

**ETİYOLE FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.)  
FİDELERİNDE ANTİOKSİDAN ENZİM  
AKTİVİTELERİNİN ve TOTAL FENOLİK  
BİLEŞİKLERİN İNCELENMESİ**

**Bülent AKGÜL**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**  
**Doç. Dr. Lokman ÖZTÜRK**  
**2010**

**Her hakkı saklıdır**

T.C.  
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ETİYOLE FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) FİDELERİNDE ANTİOKSİDAN  
ENZİM AKTİVİTELERİNİN ve TOTAL FENOLİK BİLEŞİKLERİN İNCELENMESİ**

**Bülent AKGÜL**

TOKAT  
2010

Her hakkı saklıdır

Doç.Dr lokman ÖZTÜRK danışmanlığında, Bülent AKGÜL tarafından hazırlanan bu çalışma 12/02/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. İsa GÖKÇE

İmza :

Üye : Doç. Dr. Necmettin YILMAZ

İmza:

Üye : Danışman Doç. Dr. Lokman ÖZTÜRK

İmza :

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

.....

**Enstitü Müdürü**

.../.../...

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ETİYOLE FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) FİDELERİNDE ANTiOKSiDAN ENZİM AKTİVİTELERİNİN ve TOTAL FENOLİK BİLEŞİKLERİN İNCELENMESİ

Bülent AKGÜL

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

Danışman: Doç. Dr. Lokman ÖZTÜRK

Bu çalışmada, etiyole fasulye fidelerinde antioksidan enzim aktiviteleri, hidrojen peroksit, malondialdehit ve total fenolik madde miktarları araştırılmıştır. Etiyole fidelerde antioksidan enzim aktiviteleri, hidrojen peroksit, malondialdehit ve prolin miktarı kontrol ve de-etiyole fidelere göre daha çok artmıştır. Total fenolik bileşikler kontrol ve de-etiyole bitkilerde yüksek oranda gözlenirken etiyole fidelerde belirlenememiştir. Işığın fenolik bileşik sentezini artırdığı gözlenmiştir.

2010, 42 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan enzimler, etiolasyon, fasulye, fenolik bileşikler

## **ABSTRACT**

**Ms Thesis**

### **INVESTIGATIONS OF ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY AND TOTAL FENOLIC COMPOUND IN SEEDLINGS OF ETIOLATED BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)**

**Bülent AKGÜL**

**Gaziosmanpasa Universty  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK**

In this study, the antioxidant enzyme activities and the amounts of hydrogen peroxide, malondialdehyde and total phenolic compounds in seedlings of bean were investigated. It was seen that the antioxidant enzyme activities, hydrogen peroxide, malondialdehyde, and proline contents in etiolated seedlings were increased more than both the control and de-etiolated seedlings. Total fenolic compounds were not determined in etiolated seedlings although they were found in both control and de-etiolated seedlings. It was observed that the light increased the synthesis of fenolic compounds in bean seedlings.

2010, 42 pages

**Keywords:** Antioxidant enzymes, bean, etiolation, fenolic compounds

## **TEŞEKKÜR**

Tez konusunun seçiminde ve bütün çalışmalarında her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Lokman ÖZTÜRK'e, deneyler sırasında desteklerini esirgemeyen yüksek lisans öğrencileri Dursun KISA ve İbrahim TETİKTABANLAR'a, benimle beraber bütün sıkıntılara ortak olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## **TEZ BEYANI**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdığı yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan beyan ederim.

