon membran filtresi kullanılarak filtre edilmiştir. 1 mL'lik örnekler Azot gazı altında evapore edilmiş sonra uygun konsantrasyonda alınarak HPLC cihazı ile analizi yapılmıştır (Lee *et al.* 2000).

### 3.3.10. Marul fidelerinde bazı fenolik maddelerin belirlenmesi

Marul yapraklarındaki fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için Nicolle *et al.* (2004) tarafından tanımlanan protokol modifiye edilerek kullanılmıştır. İlk olarak sıvı azot kullanılarak öğütülmüş 1 g marul yaprağı 1 dakika için 80°C'de 50 mL %70'lik metanol ile yıkanmış, sonra 1 saat oda sıcaklığında karıştırılmış ve filtre kağıdından (Whatman No. 1) süzümüştür. 25 mL ekstakt bir evaporatör kullanılarak 50°C'de kurutulmuş ve tekrar 5 ml %70'lik metanolde çözündürülmüştür. HPLC analizleri öncesi konsantrasyon 0.45 µm filtreli membran kullanılarak filtre edilmiştir. Daha sonra 5 µL ekste bir pompa, bir UV/Vis dedektör, bir otomatik örnekleyici ve bir toplayıcıya sahip HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Her bir fenolik bileşik bir guard kolonlu kolon kullanılarak 60°C'de ekstreden ayrılmıştır. Numune 1.8 mL min<sup>-1</sup> akış oranlı çözücü A [H<sub>2</sub>O/ CH<sub>3</sub>COOH (338/1, v/v)] ve çözücü B [H<sub>2</sub>O/C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH (330/ 8/1, v/v/v)] ile çözülmüştür. Daha sonra ekstreden elde edilen pikler standart bileşiklerle mukayese edilerek fenolik bileşiklerin miktarı belirlenmiştir. Kullanılan standartlar (5 mg/100 ml): klorojenik, izoklorojenik, phaseolik asit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), kafeik asit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-O-glucuronide, quercetin-3-O-galactoside and quercetin-3-O-(6''-malonyl)-glucoside (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), kikorik asit (Chemical Co., Inc., Hillsborough, NJ, USA), ve luteolin-7-O-glucoside (Indofine Chemical Co., Inc., Hillsborough, NJ, USA).

### 3.3.11. PAL enzim aktivitesinin belirlenmesi

PAL enzim aktivitesinin belirlenmesi için 1 g bitki yaprağı 5mM  $\beta$ -merkaptoetanol ve %4 (w/v) polivinilpolipirrolidon içeren 4 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8.8) tamponu içerisinde 4°C'de homojenize edilmiştir. Homojenat 10 dakika için 10000×g'de santrifüj edilmiş ve süpernatant alınarak enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı için 2.75 ml 50 mM L-fenilalanin içeren 50 mM Tris-HCl (pH 8.8) ve 250  $\mu$ L süpernatant kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı 37°C'de 1 saat süresince inkübe edilmiş ve %10 TCA ile reaksiyon durdurulmuştur. Reaksiyon karışımı 5 dakika için 10000×g'de santrifüj edilmiş ve PAL aktivitesi spektrofotometrik olarak ( $A_{290}$ ) belirlenmiştir. Bir ünite enzim aktivitesi 0.01 min<sup>-1</sup> absorbans artışına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. PAL aktivitesi gram taze ağırlık başına enzim ünitesi olarak kaydedilmiştir (Ug<sup>-1</sup> FW).

### 3.3.12.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 erimedenden 450  $\mu$ L RLT tamponu eklenmiş (5  $\mu$ L merkaptoetanol 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  $\mu$ L) pembe renkli kolon barındıran toplama tüpüne aktarılmış, 15 saniye 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 12.000 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 12.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Kolon yeni bir toplama tüpüne geçirilerek 15.000 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 12.000 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.

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

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

### **3.3.12.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 1 µL oligo (dT) primer eklenmiştir. Toplam hacim 12 µL olana kadar ise nükleaz-free su eklenmiştir. Hafif bir santrifüjden sonra PCR cihazında cDNA programında 65°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra her bir tüp içine 4 µL

5× reaction buffer, 1 µL 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.

### 3.3.12.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
<b>PAL</b>	ACGAAATGGACCGTTACAG	TCCCTCTCGATCATTTTGG
<b>γ-TMT</b>	TGTTGACGCAATACCACCAC	GCCATTGTCATCGGAGGAAC
<b>Aktin</b>	AGCAACTGGGATGACATGGA	GGGTTGAGAGGTGCCTCAGT

### 3.3.13. Gen ekspresyonu hesaplamaları

Gen ekspresyonu hesaplamaları,  $\Delta\Delta C_t$  değeri ve gen ekspresyonunda meydana gelen değişimlerin grafiksel analizi için online Qiagen Data Analiz Merkezi'nden (Qiagen data analysis center) elde edilen veriler kullanılmıştır.

### 3.3.14. İstatistiksel analiz

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

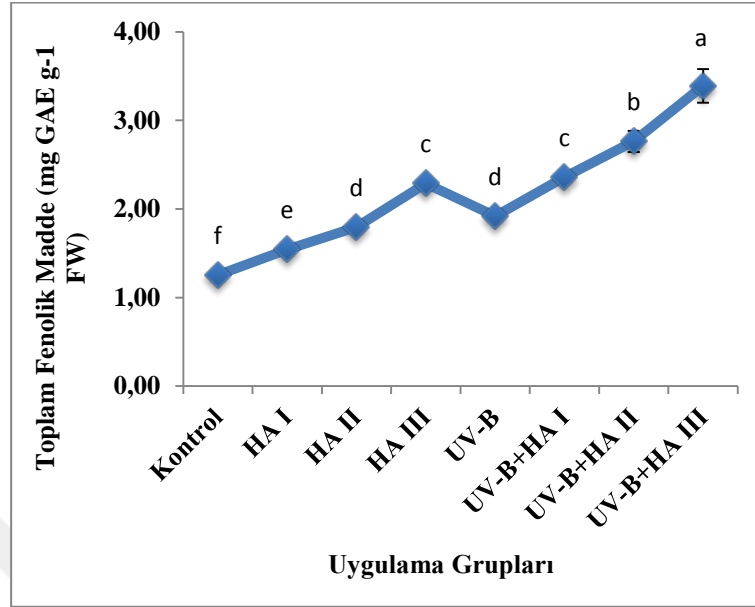


#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

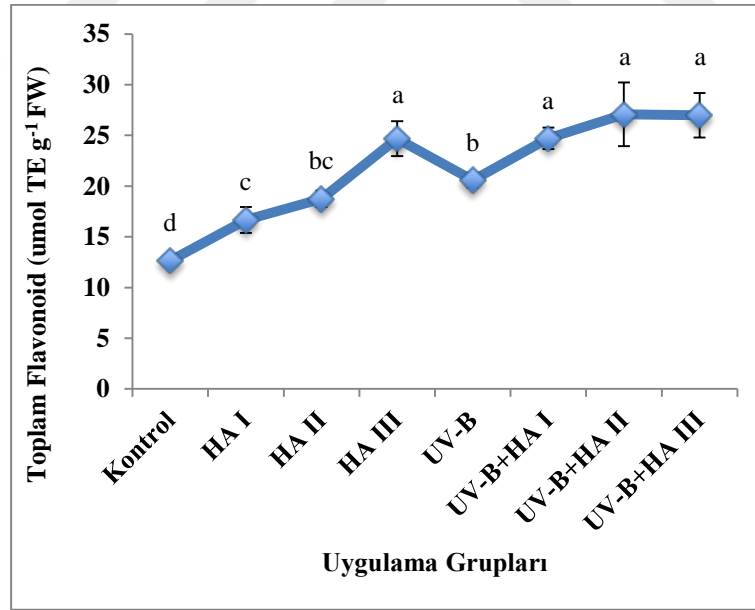
Araştırmamızda kullanılan hümik asit konsantrasyonları literatür verilerinden ve yapılan ön çalışmalardan elde edilen verilere göre 10 mg/L (HA I) ve 20 mg/L (HA II) ve 30 mg/L (HA III) olarak belirlenmiştir. UV-B radyasyonu dozu ve süresi ise hem yapılan ön deneylerden hem de (Tossi *et al.* 2011; Tossi *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 çalışmamızda UV-B uygulama süresi 12 saat UV-B dozu  $3.3W m^{-2}$  olarak belirlenmiştir.

##### **4.1. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda HA Uygulamalarının Marul Fidelerindeki Toplam Fenolik Madde, Toplam Flavonoid Miktarı ve Antioksidan Kapasite Üzerine Etkisi**

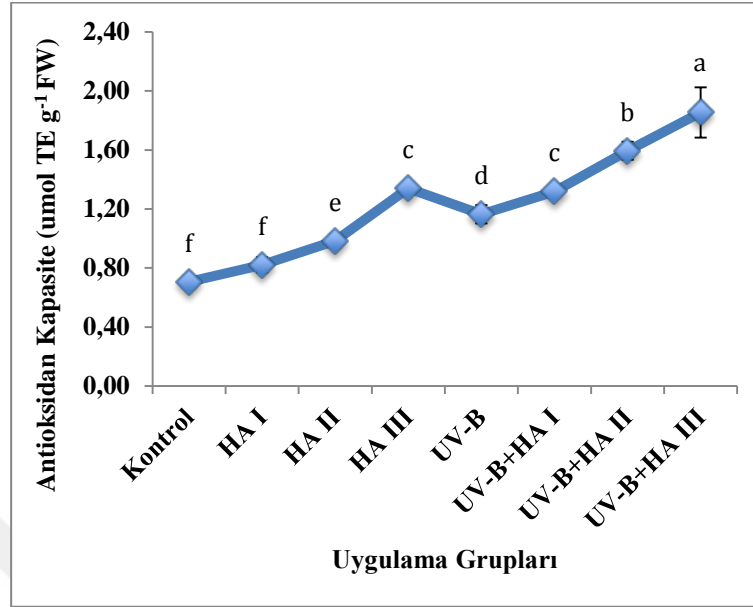
Marul fidelerinin toplam fenolik madde, toplam flavonoid içeriği ve antioksidan kapasitesi kontrol ile mukayese edildiğinde hem HA uygulama gruplarında hem de UV-B uygulama gruplarında artmıştır (Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3). UV-B ile birlikte yapraklara uygulanan farklı konsantrasyonlardaki hümik asit ise kontrol grubuna göre toplam fenolik madde, toplam flavonoid içeriğini ve antioksidan kapasiteyi önemli ölçüde artırmıştır ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.1.** HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında toplam fenolik madde miktarındaki değişim