Bülent AKGÜL

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                     |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET.....                                                                           | i    |
| ABSTRACT.....                                                                       | ii   |
| TEŞEKKÜR.....                                                                       | iii  |
| TEZ BEYANI.....                                                                     | iv   |
| ŞEKİLLER LİSTESİ.....                                                               | vii  |
| TABLolar LİSTESİ.....                                                               | viii |
| 1. GİRİŞ .....                                                                      | 1    |
| 2.KAYNAKLAR VE LİTERATÜR ÖZETİ.....                                                 | 3    |
| 2.1 Çimlenme, Büyüme ve Gelişme .....                                               | 3    |
| 2.1.1 Tohum Çimlenmesi.....                                                         | 3    |
| 2.1.2 Büyüme ve gelişme .....                                                       | 4    |
| 2.1.3 Işığın Büyüme ve Gelişmeye Etkisi.....                                        | 5    |
| 2.1.4 Hormonların Büyüme ve Gelişmeye Etkisi.....                                   | 8    |
| 2.2 Bitkilerde Stres ve Stresten Korunma Mekanizması.....                           | 9    |
| 3.MATERYAL VE METOD.....                                                            | 17   |
| 3.1 Materyal.....                                                                   | 17   |
| 3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....                                             | 17   |
| 3.1.2 Kullanılan Cihaz ve Aletler.....                                              | 17   |
| 3.1.3 Kullanılan Çözeltiler.....                                                    | 18   |
| 3.1.3.1 Homojenat Tamponu.....                                                      | 18   |
| 3.1.3.2 Katalaz Aktivitesinin Ölçülmesi İçin Kullanılan Çözeltiler.....             | 18   |
| 3.1.3.3 Peroksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi İçin Kullanılan Çözeltiler.....          | 18   |
| 3.1.3.4 Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi İçin Kullanılan Çözeltiler..... | 18   |
| 3.1.3.5 Total Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....   | 18   |
| 3.1.3.6 Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....     | 19   |
| 3.1.3.7 Prolin Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....                | 19   |
| 3.1.3.8 Malondialdehit Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....        | 19   |
| 3.1.3.9 Protein Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....               | 19   |
| 3.2 Metod.....                                                                      | 20   |
| 3.2.1 Bitkilerin Yetiştirilmesi.....                                                | 20   |
| 3.2.2 Homojenat Hazırlanması .....                                                  | 20   |
| 3.2.3 Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....                                       | 20   |
| 3.2.4 Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....                                    | 21   |
| 3.2.5 Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....                           | 21   |
| 3.2.6 Prolin Miktarının Belirlenmesi.....                                           | 21   |
| 3.2.7 Malondialdehit Tayini.....                                                    | 22   |
| 3.2.8 Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesi .....                               | 22   |
| 3.2.9 Protein Miktarının Belirlenmesi.....                                          | 23   |
| 3.2.10 Total Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi.....                             | 23   |
| 3.2.11 İstatistiki Analiz.....                                                      | 24   |
| 4.ARAŞTIRMA SONUÇLARI.....                                                          | 25   |
| 4.1 Katalaz Aktivitesi sonuçları.....                                               | 25   |
| 4.2 Peroksidaz Aktivitesi sonuçları .....                                           | 26   |
| 4.3 Askorbat Peroksidaz Aktivitesi sonuçları .....                                  | 27   |
| 4.4 Prolin Standart Grafiği.....                                                    | 28   |
| 4.5 Prolin Miktarı sonuçları.....                                                   | 29   |
| 4.6 Malondialdehit Miktarı sonuçları .....                                          | 30   |

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.7 Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Standart Grafik .....    | 31 |
| 4.8 Hidrojen Peroksit Miktarı sonuçları .....                                        | 32 |
| 4.9 Protein Standart Grafiği .....                                                   | 33 |
| 4.10 Protein Miktarı sonuçları.....                                                  | 34 |
| 4.11 Total Fenolik Bileşiklerin Miktarının Tayininde Kullanılan Standart Grafik..... | 35 |
| 4.12.Total Fenolik Bileşik Miktarı sonuçları.....                                    | 36 |
| 5.TARTIŞMA ve SONUÇ.....                                                             | 37 |
| 6.KAYNAKLAR.....                                                                     | 40 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                        | 43 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sekil

### Sayfa

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1 Etiyole ve normal fasulye fideleri.....                                                   | 2  |
| 2.1 Tohumun çimlenmesinde meydana gelen biyokimyasal olaylar.....                             | 4  |
| 2.2 Kriptokromun ve COP1 geninin çalışması .....                                              | 6  |
| 2.3 Deney bitkileri .....                                                                     | 7  |
| 2.4 Bitkilerde reaktif oksijen türlerini zararsız hale dönüştüren hücrel ana metabolik yol .. | 15 |
| 4.1 Katalaz aktivitesi sonuçları.....                                                         | 25 |
| 4.2 Peroksidaz aktivitesi sonuçları .....                                                     | 26 |
| 4.3 Askorbat peroksidaz aktivitesi sonuçları .....                                            | 27 |
| 4.4 Prolin standart grafiği.....                                                              | 28 |
| 4.5 Prolin miktarı sonuçları.....                                                             | 29 |
| 4.6 Malondialdehit miktarı sonuçları .....                                                    | 30 |
| 4.7 Hidrojen peroksit miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik .....             | 31 |
| 4.8 Hidrojen peroksit miktarı sonuçları .....                                                 | 32 |
| 4.9 Protein standart grafiği .....                                                            | 33 |
| 4.10 Protein miktarı sonuçları.....                                                           | 34 |
| 4.11 Total fenolik bileşiklerin miktarının tayininde kullanılan standart grafik.....          | 35 |
| 4.12 Total fenolik bileşik miktarı sonuçları.....                                             | 36 |

## TABLÖLAR LİSTESİ

| <b><u>Tablo</u></b>                                | <b><u>Sayfa</u></b> |
|----------------------------------------------------|---------------------|
| 4.1 Katalaz aktivitesi sonuçları .....             | 25                  |
| 4.2 Peroksidaz aktivitesi sonuçları .....          | 26                  |
| 4.3 Askorbat peroksidaz aktivitesi sonuçları ..... | 27                  |
| 4.4 Prolin miktarı sonuçları .....                 | 29                  |
| 4.5 Malondialdehit miktarı sonuçları.....          | 30                  |
| 4.6 Hidrojen peroksit miktarı sonuçları .....      | 32                  |
| 4.7 Protein miktarı sonuçları.....                 | 34                  |
| 4.8 Total fenolik madde miktarı sonuçları .....    | 36                  |

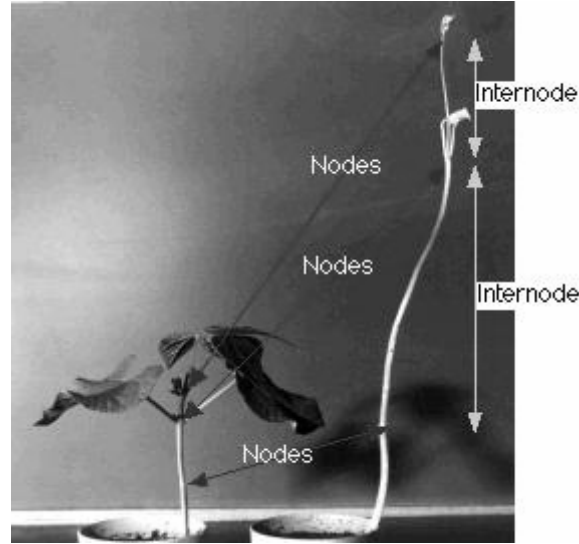
## 1. GİRİŞ

Karanlıkta büyüyen fideler açık renkli, anormal derecede uzun, daha zayıf ve ince görünümlüdürler. Etiyolleşmiş büyüme olarak bilinen bu büyüme formu, ışıktaki büyüyen daha kısa boylu ve yeşil renkli fidelerden belirgin bir farklılık gösterir (Şekil 1.1). Bu farklılıklar; gövdenin daha fazla uzaması, apikal ucun çengel biçiminde olması, zayıf gövde yapısına sahip olma ve sarımtırak renkli gövde ve yapraklar olarak sıralanabilir. Bitki metabolizmasında fotosentez anahtar rol oynar ve fotosentezde de ışık hayati öneme sahiptir. Karanlık ortamda yetişen bitkilerde fotosentez gerçekleşmez bitkilerin büyüme ve gelişmesi sırasında tohumda depo edilen yedek besinler kullanılır.

Etiyole bitkilerden normal görünümlü bitkilere dönüşümü başlatmak çok kısa süreli ışık uygulamasıyla mümkündür. Işığın etkisiyle oluşan değişiklikler ilk aşamada gözle görülmesi bile ışığa maruz bırakıldıktan hemen sonra başlar. Etiyole bakla fidelerine düşük şiddetli ışık uygulandığında, gelişmeyle ilgili pek çok değişiklik birkaç saat içinde meydana gelir. Gövde uzama miktarında azalma, çengel biçimindeki (eğilmiş) apikal ucun doğrulması ve pigment sentezi en belirgin değişikliklerdir. De-etiyolasyon sırasında, ışık doğrudan enerji kaynağı olmaktan çok, büyüme tetikleyicisi olarak görev yapar. Işık, fidelerin toprak üstü organlarının gelişimini başlatan sinyaller verir (Symons ve Reid, 2003). Bu sinyaller fitokrom, kriptokrom gibi ışık algılayıcılarıyla bitkiler tarafından algılanarak gerekli tepkilerin oluşması sağlanır.