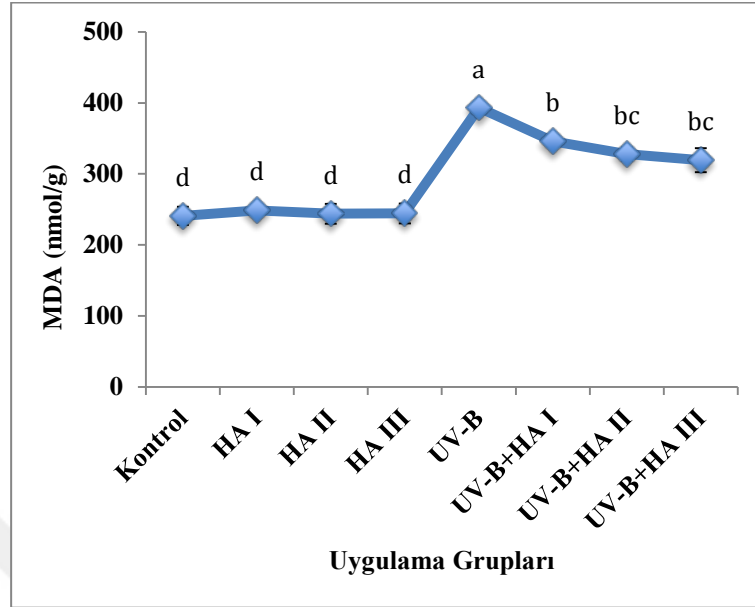
**Şekil 4.2.** HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında toplam flavonoid miktarındaki değişim



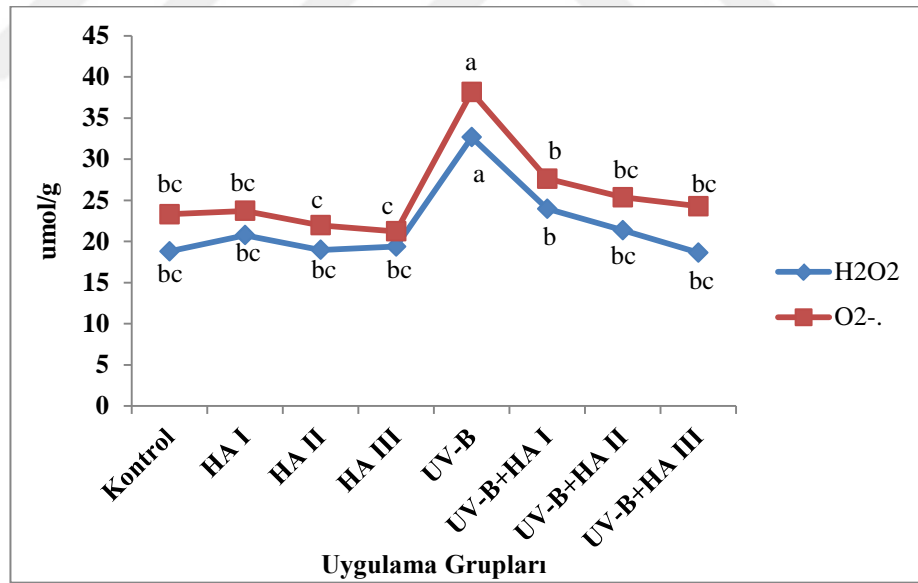
**Şekil 4.3.** HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında antioksidan kapasitedeki değişim

#### 4.2. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda HA Uygulamalarının Marul Fidelerindeki Malondialdehit (MDA), Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve Süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) Miktarı Üzerine Etkisi

Kontrol ile kıyaslandığında tek başına marul fidelerine uygulanan HA marul fidelerinde MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub><sup>-</sup> seviyesini önemli oranda değiştirmemiştir (Şekil 4.4, 4.5). Fidelere tek başına uygulanan UV-B MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub><sup>-</sup> miktarlarını oldukça büyük oranda artırmış, tek başına UV-B uygulaması ile mukayese edildiğinde UV-B ile birlikte uygulanan hümik asit ise marul fidelerindeki MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub><sup>-</sup> miktarını önemli ölçüde düşürmüştür.



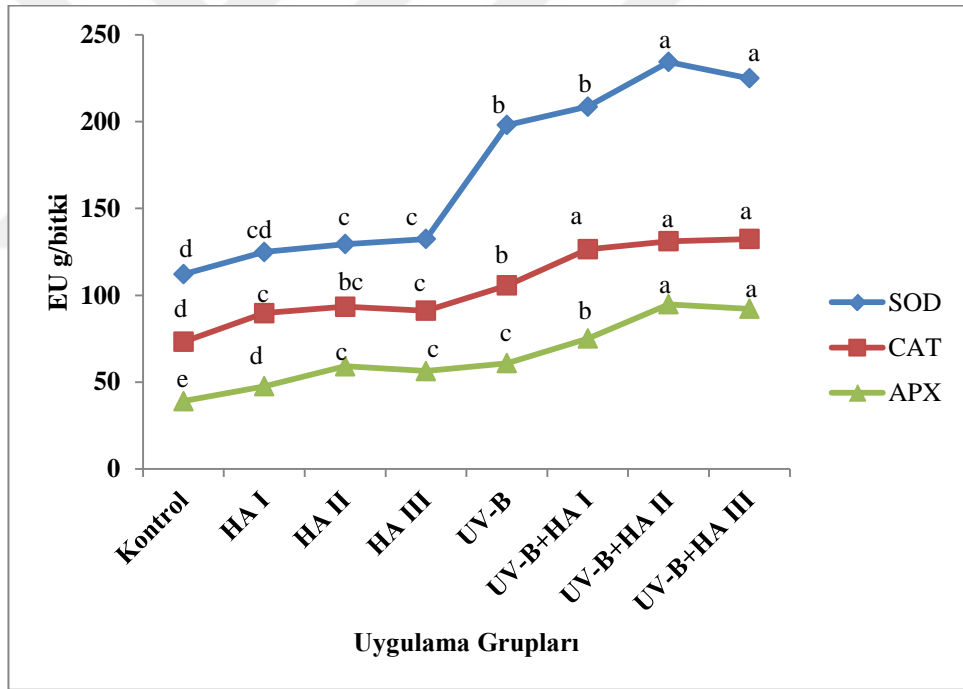
Şekil 4.4. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında MDA miktarındaki değişim



Şekil 4.5. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub><sup>-</sup> miktarındaki değişim

### 4.3. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda HA Uygulamalarının Marul Fidelerindeki Bazı Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi

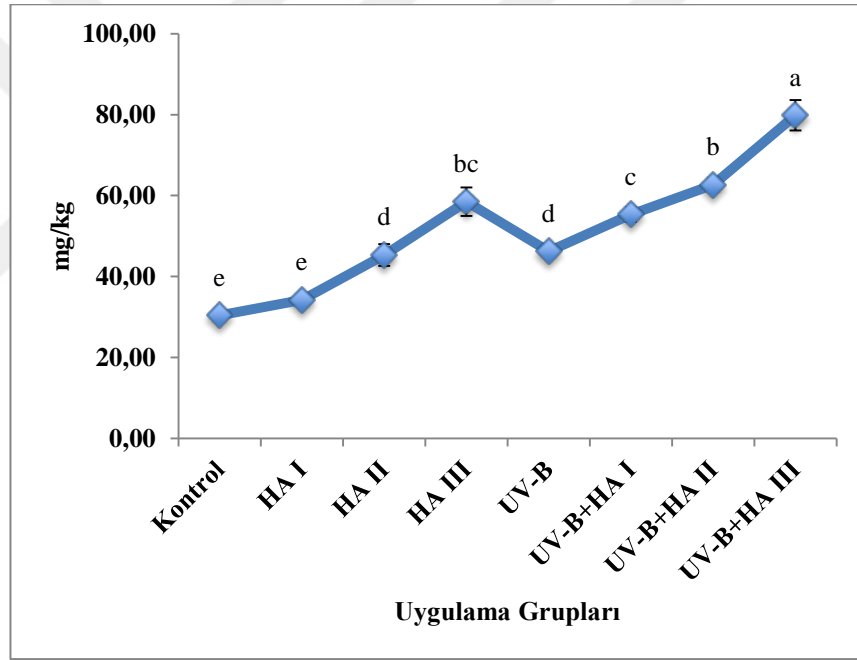
Marul fidelerinde antioksidan enzim aktiviteleri UV-B, HA ve UV-B+HA uygulamalarından önemli ölçüde etkilenmiştir. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi kontrol grubuna kıyasla HA I, HA II ve HA III uygulamaları ölçülen tüm antioksidan enzimlerin aktivitelerini önemli ölçüde artırırken, UV-B ile birlikte uygulanan farklı HA konsantrasyonları kontrole göre tüm enzimlerin aktivitelerini daha fazla artırmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında marul fidelerine tek başına uygulanan UV-B radyasyonu fidelerde ölçülen tüm antioksidan enzimlerin konsantrasyonlarını artırmıştır.



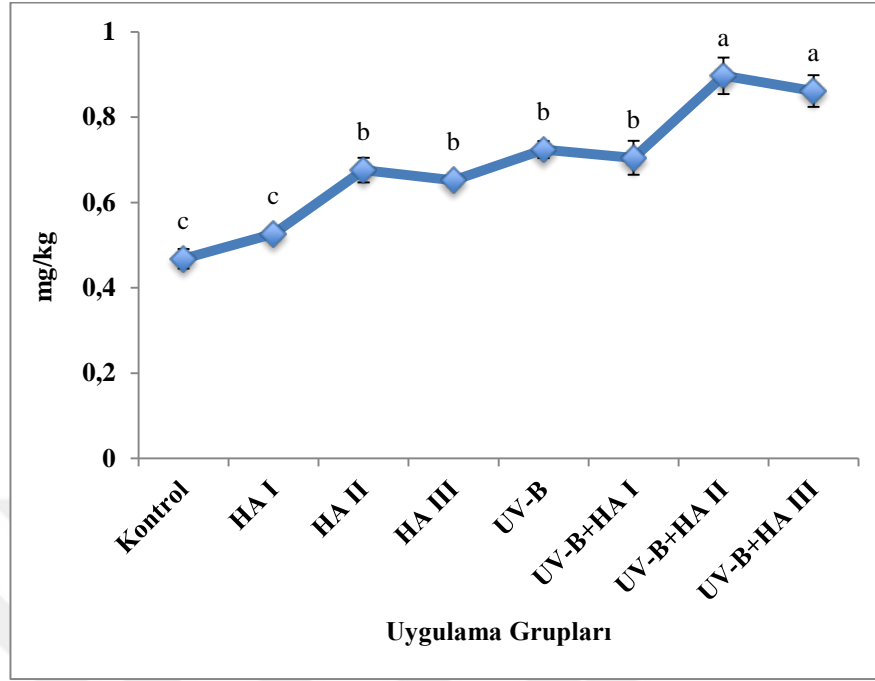
Şekil 4.6. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında SOD, CAT ve APX enzim aktivitelerindeki değişimler

#### 4.4. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda HA Uygulamalarının Marul Fidelerindeki Askorbik Asit ve Tokoferol Miktarı Üzerine Etkisi

Kontrol ile mukayese edildiğinde marul fidelerine uygulanan farklı dozlardaki HA konsantrasyonlarının askorbik asit ve tokoferol miktarını önemli oranda artırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.7, Şekil 4.8). Yine fidelere uygulanan UV-B bu vitaminlerin konsantrasyonlarında kontrole göre artış meydana getirmiştir. UV-B ile birlikte fidelere uygulanan farklı konsantrasyonlardaki HA ise askorbik asit ve tokoferol miktarını kontrole göre yaklaşık 2,5 kat artırmıştır.