Kloroplastlar, mitokondri, peroksizom ve glioksizom gibi oksidasyon tepkimelerinin olduğu organeller reaktif oksijen türlerinin meydana geldiği hücresel yapılardır. Bitkilerde reaktif oksijen türlerinin üretimi kuraklık, tuzluluk, ışık ve sıcaklık gibi farklı çevresel faktörlerin etkisiyle teşvik edilir. Bitki büyüme ve gelişmesi üzerine çevresel etmenlerin etkisiyle alakalı çok sayıda araştırma yapılarak, bitkilerin bu etmenlere verdiği cevaplar incelenmiştir. Bitkisel cevapların oluşmasında antioksidan enzimlerin ve antioksidan bileşiklerin çok önemli rolleri vardır. Antioksidan bileşikler ekstrem şartlarda oluşan radikal karakterdeki molekülleri yakalarlar ve zararsız hale dönüştürürler. Antioksidan bileşikler flavonlar, antosiyaninler,  $\alpha$ -tokoferol, askorbat, glutatyon ve polifenolik bileşikler kapsar. Radikal karakterdeki bileşikler hücre zar

sistemlerini ve makromoleküllerin yapılarını bozarak etkilerini gösterirler. Antioksidan enzimler; süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz, peroksidaz gibi çok sayıda enzim grubunu içerir. Ayrıca, bitki savunma mekanizmasında fenolik bileşiklerin de önemli katkıları vardır (Parida ve Das, 2005).



Şekil1.1 Etiyole ve normal fasulye fideleri.

Karanlık periyot bitki için bir stres kaynağıdır ve bitki metabolizmasında önemli değişikliklere sebep olur. Bu çalışmada çimlenme sonrası karanlıkta büyütülen (etiyole) ve karanlıktan ışığa çıkarılan de-etiyole fasulye fidelerinde strese cevap vermede önemli rolleri olan bazı antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve total fenolik bileşik miktarları belirlendi.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Çimlenme, Büyüme ve Gelişme

#### 2.1.1. Tohum Çimlenmesi

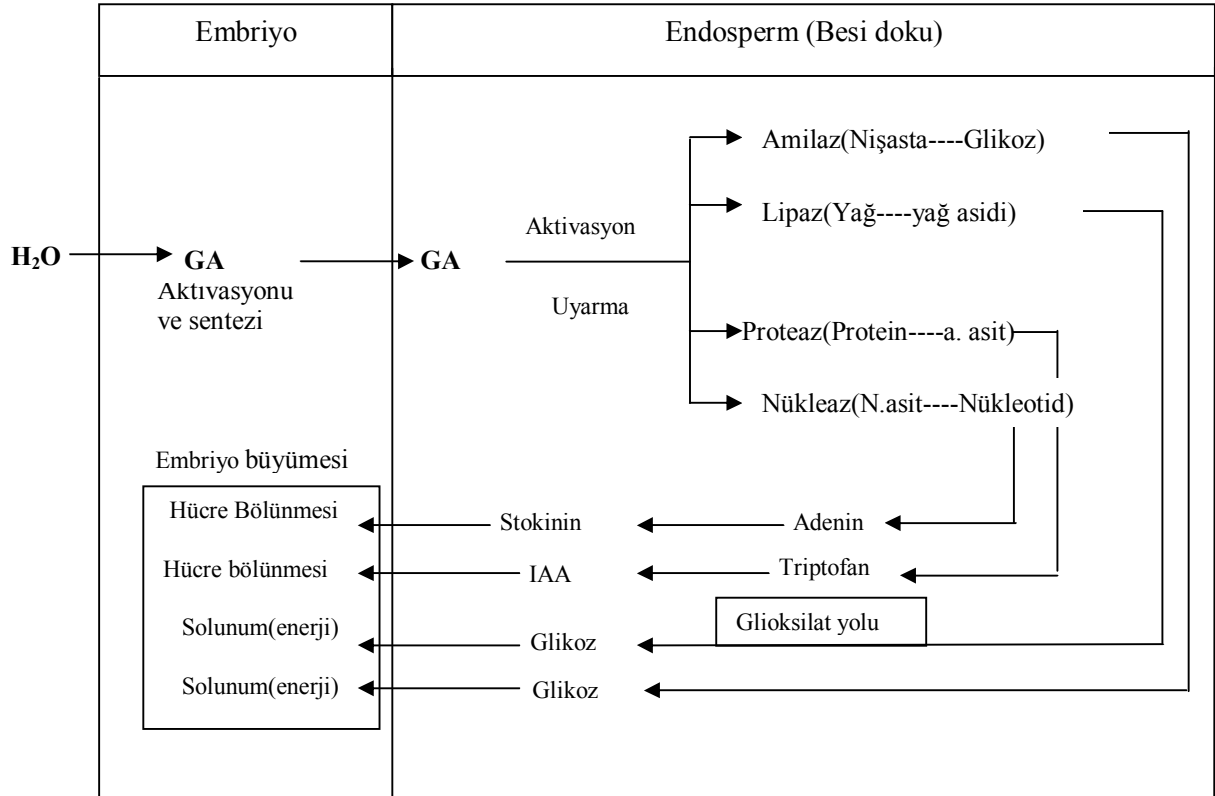
Çimlenme, embriyonun uygun şartlar altında gelişerek kökü oluşturacak radikulanın ve gövdeyi meydana getirecek plumulanın tohumdan çıkması olayıdır. Genelde tohumlar hemen çimlenmezler. Çeşitli iç ve dış faktörlerin etkisi ile bir süre uyku halinde (dormant) kalırlar. Birçok tohum çimlenme yeteneğini kaybetmeden uzun yıllar uyku (dormansi) halinde kalabilir (Kadioğlu ve Kaya, 2005).

Tohumların çimlenmesinde su, sıcaklık, yeteri kadar oksijen ve bazı durumlarda ışık faktörleri önemli rol oynamaktadır. Fizyolojik çimlenme, tohumda daha önce baskılanmış ve durdurulmuş metabolizma ve büyümenin yeniden başlamasıdır. Fizyolojik çimlenme, embriyoda hücre büyümesi, hücre bölünmesi ve hücre farklılaşması olaylarını içine alır.

Biyokimyasal büyüme ise çimlenmenin başlarında yer alır. Oksidatif ve biyosentetik reaksiyonlar, hormonları uyarır ve enzimlerin de katalizlemesiyle ardışık olarak biyokimyasal olaylar gerçekleşir.

Bir tohumun çimlenmesi için başta su alması gerekir. Su girişinden sonra tohumda şişme meydana gelir. Suyun embriyo hücrelerine girişi ile giberellin (GA) hormonu aktive olur. Bu hormon embriyoda önceden mevcut fakat inaktiftir. Ayrıca yeniden giberellin sentezini uyarır (Şekil 2.1). Giberellinler aktive olarak ve yeniden sentezlenerek embriyodan endosperme geçerler. Bu hormonlar çeşitli depo maddelerini parçalayan hidrolitik enzimlerin sentezini uyarmak suretiyle etkili olur. Amilaz, lipaz, proteaz, nükleaz enzimleri sırasıyla nişasta, yağ, protein ve nükleik asitleri parçalayarak sitokinin (CK), indol asetik asit (IAA) ve glikoz oluşumunu başlatırlar. Sitokinin ve indol asetik asit hücre bölünme ve büyümesini teşvik eder.

Böylece bütün bu olayların ortak sonucu olarak embriyo büyümeye ve farklılaşmaya başlar. Kabına sığmaz hale geldiğinde embriyonun radikula (kökçük) kısmı kabuğu parçalayarak dışarı çıkar. Böylece morfolojik anlamda çimlenme gerçekleşmiş olur (Kocaçalışkan, 2008).



Şekil 2.1. Tohumun çimlenmesinde meydana gelen biyokimyasal olaylar (Kocaçalışkan, 2008).

### 2.1.2. Büyüme ve Gelişme

Büyüme, bitki organlarının yapılarına yeni maddeler olarak geri dönüşümü olmayan ağırlık ve hacim artışı olarak tanımlanabilir. Gelişme ise farklılaşma, organize olma ve kompleksliğe gidişle birlikte büyümeyi de kapsar. Bu yüzden gelişme büyümeyi takip eder. Hücreler, önce büyür daha sonra farklılaşarak görevine uygun bir yapı kazanır. Farklılaşma olayı, hücrelerde genlerin zamana ve şartlara bağlı olarak aktivasyonu ve baskılanması ile açıklanmaktadır. Her bitkinin başlangıcı zigota dayanır. Zigottan itibaren büyüme ve gelişme olayları zigottaki tasarıma göre ardışık olarak cereyan eder.

ve bir bitki meydana gelir. Zigot mitoz bölünmeyle çoğalarak meristematik özellikteki embriyonik hücreleri ortaya çıkarır. Embriyonik hücrelerin bazıları büyüyerek farklılaşır ve önce parankima, iletim, destek doku gibi çeşitli dokular, sonra kök, gövde, yaprak gibi organlar ve nihayet bir bitki ortaya çıkar (Kocaçalışkan, 2008).

### 2.1.3. Işığın Büyüme ve Gelişmeye Etkisi

Işık bitki büyüme ve gelişmesi üzerine temel etkiye sahiptir. Tohum çimlenmesi, fide gelişmesi, vejetatif safhanın fizyoloji ve morfolojisi, çiçeklenme ve sirkadyan ritimlerin kontrolü gibi birçok olayda ışığın etkisi vardır.