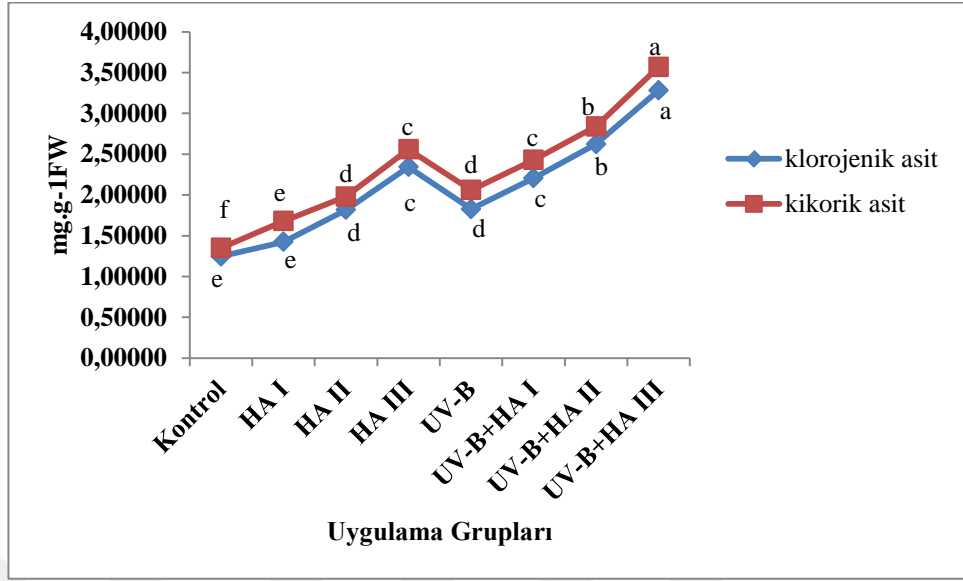
**Şekil 4.7.** HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında askorbik asit miktarı



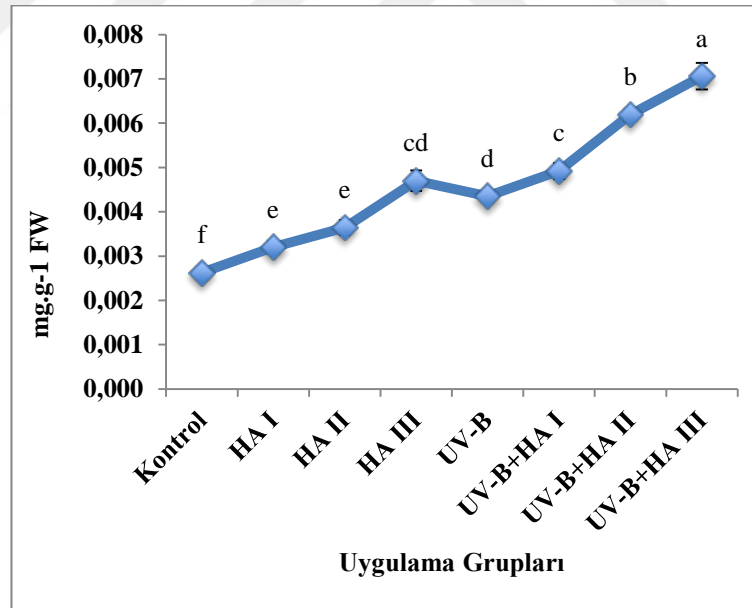
**Şekil 4.8.** HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında tokoferol miktarı

#### **4.5. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda HA Uygulamalarının Marul Fidelerindeki Bazı Fenolik Maddelerin Değişimi Üzerine Etkisi**

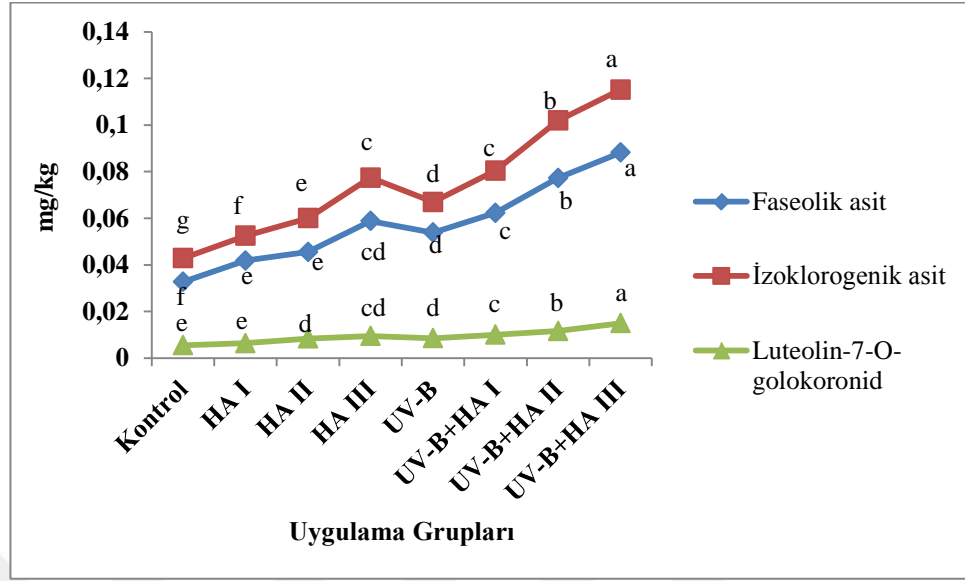
Kontrol ile kıyaslandığında marul fidelerine uygulanan UV-B ve farklı konsantrasyonlardaki HA Şekil 4.9-4.12’de verilen fenolik maddelerin konsantrasyonlarını önemli ölçüde artırmıştır. Örneğin fidelere uygulanan HA III+UV-B fenolik maddelerden klorojenik asit, izoklorojenik asit, kafeik asit, kikorik asit ve kuersetin-3-O glukronitin miktarlarını konrole göre yaklaşık 2 kat artırmıştır.



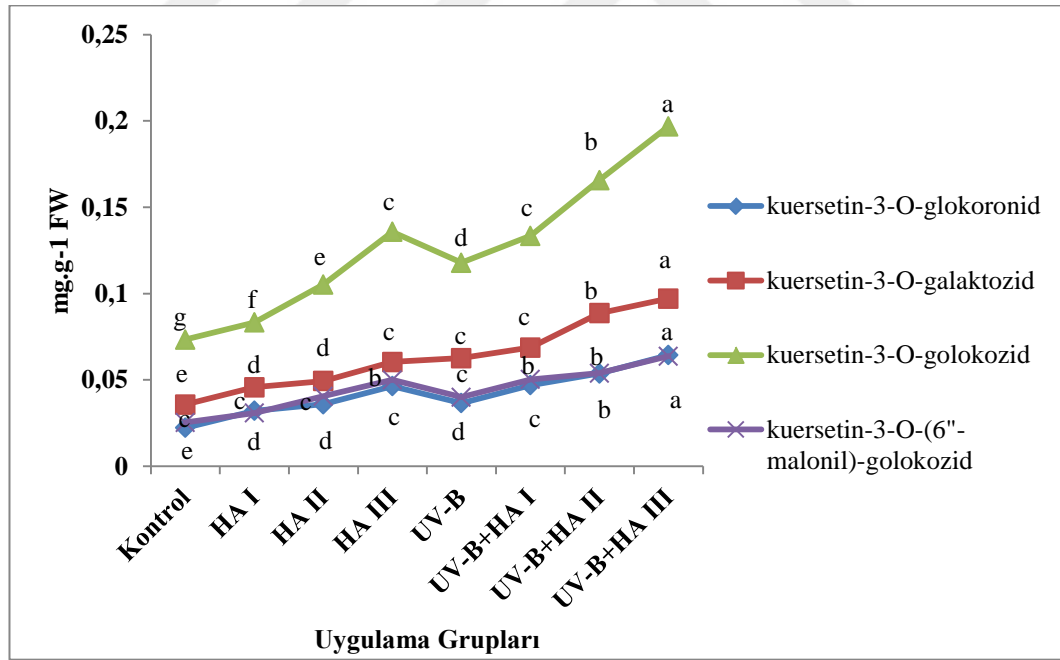
**Şekil 4.9.** HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında klorojenik ve kikorik asit miktarlarındaki değişim



**Şekil 4.10.** HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında kafeik asit miktarındaki değişim



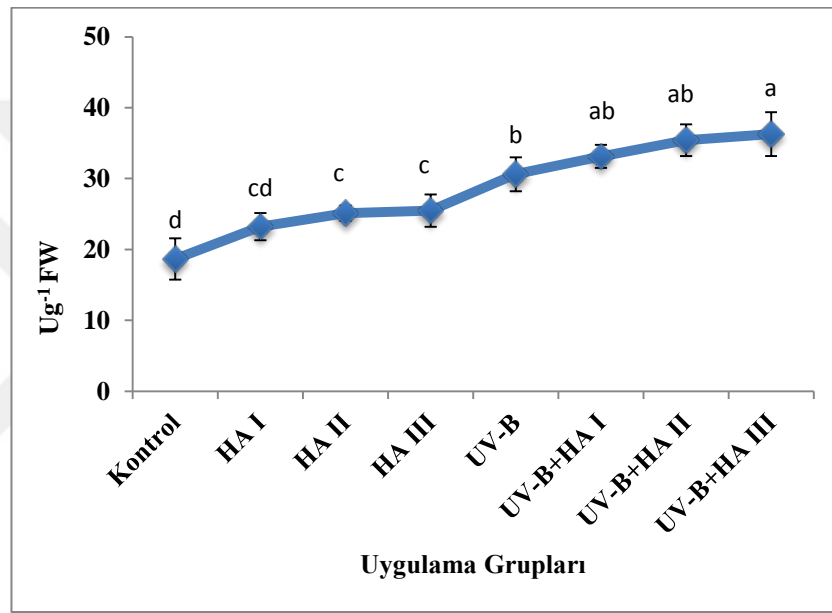
Şekil 4.11. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında bazı fenolik maddelerin miktarındaki değişim



Şekil 4.12. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında bazı fenolik maddelerin miktarındaki değişim

#### 4.6. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda HA Uygulamalarının Marul Fidelerindeki PAL Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