Bitki büyüme ve gelişimi üzerine ışığın etkisi karanlıktan ışığa geçiş sürecinde daha belirgindir. Etiyole dikotil fideleri; apikal kancanın büyümesi, epikotil ve hipokotil uzaması ve farklılaşmamış kloroplast öncüllerini ihtiva eden bir fenotip sergiler (Symons ve Reid, 2003). Işığa maruz kalınca fidelerde uzama oranında belirgin bir azalma, apikal kancanın açılması, gerçek yaprakların büyümesi ve olgun kloroplastların gelişmesini içeren çok sayıda fizyolojik değişiklik meydana gelir (Şekil 2.2).

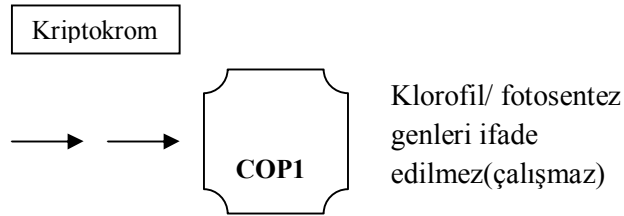
Işığın fotoreseptörler tarafından algılanması iyi bilinirken, fenotipik değişiklikleri sağlayan mekanizması ve ışık sinyal iletimindeki bileşiklerin hareketi açık değildir. De-etiolasyon süresince ışığın uyardığı değişikliklerin pek çoğu (gövde uzaması) bitki hormonları tarafından düzenlenir. Bu nedenle, ışık ve hormon sinyal metabolik yollarının etkileşiminin normal bitki gelişimi için gerekli olduğu da düşünülür. Aslında bitki hormonlarının; bitki büyüme ve gelişmesi üzerine, ışığa aracılık ederek ışık sinyal iletiminde rol oynadığı düşünülür.

Karanlıkta büyüyen fidelerde COP1 nüklear proteini bulunur. Bu protein, klorofil ve fotosentezi kontrol eden genlerin ifadesini yani çalışmasını önler. Bu şekilde karanlıkta olan fideler daha fazla ışık bulabilmek için uzamaya devam ederler. Kriptokromun davranışını mavi ışık değiştirir ve kriptokrom COP1'e bağlanır. COP1 geninin kriptokromla bağlanması fotosentez genlerinin engellenmesini ortadan kaldırır. Bu

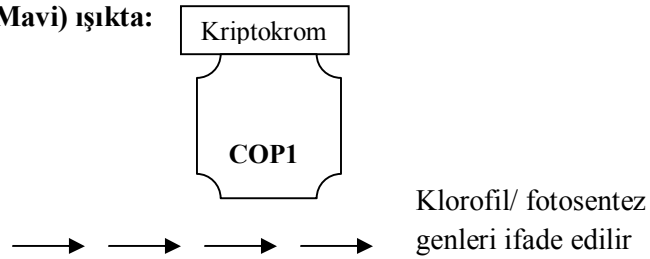
aşamadan sonra genler çalışmaya başlar (Şekil 2.3). Fideler yeni yapraklar ve klorofil üretmeye devam ederler (Graham ve ark., 2008).

Giberellin (GA), indol asetik asit (IAA), absisik asit (ABA), sitokinin (CK), brassinosteroidler (BRs) ve etileni içeren çok sayıda hormon de-etiolasyon süresince morfolojik değişikliklerin düzenlenmesinde etkili olduğu ifade edilmektedir.

**Karanlıkta :**



**(Mavi) ışıktaki:**



Şekil 2.2. Kriptokrom ve COP1 geninin beraber çalışması (Graham ve ark., 2008)



a. Işıktaki büyüyen fasulyeler



b- De-etivole fasulyeler



c- Etivole fasulyeler

Şekil 2.3. Deney bitkileri

- a- Işıktaki büyüyen fasulye fideleri (15 gün ışık)
- b- De-etivole fasulye fideleri (10 gün karanlık + 5 gün ışık)
- c- Karanlıkta büyüyen (etivole) fasulye fideleri (15 gün)

#### 2.1.4. Hormonların Büyüme ve Gelişmeye Etkisi

Bitkisel hormonların en önemli görevi, büyüme ve gelişmeyi düzenli bir şekilde sağlamaktır. Etiyole fidelerde proplastidler kloroplastlar yerine etioplastlara dönüşürler. Etioplastlar, klorofil ya da kloroplast tilakoyid sisteminin oluşumu ve fotosentetik sistem için gerekli olan enzimlerin ve yapısal proteinlerin çoğunu sentezleyemezler. Fideler ışıktaki çimlendiklerinde embriyodaki proplastidler doğrudan kloroplastlara dönüşür; ancak etiyole fideler ışıklandırıldıklarında etioplastlar olgun kloroplastlara dönüşürler.