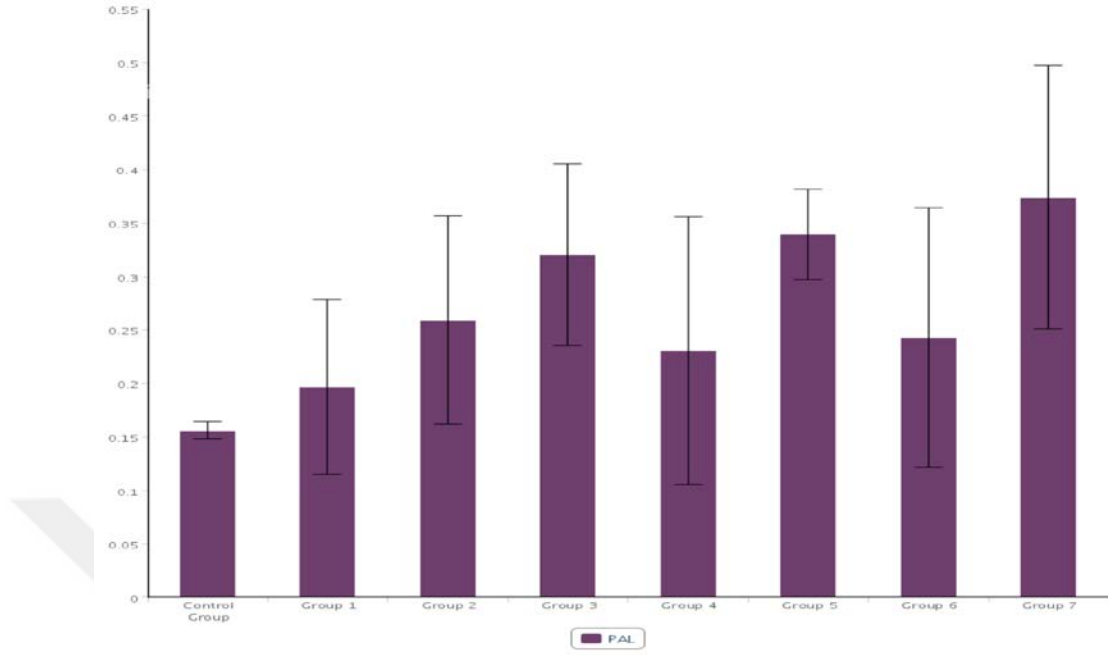
Marul fidelerine uygulanan UV-B ve HA PAL enzim aktivitesinde önemli oranda artış meydana getirmiştir (Şekil 4.13). UV-B ile birlikte yapaklara uygulanan HA III, PAL enzim aktivitesini kontrole göre yaklaşık 2 kat artırmıştır.



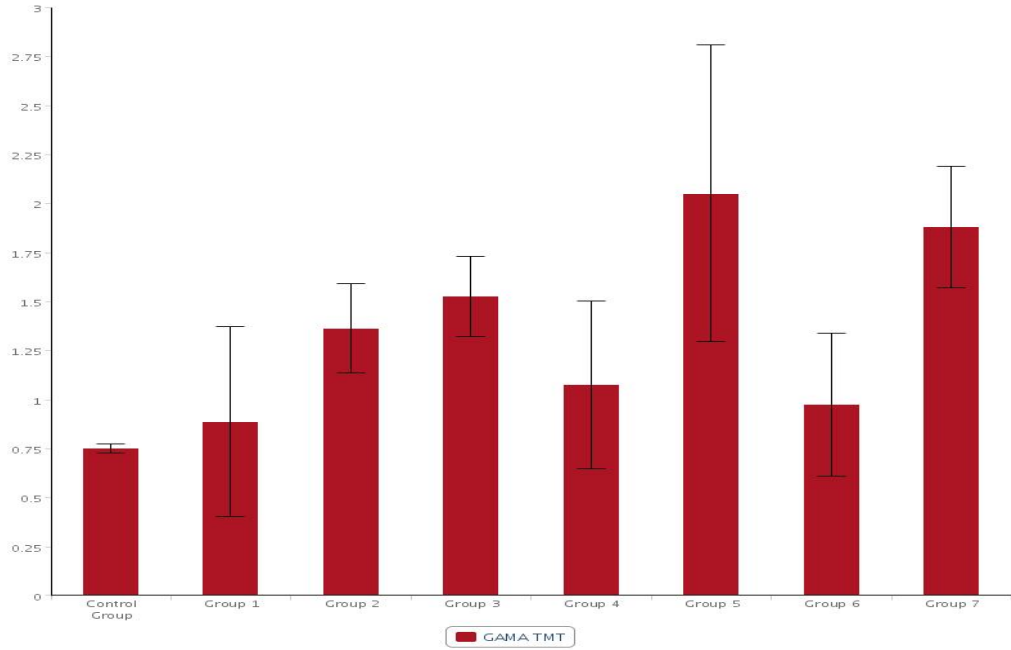
Şekil 4.13. HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında PAL enziminin aktivitesindeki değişim

#### 4.7. UV-B Radyasyonu ve Farklı Dozlarda HA Uygulamalarının Marul Fidelerindeki PAL ve $\gamma$ -TMT Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Kantitatif RT-PCR; marul yapraklarında fenolik bileşikler ve vitamin E'nin de aralarında bulunduğu antioksidanların biyosentez yollarının aktivasyon göstergesi olan fenil alanin amonyak liyaz (PAL) ve  $\gamma$ -tokoferol metiltransferaz ( $\gamma$ -TMT) gen ekspresyonunu ölçmek için kullanılmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında tek başına fidelere uygulanan UV-B yada HA, PAL ve  $\gamma$ -TMT mRNA ekspresyonunu önemli oranda artırmazken (Şekil 4.14-4.23) HA ve UV-B fidelere birlikte uygulandığı zaman her iki genin ekspresyonu önemli ölçüde artmıştır ( $p \leq 0.05$ ).

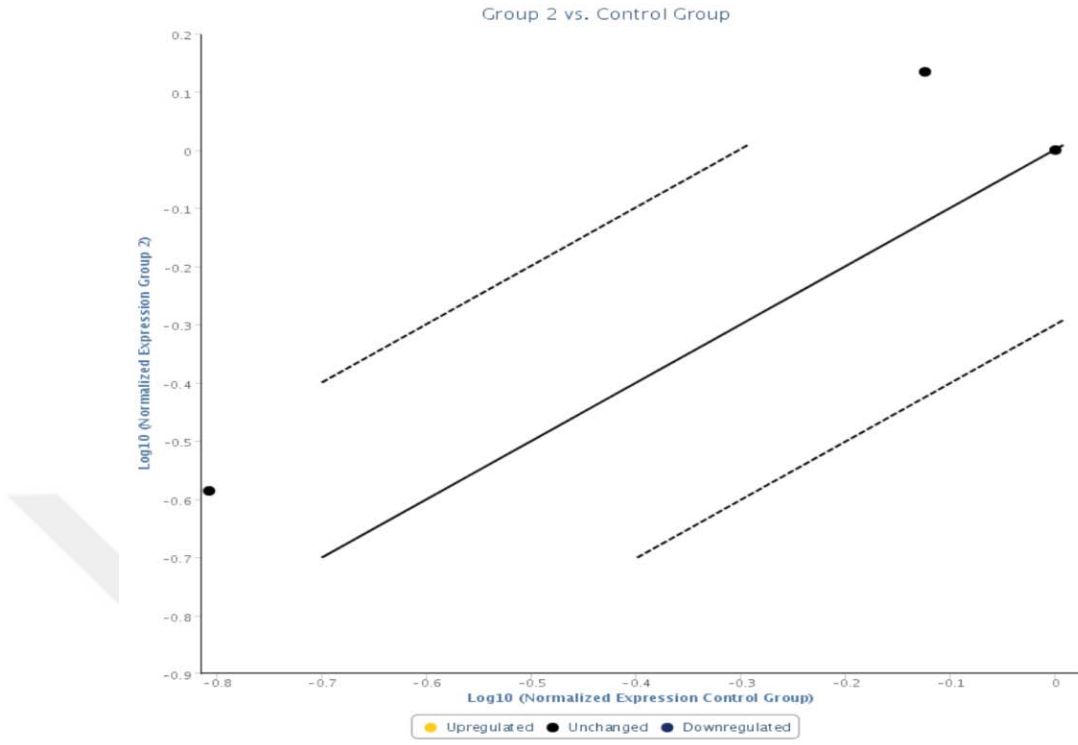


**Şekil 4.14.** HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında PAL geninin ifadesindeki değişim  
(Grup 1=HA I, Grup 2=UV-B, Grup 3=HA I+UV-B, Grup 4=HA II, Grp 5= HA II+UV-B, Grup 6=HA III, Grup 7= HA III+UV-B)

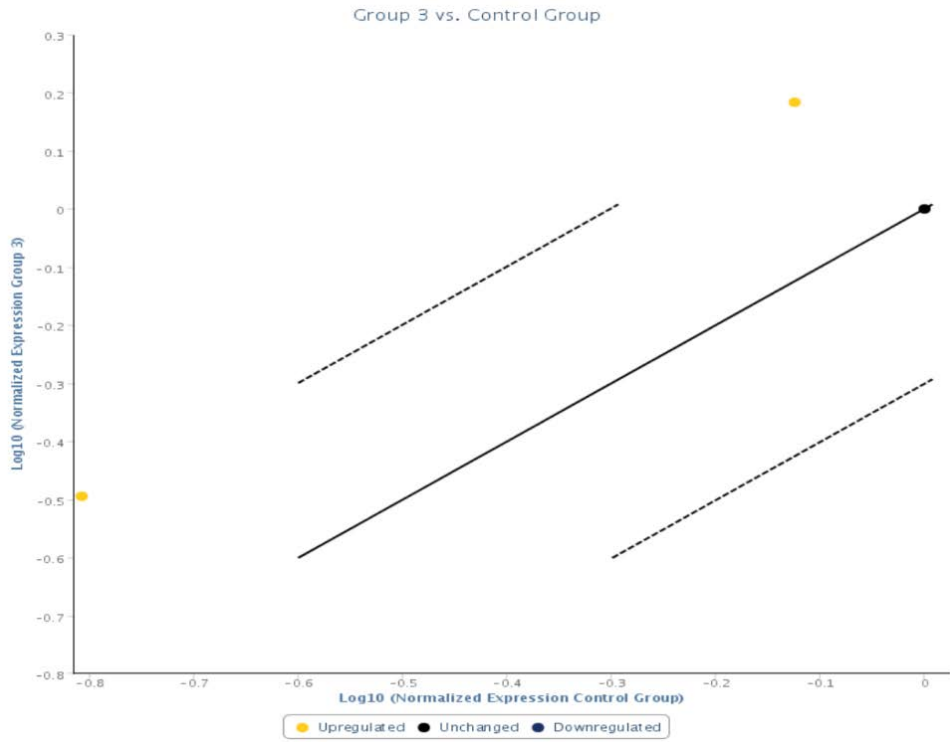


**Şekil 4.15.** HA ve UV-B uygulamasından sonra marul fidelerinin yapraklarında  $\gamma$ -TMT geninin ifadesindeki değişim  
(Grup 1=HA I, Grup 2=UV-B, Grup 3=HA I+UV-B, Grup 4=HA II, Grp 5= HA II+UV-B, Grup 6=HA III, Grup 7= HA III+UV-B)

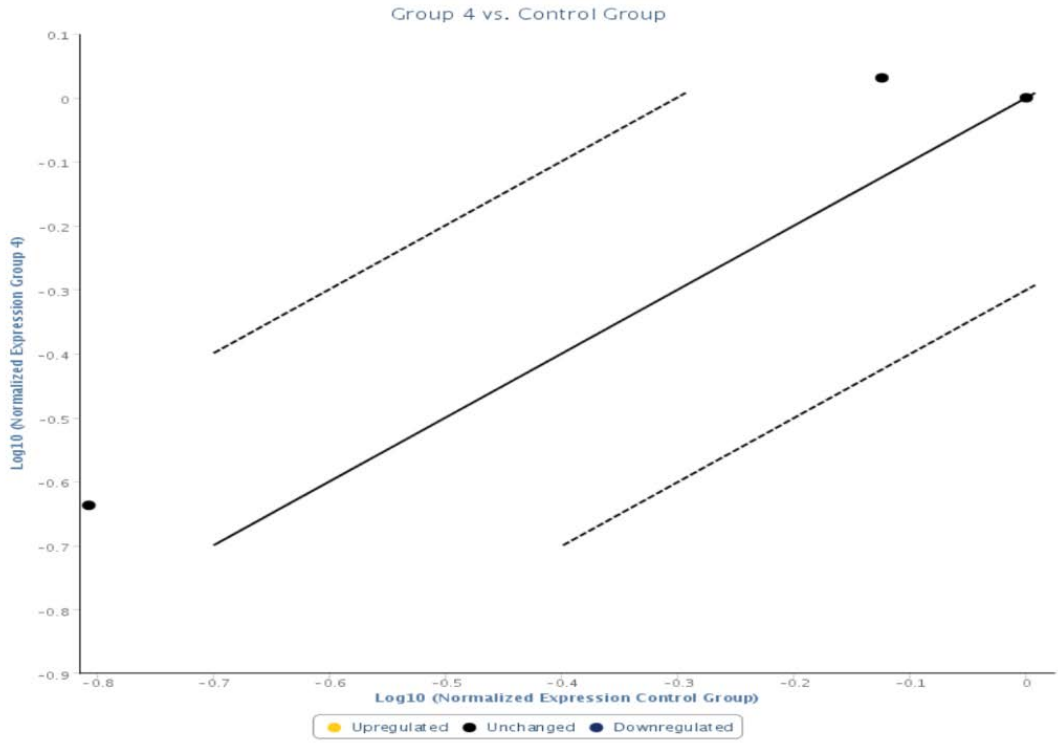




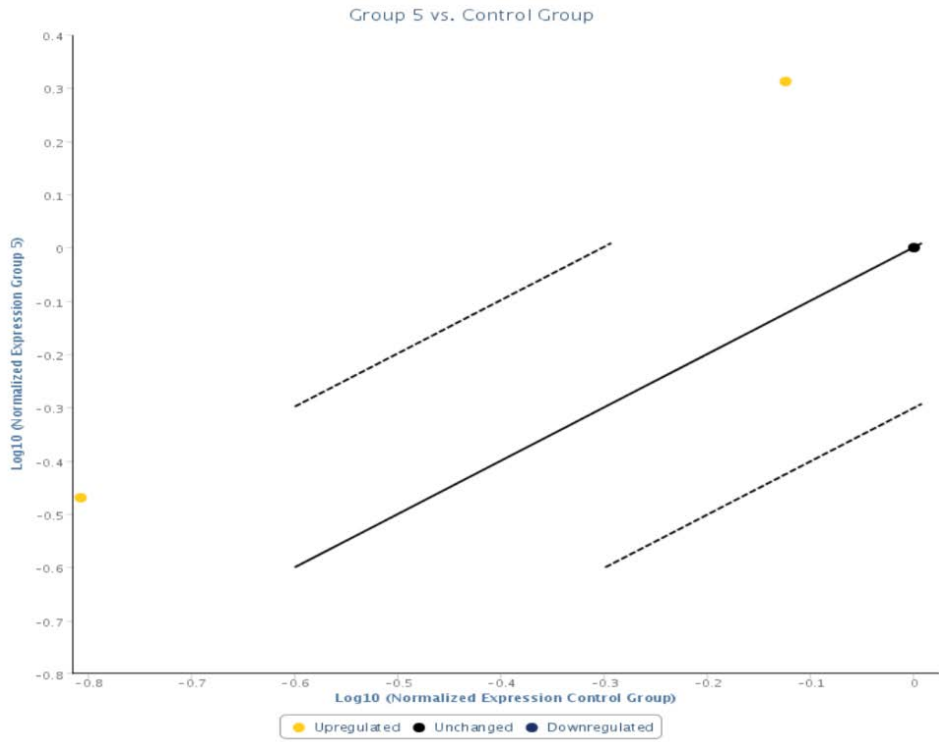
Şekil 4.18. Kontrol ve UV-B arasında PAL ve  $\gamma$ -TMT gen ekspresyonu değişimi



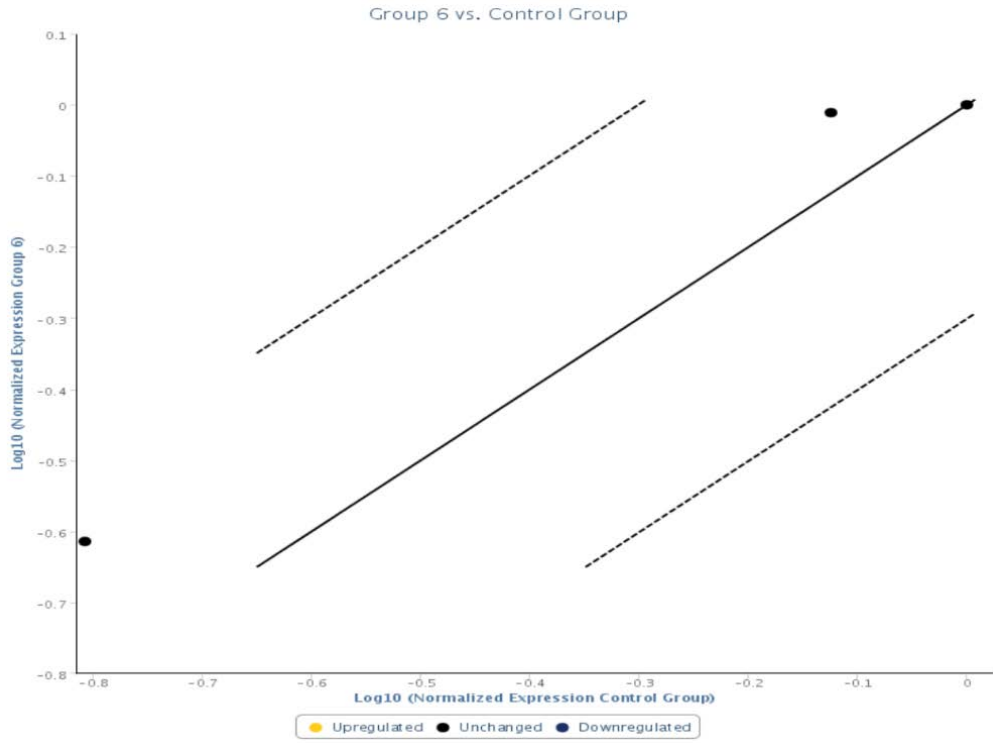
Şekil 4.19. Kontrol ve HA I+UV-B arasında PAL ve  $\gamma$ -TMT gen ekspresyonu değişimi



Şekil 4.20. Kontrol ve HA II arasında PAL ve  $\gamma$ -TMT gen ekspresyonu değişimi



Şekil 4.21. Kontrol ve HA II+UV-B arasında PAL ve  $\gamma$ -TMT gen ekspresyonu değişimi



Şekil 4.22. Kontrol ve HA III arasında PAL ve  $\gamma$ -TMT gen ekspresyonu değişimi



Şekil 4.23. Kontrol ve HA III+UV-B arasında PAL ve  $\gamma$ -TMT gen ekspresyonu değişimi

## 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. Öte yandan, lipid peroksidasyonu, hücre ve organel membranlarının fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna sebep olarak membranların lipid yapısını değiştiren, böylece hücrelerin yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır. Lipid peroksidasyonunun son ürünü MDA olduğu için MDA konsantrasyonunun ölçülmesi zarlardaki dönüşümsüz hasarın belirlenmesinde kullanılan iyi bir indikatördür. Araştırmamızda marul fidelerine uygulanan UV-B, yapraklardaki ROT ( $H_2O_2$  ve  $O_2^{\cdot-}$ ) ve MDA miktarını önemli ölçüde artırmıştır ( $p \leq 0.05$ ). UV-B stresi altındaki marul yapraklarında oluşan MDA miktarındaki artış, UV-B stresinden olumsuz olarak etkilenen solunum ve fotosentezdeki elektron taşıma sisteminde elektron kaçaklarının artması ve bunun sonucu oluşan ROT miktarındaki artışa bağlanabilir. Yapraklara UV-B uygulanmasından 30 gün önce uygulanan HA ROT türevleri ve MDA konsantrasyonlarında düşüşe neden olmuştur. Çalışmamız sonucunda elde edilen bu veriler UV-B veya diğer çevresel stres şartları altında marul yapraklarında belirlenen ve Santacruz *et al.* (2010), Tian and Lei (2007), Liu *et al.* (2012), Xu *et al.* (2014), tarafından rapor edilen verilerle örtüşmektedir. Yine Todorova *et al.* (2011), UV-B'nin tritikale bitkisinde MDA içeriğini önemli oranda artırdığını, bitkilere 3 gün önceden uygulanan HA'nın MDA miktarını önemli ölçüde azalttığını rapor etmiştir. Buna ilaveten Sarkar *et al.* (2011) HA'nın tuz stresi altındaki arpa yapraklarında ROT oluşumunu azalttığını kaydetmiştir. Yine Garcia *et al.* (2014) su stresi altındaki pirinç fidelerine dışardan uygulanan HA'nın ROT miktarını azalttığını bildirmiştir. 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 HA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub><sup>-</sup> birikimini azaltıp ve MDA miktarını düşürerek muhtemel hücre yapısını değiştirmekte ve oksidatif hasardan hücre membranlarını korumaktadır.

Çeşitli stres koşulları altında, bitkilerde enzimatik ve non-enzimatik moleküllerden oluşan antioksidan sistemin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Enzimatik savunma sistemi SOD, POD, APX, CAT ve GR gibi antioksidan enzimlerden oluşurken, enzimatik olmayan savunma sistemi askorbik asit, tokoferol, flavonoidler, karotenoidler, antosiyaninler gibi çeşitli bileşiklerden oluşur (Choi *et al.* 2002). Antioksidan enzimleri kodlayan genlerin transkripsiyonunda stres koşullarında artmaktadır. Stres koşullarında oluşan ROT'ne 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> demir ve bakır gibi metallerle reaksiyona girerek hücreler için çok daha zararlı olan •OH oluşumunu sağladığından hemen suya parçalanması gerekir. Bu nedenle SOD tarafından oluşturulan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antioksidan savunma hattının diğer enzimleri olan CAT ve APX tarafından suya detoksifiye edilir.