Eğer etiyole yapraklara ışık verilmeden önce sitokinin uygulanırsa, etioplastlar granaları daha yaygınlaşan kloroplastlara dönüşür. Ayrıca klorofil ve fotosentezde yer alan enzimler daha fazla sentezlenirler. Bu sonuçlar, diğer faktörlerle birlikte (ışık, besin ve büyüme gibi) sitokininin fotosentezde rol oynayan renkli pigmentlerin ve proteinlerin sentezini düzenlediğini göstermektedir (Taiz ve Zeiger, 2008).

Başlıca bitki hormonları oksinler, giberellinler, sitokininler, etilen ve absisik asittir. Bunlardan ilk üçü büyümeyi teşvik eder, absisik asit büyümeyi engelleyen bir etki gösterir. Etilen ise düşük konsantrasyonlarda büyümeyi teşvik ederken yüksek konsantrasyonlarda ise büyümeyi engelleyici etki gösterir.

Oksinler ilk tespit edilen hormon grubudur. İlk önce indol asetik asit (IAA) bulunmuştur. IAA triptofandan sentezlenir. Gövde ve dal uçlarında bulunur. Ayrıca tohum ve genç yapraklarda da sentezlenir. Oksin yukarıdan aşağıya floemle taşınır. IAA hormonu IAA oksidaz enzimi vasıtasıyla inhibe edilir. Oksinler hücre çeperini parçalayan selüloz enziminin sentezini teşvik eder. Bu yolla çeper gevşemesini ve dolaylı olarak hücre büyüme ve farklılaşmasında etkili olduğu bilinmektedir.

Giberellin 80 civarında farklı türe sahiptir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılan giberellik asit olarak bilinen GA<sub>3</sub>'tür. Giberellin asetil-KoA'dan sentezlenir. Daha çok genç yapraklarda ve tohum embriyosunda en fazla sentezlenir. Çimlenen tohumlarda

floemle taşındığı bilinmekle birlikte genç yapraklardan diğer organlara nasıl taşındığı çelişkilidir. Giberellinlerin parçalanması çok yavaştır. Giberellinler hücrede protein sentezini arttırmada etkili olurlar bunun yanı sıra  $\alpha$ -amilaz gibi çimlenmede rol oynayan hidrolitik enzimlerin sentezini teşvik ettiği bilinmektedir. En belirgin etkisi boyca büyümeyi artırmasıdır. Ayrıca çiçeklenmeyi teşvik ederler.

Sitokininlerin sentezi adeninden başlar. Yıkımları sitokinin oksidaz enzimi ile olur. Tohumlarda, genç yapraklarda ve kök uçlarında bol bulunurlar. Yaprak, çiçek, meyve gibi organlara sitokininlerin kökten taşındığı kabul edilmektedir. Sitokininler mitoz bölünmeyi teşvik ederek büyümeyi artırma, yapraklarda senesensi geciktirme, apikal dormasinin yıkılması gibi birçok olayda rol oynarlar (Kocaçalışkan, 2008).

## **2.2. Bitkilerde Stres ve Stresten Korunma Mekanizması**

Stres, biyotik ve abiyotik faktörlerin ayrı ayrı ya da birlikte fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda belli değişimleri meydana getirmesi veya organizmada hasar oluşturma kapasitesi olarak tanımlanabilir (Levitt, 1980). Başka bir deyişle, büyüme, gelişme ve üretim için genetik potansiyelin ifadesini olumsuz şekilde etkileyen herhangi bir çevresel faktörü veya bunların etkileşimlerini içermektedir.

Stres durumunda serbest oksijen radikalleri oluşur. Bunlar bitkilere zarar verir. Bu tahribatlardan korunmak için antioksidan sistemler devreye girer. Bunların en önemlileri, vitamin E, vitamin C, glutatyon, karotenoidler ( $\beta$ -karoten, zeaxanthin)'dir (Karanlık, 2001). Süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT), peroksidaz (POD), gibi enzimler serbest oksijen radikallerinin yok edilmesinde en etkin antioksidan enzimler olarak bilinmektedirler (Çakmak ve Marschner, 1992).