Çalışmamızda marul yapraklarına yalnız uygulanan 3.3 mV<sup>-2</sup> UV-B'nin SOD, APX, CAT aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir. Balakumar *et al.* (1997) UV-B radyasyonuna maruz kalan domateste katalaz aktivitesinin arttığını rapor etmiştir. Yine SOD ve APX gibi enzimlerin aktivitelerinde UV-B uygulamasına bağlı olarak artışın olduğu ayçiçeği (Yanarelli *et al.* 2006), salatalık (Rybus-Zajac and Kubis 2010) ve soya (Choudhary and Agrawal 2014) gibi bitkilerde gösterilmiştir. Antioksidan enzim miktarlarında UV-B uygulamasına bağlı artış ROT artışından kaynaklanmaktadır. Öte yandan kontrol grubu ile veya yalnız UV-B ile kıyaslandığında yapraklara UV-B uygulamasından 30 gün önce uygulanan HA'nın ölçülen antioksidan enzimlerin aktivitesini daha fazla artırdığı belirlenmiştir. Bir büyüme düzenleyicisi olarak farklı konsantrasyonlarda kullanılan HA'nın bitki büyümesini teşvik ettiği, hormon seviyesini düzenlediği ve strese toleransı artırdığı bir çok çalışmada rapor edilmiştir (Nardi *et al.* 2002; Cimrin *et al.* 2010; Garcia *et al.* 2014). HA uygulamasına bağlı olarak APX ve CAT aktivitesinde meydana gelen artışın hücrelerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesini azalttığı, kloroplast içerisinde Calvin döngüsünde yer

alan bazı enzimler  $H_2O_2$ 'ye son derece hassas olduğu için  $CO_2$  fiksasyonunu ve membranların stabilitesini artırdığı kaydedilmiştir (Lotfi *et al.* 2015). Yine bitkilere dışardan uygulanan HA'nın çeşitli stres koşulları altında antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığı rapor edilmiştir (Zhang *et al.* 2013; Lotfi *et al.* 2015). Örneğin Lotfi *et al.* (2015) su stresi altındaki *Brassica napus* yapraklarına uygulanan HA'nın yapraklardaki antioksidan enzimlerin miktarını önemli oranda artırdığını kaydetmiştir. Yine kuraklık stresi altındaki *Malus robusta* fidelerine uygulanan HA'nın antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı Zhang *et al.* (2013) tarafından bildirilmiştir.

Kontrol ile mukayese edildiğinde yalnız UV-B uygulaması askorbik asit, tokoferol, toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve antioksidan kapasiteyi önemli oranda artırmıştır. Yine klorojenik asit ve klorojenik asit gibi majör fenolik bileşiklerin yanı sıra kafeik asit, feroik asit, izoklorojenik asit, luteolin-7- glukronit, kuersetin-3-O glukronit, kuersetin-3-O-galaktozid, kuersetin-3-O-glukozid, kuersetin-3-O-(6" malonil) glukozid gibi minor fenolik bileşiklerin konsantrasyonları uygulanan UV-B ile artış göstermiştir. Marul yapraklarına UV-B ile birlikte uygulanan HA yapraklardaki askorbik asit, tokoferol, toplam fenolik madde, toplam flavonoid miktarını, antioksidan kapasiteyi ve ölçülen majör ve minör fenolik bileşiklerin konsantrasyonlarını tek başına UV-B uygulamasına göre daha çok artırmıştır. Bitki yapraklarına uygulanan HA'nın zeytin, buğday, mısır, papaya gibi bitkilerde gelişmeyi ve ürün verimini olumlu yönde etkilediği, klorofil içeriğini, fenolik madde miktarını, vitaminlerin konsantrasyonlarını, makro ve mikro elementlerin birikimini artırdığı bildirilmiştir (Jarosova *et al.* 2016). Yine tuz stresi altındaki arpa yapraklarında bazı fenolik maddelerin ve askorbik asit miktarının dışardan uygulanan HA ile arttığı Jarosova *et al.* (2016) tarafından kaydedilmiştir. Çalışmamızda askorbik asit, tokoferol, toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve antioksidan kapasite arasında pozitif bir korelasyon belirlenmiştir. Bitkiler UV-B radyasyonu tarafından oluşturulan oksidatif stresi hafifletmek için yapraklarında vitaminler, flavonoidler ve fenolik bileşikleri de içeren fitokimyasalların birikimini artırmaktadırlar. Bu bileşikler enzimatik olmayan antioksidanlardan olup ROT'ların süpürülmesinde görev alırlar. Örneğin askorbik asit bitkilerde ROT'lara bağlı olarak meydana gelen hasarın etkilerini en aza indirmede ve önlemede rol oynayan

hücrelerdeki en güçlü ve en bol bulunan antioksidandır.  $\alpha$  tokoferol ise koroplastlarda  $\gamma$ -tokoferolmetiltransferaz enzimi aracılığı ile  $\gamma$ -tokoferolden sentezlenen süperoksit radikali gibi ROT çeşitlerine karşı membran kararlılığının korunmasında kritik öneme sahip bir moleküldür. Bu bileşiklerden bazıları hücrelerde enzimlerin kofaktörü, hücre zarlarında ve kloroplastlarda elektron vericisi olarak da görev yaparlar. Chappel and Hahlbrock (1984) UV radyasyonuna karşı savunma mekanizması olarak bitkilerde fenolik bileşikler ve pigmentlerin birikiminin arttığını belirtmiştir. Cadwell and Britz (2006) UV-B'nin marul yapraklarında toplam fenolik madde ve toplam flavonid miktarını ve antioksidan kapasiteyi 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 ve toplam flavonoid miktarı ve antioksidan kapasitenin arttığını belirlemişlerdir. UV-B ve UV-B+HA uygulamasına bağlı olarak toplam fenolik madde, toplam flavonoid birikimi ve antioksidan kapasitedeki artış, fenolik maddelerin ve antioksidanların bitki hücrelerindeki muhtemel multifonksiyonel rollerine bağlanabilir. Fenolik maddeler ve flavonoidler 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 ve flavonoidler genellikle yaprakların epidermal bölgelerinde toplanır ve UV-B stresine karşı fotosentetik dokuları korur. UV-B radyasyonuna karşı fenolik madde artışı PAL aktivitesindeki artıştan kaynaklanabilir. Nitekim marul yapraklarına uygulanan UV-B ve UV-B+HA PAL enzim aktivitesinde önemli artışa neden olmuştur. Buğday (Kovacs *et al.* 2014) ve soya (Xu *et al.* 2008) yapraklarına uygulanan UV-B radyasyonunun PAL enzim aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir. 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 HA 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) 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.

## **Sonuçlar**

UV-B uygulamasıyla artan PAL ve  $\gamma$ -TMT genlerinin ifadesinin HA uygulamasıyla daha fazla artması, HA'nın 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 HA, UV-B ve HA+UV-B uygulanmış marul yapraklarında askorbik asit, tokoferol, toplam flavonoid miktarı, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasitenin artırması bitkinin strese tleransını artırmaya katkı sağlamıştır.

Zararlı reaktif oksijen türlerinden olan ve genelde stres şartlarında miktarları artan  $H_2O_2$  ve  $O_2^{\cdot-}$ 'nin UV-B etkisiyle miktarı artmıştır. HA uygulamasıyla ise bu reaktif oksijen türlerinin miktarları azalmıştır. Bu durumda HA'nın ROT oluşumunu azaltmak yoluyla UV-B'ye toleransı artırdığı söylenebilir. Yine, tüm stres koşullarında miktarı artan ve stresin bir olct olarak kullanılan lipid peroksidasyonun UV-B uygulamasıyla artması ve HA uygulaması ile miktarının düşmesi HA'nın UV-B stresinin yıkıcı etkisini düşürerek bitkinin stres şartlarına uyumunda etkili olduğu tezini desteklemektedir.

UV-B uygulamasıyla marul yapraklarında antioksidan enzim aktiviteleri artarken HA uygulaması ile bu enzimlerin aktiviteleri daha fazla artırmıştır. Bu sonuc yapraklara dışardan uygulanan HA'nın antioksidan enzimlerin artışını teşvik ederek oksidatif hasarın engellendiğini göstermesi açısından önemlidir.

Sonuc olarak HA uygulamasının marulda UV-B hasarını azaltarak bitkinin UV-B radyasyonuna uyumunu artırdığı söylenebilir.

**KAYNAKLAR**

- Abdulnabi, A.A, Emhemed, A.H, Hussein, G.D., and Biacs, P.A. 1997. Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. *Food Chemistry*, 60, 207-212.
- Agarwal, S., and Pandey, V. 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Journal of Plant Biology*, 48, 555- 560.
- Ajavon, A. N., Albritton, D. L., and Watson, R. T. 2007. Scientific assessment of ozone depletion: 2006. Global ozone research and monitoring project. Report No. 50. pp. 572. World Meteorological Organization (WMO), Geneva.
- Aksakal, Ö., 2013. Assessment of paraquat genotoxicity on barley (*Hordeum vulgare L.*) seedlings using molecular and biochemical parameters. *Acta Physiol Plant*, 35, 2281–2287.
- Aksakal, Ö., and Esim, N., 2015. Evaluation of arsenic trioxide genotoxicity in wheat seedlings using oxidative system and RAPD assays. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 7120–7128.
- Ambasht, N. K. and Agrawal, M. 2003. Effects of enhanced UV-B radiation and tropospheric ozone on physiological and biochemical characteristics of field grown wheat. *Biologia Plantarum*, 47(4), 625-628.
- Angelini, C., Amaroli, A., Falugi, C., Di Bella, G., and Matranga, V. 1990. Acetylcholinesterase activity is affected by stress conditions in *Paracentrotus lividus coelomocytes*. *Marine Biology*, 143, 623–628.
- Angelini, R., and Federico, R. 1989. Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *Journal of Plant Physiol*, 135, 212-217.
- Balakumar, T., Vincent, V.H.B., and Paliwal, K. 1997. On the interaction of UV-B radiation (280–315 nm) with water-stress in crop plants. *Plant Physiology*, 87, 217–222.
- Ballaré, C.L., Caldwell, M.M., Flint, S.D., Robinson, and A., Bornman, J.F. 2011. Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms and interactions with climate change, *Photochemical and Photobiological Sciences*, 10, 226–241.
- Bandurska, H., and Cieślak, M. 2012. The interactive effect of water deficit and UV-B radiation on salicylic acid accumulation in barley roots and leaves. *Environ. Exp. Bot.* 94 9–18 10.1016/j.envexpbot.2012.03.001.
- Bjorn, L. O., Callaghan, T. V., Gehrke, C., Johanson, U. and Sonesson, M. 1999. Ozone depletion, ultraviolet radiation and plant life. *Chemosphere*, 1, 449-454.
- Blaustein, A.R., Romansic, J.M., Kiesecker, J.M. and Hatch, A.C. 2013. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, 9, 123–140.
- Blumthaler, M., and Ambach, W. 1990. Indication of increasing solar ultraviolet-B radiation flux in alpine regions. *Science*, 248, 206-208.
- Caldwell, C.R., and Britz, S., 2006. Effect of supplemental ultraviolet radiation on the carotenoid and chlorophyll composition of green housegrown leaf lettuce (*Lactuca sativa L.*) cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 637-644.

- Caldwell, M.M., Bornman, J.F., Ballare, C.L., Flint, S.D., and Kulandaivelu, G. 2007. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochem and Photobiolog Sciences*, 6, 252–266.
- Caldwell, M.M., Teramura, A.H., and Tevini, M. 1989. The changing solar ultraviolet climate and the ecological consequences for higher plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 4, 363-367.
- Canellas, L.P., Teixeira Junior, L.R.L., Dobbss, L.B., Silva, C.A., Medici, L.O., Zandonadi, D.B. and Façanha, A.R., 2008. Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Annals of Applied Biology*, 153, 157-66.
- Carletti, P., Masi, A., Wonisch, A., Grill, D., Tausz, M. and Ferretti, M. 2003. Changes in antioxidant and pigment pool dimensions in UV-B irradiated maize seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 50, 149-157.
- Chappel, J., and K. Hahlbrock. 1984. Transcription of plant defense genes in response to UV-light or fungal elicitor. *Nature*. 311, 76-79.
- Cheng, F.J., Yang, D.Q., and Wu, Q.S., 1998. Physiological effects of humic acid on drought resistance of wheat, *Journal of Applied Ecology*, 6, 363–367.
- Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J. J., Goldberg, R. B., et al. 2002. Demeter, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *arabidopsis*. *Cell*. 110, 33–42. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00807-3.
- Choudhary, K.K., and Agrawal, S.B. 2014. Cultivar specificity of tropical mung bean (*Vigna radiata L.*) to elevated ultraviolet-B: Changes in antioxidative defence system, nitrogen metabolism and accumulation of jasmonic and salicylic acids. – *Environ. Journal of Experimental Botany*, 99, 122-132.
- Cimrin, K.M., Türkmen, O., Turan, M., and Tuncer, B. 2010. Phosphorus and humic acid application alleviate salinity stress of pepper seedlings. *African Journal of Biotechnology*, 9, 5845–5851.
- Costa, D., Galvao, A.M., Di Paolo, R.E., Freitas, A.A., Lima, J.C., Quina, F.H., and Macanita, A.L., 2015. Photochemistry of the hemiketal form of anthocyanins and its potential role in plant protection from UV-B radiation. *Tetrahedron*, 71, 3157e3162.
- Dawar, S., Vani, T. and Singhal, G. S. 1998. Stimulation of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in thylakoid membranes of wheat. *Biologia Plantarum*, 41(1), 65-73.
- DeLong, J. M. and Steffen, K. L. 1998. Lipid peroxidation and  $\alpha$ -tocopherol content in  $\alpha$ -tocopherol-supplemented thylakoid membranes. *Environmental and Experimental Botany*, 39, 177-185.
- Du, X., Plotto, A., Song, M., Olmstead, J., and Rouseff, R. 2011. Volatile composition of four southern highbush blueberry cultivars and effect of growing location and harvest date. *Journal Agric. Food Chemistry*. 598347–8357. 10.1021/jf201184m.
- El Nemr, M.A., El Desuki, M., El Bassiony, A.M., and Fawzy, Z.F. 2012. Response of growth and yield of cucumber plants (*Cucumis sativus L.*) to different foliar applications of humic acid and biostimulators, *Aust. Journal of Basic and Applied Sciences*, 6, 630–637.

- Elstner, E.F., and Heupel, A. 1976. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium 20 choride: a simple assay for superoxide dismutase. *Analytical Biochemistry*, 70, 616-620.
- Esringu, A., Aksakal, Ö., Tabay, D., and Kara, A.A., 2016. Effects of sodium nitroprusside (SNP) pretreatment on UV-B stress tolerance in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 589–597.
- Eyheraguibel, B., Silvestre, J. and Morard, P., 2008. Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresource Technology*, 99, 4206-4212.
- Fang, J.Y., Wan, X.C., and Ma, X.L. 2011. Nanoscale silicas in *Oryza sativa* L. and their UV absorption. *Spectroscopy Spectral Anal*, 26, 2315–2318.
- Frohnmeier, H., and Staiger, D., 2003. Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants, Balancing Damage and Protection. *Plant Physiology*, 133, 1420-1428.
- Galleano, M., Verstraeten, S. V., Oteiza, P. I. and Fraga, C. G. 2010. Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 23-30.
- Gao, Q. and Zhang, L. 2008. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate deficient *vtc1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 165, 138-148.
- Garcia, T. S., Romansic, J. M., and Blaustein, A. R. 2014. Survival of three species of anuran metamorphs exposed to UV-B radiation and the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 72, 163–169, <http://dx.doi.org/10.3354/dao072163>.
- García-Macías, P., Ordidge, M., Vysini, E., Waroonphan, S., Battey, N.H., Gordon, M.H., Hadley, P., John, P., Lovegrove, J.A., and Wagstaffe, A. 2007. Changes in the flavonoid and phenolic acid contents and antioxidant activity of red leaf lettuce (*Lollo Rosso*) due to cultivation under plastic films varying in ultraviolet transparency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 10168-10172.
- Garg, N., and Manchanda, G. 2009. ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosystems*, 143(1), 81-96.
- Gill, S. S., and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- Glas, A. F., Kaya, E., Schneider, S., Heil, K., Fazio, D., Maul, M. J. and Carell, T. 2010. DNA (6-4) photolyases reduce dimer isomers for isomerization into (6-4) lesions. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 3254-3255.
- Han, C., Liu, Q. and Yang, Y. 2009. Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. *Plant Growth Regulation*, 58, 153-162.
- Harbaum-Piayda, B., Palani, K., and Schwarz, K., 2016. Influence of postharvest UV-B treatment and fermentation on secondary plant compounds in white cabbage leaves. *Food Chemistry*, 197, 47–56
- Hectors, K., Prinsen, E., De Coen, W., Jansen, M.A.K., and Guisez, Y. 2007. *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of UV B radiation show specific changes in morphology and gene expression in the absence of stress symptoms, *New Phytologist*, 175, 255–270.

- Hernandez, J. A., Pellicer, S., Huang, L., Peleato, M. L., and Fillat, M. F. 2007. Fura modulates gene expression of *alr3808*, a DpsA homologue in *Nostoc (Anabaena)* sp. PCC7120. *FebsLett.* 581:1351–1356. doi: 10.1016/j.febslet.2007.02.053.
- Hideg, E., Jansen, M.A.K., and Strid, A., 2013. UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Journal of Cell*, 18, 21-29.
- Hideg, E., Mano, J., Ohno, C. and Asada, K. 1997. Increased levels of monodehydroascorbate radical in UV-B-irradiated broad bean leaves. *Plant and Cell Physiology*, 38(6), 684-690.
- Hollosy, F., 2002. Effects of ultraviolet radiations on plant cells. *Micron* 33.
- Jain, K., Kataria, S. and Guruprasad, K. N. 2003. Changes in antioxidant defenses of cucumber cotyledons in response to UV-B and to the free radical generating compound AAPH. *Plant Science*, 165, 551-557.
- Jansen, M. A. K., Gaba, V. and Greenberg, B. M. 1998. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science*, 3(4), 131-135.
- Jansen, M. A. K., Hectors, K., O'Brien, N. M., Guisez, Y. and Potters, G. 2008. Plant stress and human health: do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Science*, 175(4), 449-458.
- Jenkins, G.I. 2009. Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 407-31.
- Jiang, L., Wang, Y., Björn, L.O., and Li, S. 2011. UV-B-induced DNA damage mediates expression changes of cell cycle regulatory genes in *Arabidopsis* root tips. *Planta*, 233, 831–41. doi: 10.1007/s00425-010-1340-5.
- Jiao, C., Yang, R., Zhou, Y., and Gu, Z., 2016. Nitric oxide mediates isoflavone accumulation and the antioxidant system enhancement in soybean sprouts. *Food Chemistry*, 204, 373–380.
- Kakani, V.G., Reddy, K.R., Zhao, D., and Sailaja, K. 2003. Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agricultural and Forest Meteorology*, 120, 191–218.
- Kataria, T., Showman, A. P., Fortney, J. J., Marley, M. S., and Freedman, R. S. 2014. The atmospheric circulation of the super earth GJ 1214b. dependence on composition and metallicity. *The Astrophysical Journal*, 785, 92.
- Koubouris, GC., Kavroulakis, N., Metzidakis, IT., and Sofo, A., 2015. Ultraviolet-B radiation or heat cause changes in photosynthesis, antioxidant enzyme activities and pollen performance in olive tree. *Photosynthetica*, 53, 279-87.
- Kovacs, V., Gondor, O. K., Szalai, G., Majlath, I., Janda, T., and Pal, M., 2014. UV-B radiation modifies the acclimation processes to drought or cadmium in wheat. *Environmental and Experimental Botany*, 100, 122-131.
- Krupa, S.V. and Kickert, R.N., 1989. The Greenhouse effect: impacts of ultraviolet-B (UV-B) radiation, carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), and ozone (O<sub>3</sub>) on vegetation. *Environ Pollut*, 61, 263-393.
- Lee, C. W., Ko, H. H., Lin, C. C., Chai, C. Y., Chen, W. T. and Yen, F. L. 2013. Artocarpin attenuates ultraviolet B-induced skin damage in hairless mice by antioxidant and anti-inflammatory effect. *Food Chem. Toxicology*, 60, 123-129.

- Lee, E. J., Kim, J. S., Kim, H. P., Lee J. and Kang, S. S. 2000. Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities. *Food Chemistry*, 120, 134-139.
- Lee, J., Ye, L., Landen Jr., W.O., Eitenmiller, R.R., 2000. Optimization of an extraction procedure for the quantification of vitamin E in tomato and broccoli using response surface methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 45-57.
- Li, H., Wang, G., Liu, Sh., An, Q., Zheng, Q., Li, B., and Li, Z., 2014. Comparative changes in the antioxidant system in the flag leaf of early and normally senescing near-isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 33, 1109-1120.
- Li, J., Yang, L., Jin, D., Nezames, C.D., Terzaghi, W., and Deng, X.W. 2013. UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis*, *Protein Cell* 4, 485-492.
- Lidon, F.J.C., Reboredo, F.H., Leitão, A.E., Silva, M.M.A., Duarte, M.P., and Ramalho, J.C. 2012. Impact of UV-B radiation on photosynthesis – an overview, *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24, 546-556.
- Liu, B., Liu, X. B., Li, Y. S., and Herbert, S. J. 2012. Effects of enhanced UV-B radiation on seed growth characteristics and yield components in soybean. *Field Crops Res.* 154 158-163. 10.1016/j.fcr.2013.08.006.
- Liu, M., Li, X., Liu, Y., Shi, Y., and Ma, X., 2015. Analysis of differentially expressed genes under UV-B radiation in the desert plant *Reaumuria soongorica*. *Journal of Gene*, 574, 265-272.
- Lotfi, R., Gharavi Kouchebagh, P. and Khoshvaghti H. 2015. Biochemical and physiological responses of *Brassica napus* plants to humic acid under water stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62, 480-486.
- Mahdavian, K., Ghorbanli, M., Kalantari, and Kh. M., 2008. Role of salicylic acid in regulating ultraviolet radiation-Induced oxidative stress in pepper leaves. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55, 560-563.
- McKenzie, R.L., Aucamp, P.J., Bais, A.F., Björn, L.O., Ilyas, M., and Madronich, S. 2011. Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 10, 182-198.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.
- Morita, S., Kaminaka, H., Masumura, T. and Tanaka, K. 1999. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling. *Plant and Cell Physiology*, 40(4), 417-422.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., and Vianello, A. 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 1527-1536.
- Nicolle, C., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J., Rock, E., Michel, H., Amouroux, P., Remesy, C., 2004. Characterization and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa folium*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 2061-2069.
- Oh, M., Carey, E., Rajashekar, C.B., 2010. Regulated water deficits improve phytochemical concentration in lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135, 223-229.

- Ordidge, M., Garcia-Macias, P., Battey, N. H., Gordon, M. H., Hadley, P., John, P., Lovegrove, J. A., Vysini, E. and Wagstaffe, A. 2010. Phenolic contents of lettuce, strawberry, raspberry, and blueberry crops cultivated under plastic films varying in ultraviolet transparency. *Food Chemistry*, 119(3), 1224-1227.
- Ormord, D. P., and Hale, B. A. 1995. Physiological response of plants and crops to ultraviolet-B radiation stress. In: M. Pessarakli (Ed.). pp. 761-770. *Handbook of plant and crop physiology*. Marcel Dekker Inc. N.Y.
- Öztürk, Sarıkaya, S.B., 2009. Bazı fenolik asitlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Pandey, M., Srivastava, A.K., Suprasanna, P., and D'Souza, S.F. 2012. Thiourea mediates alleviation of UV-B stress-induced damage in the Indian mustard (*Brassica juncea L.*). *Journal of Plant Physiology*, 7, 143–150.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Pratap Singh, V., and Mohan Prasad, Sh., 2015. Changing scenario in plant UV-B research:UV-B from a generic stressor to a specific regülatör. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 153, 334–343.
- Paul, W., Barnes Mark A., Tobler K., Ken Keefover, R., Stephan, D. F., Anne, E., Barkley, R.J., Rye, and Richard, L. L. 2015. Rapid modulation of ultraviolet shielding in plants is influenced by solar ultraviolet radiation and linked to alterations in flavonoids. *Plant, Cell and Environment*. doi: 10.1111/pce.12609.
- Pekker, I., Tel-Or, E. & Mittler, R. 2002. Reactive oxygen intermediates and glutathione regulate the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during iron-mediated oxidative stress in bean. *Plant Molecular Biology*, 49(5), 429-438.
- Poiroux-Gonord, F., Bidel, L. P. R., Fanciullino, A. L., Gautier, H., Lauri-Lopez, F. and Urban, L. 2010. Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12065-12082.
- Ramos, S.J., Rutzke, M.A., Hayes, R.J., Faquin, V., Guilherme, L.R.G., and Li, L., 2011. Selenium accumulation in lettuce germplasm. *Planta*, 233, 649-660.
- Rastghalam, Z.S., Hoodaji, M., and Javanmard, H., 2011. The influence of humic acid and nano-superabsorbent application on the growth of *brassica napus* l. in lead-contaminated soil, International Conference on Environmental and Agriculture Engineering, 29th to 31st July 2011, Chengdu, China.
- Rybus-Zajac, M., and Kubiś, J. 2010. Effect of UV-B radiation on antioxidative enzyme activity in cucumber cotyledons. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 52, 97–102.
- Santa-Cruz, D. M., Pacienza, N. A., Polizio, A. H., Balestrasse, K. B., Tomaro, M. L., and 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. 10.1016/j.phytochem.2010.07.009.
- Santos, I., Fidalgo, F., Almeida, J. M. and Salema, R. 2004. Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. *Plant Science*, 925-935.

- Sarkar, D., Bhowmik, P.C., Kwon, Y.I., and K. Shetty. 2011. The role of proline-associated pentose phosphate pathway in cool-season turfgrasses after UV-B exposure. *Environmental and Experimental Botany*, 70, 251-258.
- Selvakumar, V. 2008. Ultraviolet-B radiation (280-315 nm) invoked antioxidant defence systems in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Crotalaria juncea* L. *Photosynthetica*, 46(1), 98-106.
- Sicora, C., Szilard, A., Sass, L., Turcsanyi, E., Mate, Z. and Vass, I. 2006. UV-B and UV-A radiation effects on photosynthesis at the molecular level. In *Environmental UV Radiation: Impact on Ecosystems and Human Health and Predictive Models*, 57, 121-135 (Eds F. Ghetti, G. Checcucci and J. F. Bornman).
- Silva-Matos, R.R.S., Cavalcante, I.H.L., Junior, G.B.S., Albano, F.G., Cünha, M.S., and Beckmann-Cavalcante, M.Z., 2012. Foliar Spray of humic substances on seedling production of watermelon cv. Crimson Sweet. *Journal of Agronomy*, 11, 60-64.
- Takshak, S., and Agrawal, S.B., 2015. Defence strategies adopted by the medicinal plant *Coleus forskohlii* against supplemental ultraviolet-B radiation: Augmentation of secondary metabolites and antioxidants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 97, 124e138.
- Tevini, M., and Steinmuller, D. 1987. Influence of light, UV-B radiation, and herbicides on wax biosynthesis of cucumber seedlings. *Journal of Plant Physiol*, 131, 111-121.
- 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. *Russ. Journal of Plant Physiol*, 54, 676-682.
- Tiffany, S., Garcia, J.C., Rowe James, B., Doyle. 2015. A tad too high: Sensitivity to UV-B radiation may limit invasion potential of American bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) in the Pacific Northwest invasion range. *Aquatic Invasions*, 10(2), 237-247.
- Todorova, D., Sergiev, I., and Alexieva, V. 2012. Application of natural and synthetic polyamines as growth regulators to improve the freezing tolerance of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Agron Hung*, 60, 1-10.
- Todorova, D., Sergiev, I., Moskova, I., Katerova, Z., Georgieva, N., Alexieva, V., Brambilla, I., Mapelli, S., 2014. Biochemical responses of triticale plants treated with UV-B irradiation and nutrient solution enriched with humic acids. *Turkish Journal of Botany*, 38, 747-753.
- Topcu, Y., Dogan, Dogan., Kasimoglu, Z., Sahin-Nadeem, H., Polat, E., Erkan, M., 2015. The effects of UV radiation during the vegetative period on antioxidant compounds and postharvest quality of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 93, 56e65.
- 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 Environ*, 34, 909-921
- Tossi, V., Cassia, R., Bruzzone, S., Zocchi, E., Lamattina, L. 2012. ABA says NO to UV-B: a universal response? *Trends Plant Science* 17, 510-517
- Tsormpatsidis, E., Henbest, R.G.C., Battey, N.H., and Hadley, P., 2010. The influence of ultraviolet radiation on growth, photosynthesis and phenolic levels of green

- and red lettuce: potential for exploiting effects of ultraviolet radiation in a production system. *Annals of Applied Biology*, 156, 357-366.
- Ulm, R., and Nagy, F. 2005. Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(5), 477-482.
- Van Breusegem, F., Bailey-Serres, J. and Mittler, R. 2008. Unraveling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants. *Plant Physiology*, 147(3), 978-984.
- Velikova, V., Yordanov, I., and Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain treated bean plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.*, 151, 59-66.
- Wu, H. Y., Abasova, L., Cheregi, O., Deak, Z., Gao, K. S. and Vass, I. 2011. D1 protein turnover is involved in protection of Photosystem II against UV-B induced damage in the cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 104(1-2), 320-325.
- Xu, C., S. Natarajan and J. H. Sullivan. 2008. Impact of solar ultraviolet-B radiation on the antioxidant defense system in soybean lines differing in flavonoid contents. *Environ. Environmental and Experimental Botany*, 63, 39-48.
- Xu, F., Cao, S., Shi, L., Chen, W., Su, X., and Yang, Z. 2014. Blue light irradiation affects anthocyanin content and enzyme activities involved in postharvest strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4778–4783 10.1021/jf501120u.
- Yang, S.H., Wang, L.J., Li, S.H., Duan, W., Leoscher, W. and Liang, Z.-C. 2007b. The effects of UV-B on photosynthesis in relation to Photosystem II phytochemistry, thermal dissipation and antioxidant defenses in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings at different growth temperatures. *Functional Plant Biology*, 34, 907-917.
- Yannarelli, G.G., Gallego, S.M., and Tomaro, M.L., 2006. Effect of UVB radiation on the activity and isoforms of enzymes with peroxidase activity in sunflower cotyledons. *Environmental and Experimental Botany*, 56, 174–180.
- Yao, X.Q., and Liu, Q. 2011. Changes in photosynthesis and antioxidant defenses of *Picea asperata* seedlings to enhanced ultraviolet-B and to nitrogen supply. *Physiol. Plantarum*, 129, 364–374.
- Yao, Y., Danna, C. H., Zemp, F. J., Titov, V., Ciftci, O. N., Przybylski, R., et al. 2011. UV-C-irradiated *Arabidopsis* and tobacco emit volatiles that trigger genomic instability in neighboring plants. *Plant Cell* 23 3842–3852 10.1105/tpc.111.089003.
- Yokawa, K., and Baluska, F., 2015. Pectins, ROS homeostasis and UV-B responses in plant roots. *Phytochemistry*, 112, 80–83.
- Zancan, S., Suglia, I., La Rocca, N. and Ghisi, R. 2008. Effects of UV-B radiation on antioxidant parameters of iron-deficient barley plants. *Environmental and Experimental Botany*, 63, 71-79.
- Zhang, C.L., Li P.H., and Bremner M.L. 1986. Relationship between mefluididetreatment and abscisic acid metabolism in chilled corn leaves. *Plant Physiol*, 81, 699-701.
- Zhang, M., An, L., Feng, H., Chen, T., Chen, K., Liu, Y., Tang, H., Chang, J., and Wang, X. 2013. The cascade mechanisms of nitric oxide as a second messenger

- of ultraviolet B in inhibiting mesocotyl elongations. *Journal of Photochem*, 77, 219– 225.
- Zhang, X., and Ervin, E.H. 2004. Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. *Crop Science*, 44, 1737-1745.
- Zhao, C., Mao, K., You, C.X., Zhao, X.Y., Wang, S.H., Li, Y.Y., and Hao, Y.J., 2016. Molecular cloning and functional analysis of a UV-B photoreceptor gene, MdUVR8 (UV Resistance Locus 8), from apple. *Plant Science*, 247, 115–126.
- Zhao, D., Reddy, K.R., Kakani, V.G., Read, J., and Sullivan, J.H. 2012. Growth and physiological response cotton (*Gossypium hirsutum*) to elevated carbon dioxide and ultraviolet-B radiation under controlled environmental conditions. *Plant Cell Environ*, 26, 771-782. DOI: 10.1046/j.1365- 3040.2003.01019.x.
- Zlatev, Z.S., Lidon, F.J.C., and Kaimakanova, M. 2012. Plant physiological responses to UV-B radiation. *Emir J Food Agricult*, 24(6), 481–501. doi:10.9755/ejfa.v24i6.14669.

## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında İranda, Ardabil şehrin’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ardabil’de tamamladı. 2005-2009 yıllar arasında lisans eğitimini bitirdi. 2014 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı olarak Moleküler Biyoloji anabilim dalında başladığı yüksek lisans eğitimini 2017 yılında tamamladı.