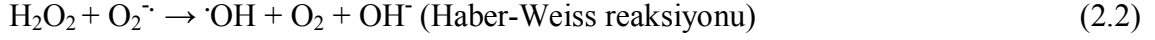
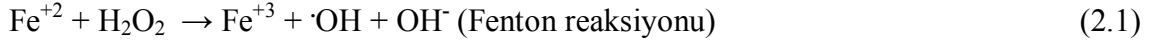
Serbest radikaller, bir atom ya da molekül yörüngesinde eşleşmemiş bir elektron içeren yüksek oranda reaktif kimyasal türlerdir. Çok kolayca başka moleküller ile elektron alışverişine giren bu moleküllere “oksidan moleküller” ya da “reaktif oksijen türleri”

(ROS)'de denmektedir. Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve eksojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşan bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, düşük molekül ağırlıklı, kararsız, kısa ömürlü ve çok etkin moleküller olarak tanımlanırlar. Hücrelerde meydana gelen serbest oksijen bileşiklerinin sayısı yüzlerce farklı tür şeklinde ifade edilebilirse de, bunların arasında hidroksil radikali ( $\text{OH}^\cdot$ ), hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), süperoksit ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) ile singlet oksijenin ( $\text{O}_2^1$ ) özel yerleri vardır (Eryılmaz, 2007).

Süperoksit radikali ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) moleküler oksijen ( $\text{O}_2$ )'in bir elektron almasıyla oluşabilir. Bu radikaller, yüklü oldukları için hücre ve organellerin zarlarından geçemezler, etkilerini üretildikleri yerde gösterirler. Süperoksit anyonu düşük pH'da kolayca bir proton alarak kendisinden daha kuvvetli bir oksidan olan perhidroksil radikalini ( $\text{HO}_2^\cdot$ ) oluşturmaktadır. Bu radikal, membranlarda lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir. Süperoksit radikalleri ayrıca ağır metalleri indirgeyerek bağlı bulunduğu proteinlerden salınımına neden olmakta, kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozmakta ve bazı metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini (Fenton ve Haber-Weiss) hızlandırmaktadır. Bu radikal süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile daha az zararlı olan hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )'e dönüştürülür.

Hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), süperoksit ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) radikale bir elektronun eklenmesi (süperoksit dismutasyonu) ya da  $\text{O}_2$ 'in doğrudan indirgenmesiyle oluşmaktadır. Dismutasyon kendiliğinden ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla katalize edilmektedir.  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretildiği yerden uzak kısımlara difüzyon yoluyla dağılabilir.  $\text{H}_2\text{O}_2$  özellikle bakır ve demir gibi geçiş metallerinin varlığında, hidroksil radikalının ( $\text{OH}^\cdot$ ) öncülü olarak davranır. Bitki hücrelerinde  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in temizlenmesi oksidan zararın önlenmesi için büyük önem taşımaktadır.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in yıkımı bitkilerde öncelikle askorbat-glutatyon döngüsü ve hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Demirci, 2006).

Hidroksil Radikali ( $\text{OH}^\cdot$ )'nin oluşumu hidrojen peroksitin eksik indirgenmesi ile gerçekleşmektedir. Bu tür indirgenme Fe ve Cu gibi geçiş elementlerinin varlığında Fenton reaksiyonu ile katalizlenmektedir (Eşitlik 2.1).



Haber-Weiss reaksiyonu (Eşitlik 2.2) olarak adlandırılan bu tepkime ile oluşan  $\cdot\text{OH}$  miktarı; hücrede üretilen  $\text{H}_2\text{O}_2$  derişimi ve serbest metal iyonlarının varlığına bağlıdır. Biyolojik sistemlerde bilinen en reaktif tür olan  $\cdot\text{OH}$ , su dâhil ortamda rastladığı her biyomolekülle etkileşime girebilmektedir. Bütün hücrel yapılar  $\cdot\text{OH}$  in bir hedefi ise de özellikle protein, lipit ve nükleik asitler gibi elektronca zengin bileşikler tercihli hedeflerdir ve bu kısımlarda başlatılan radikal tepkimelerinde binlerce farklı ara ürün oluşabilmektedir (Eryılmaz, 2007).

Singlet Oksijen ( $^1\text{O}_2$ ) yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmaması nedeniyle serbest radikal olmadığı halde yüksek enerjili elektronlarının varlığı ile reaktif oksijen türleri arasında yer alır. Bu bileşik, serbest radikal zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır Özellikle doymamış yağ asitlerindeki karbon-karbon çift bağları ile doğrudan etkileşime girerek peroksil radikallerinin oluşumuna neden olan  $^1\text{O}_2$ ;  $\cdot\text{OH}$  bileşiğı kadar etkin bir şekilde lipit peroksidasyonunu başlatabilmektedir (Demirci, 2006).

Enzimatik olmayan savunma antioksidan maddeler olarak bilinen glutatyon, askorbat (vitamin C), tokoferol (vitamin E) ve flavonoidler, lignin, tanin gibi bileşikler tarafından yürütülür.

Glutatyon (GSH) düşük moleküler ağırlığa sahip olup bir dokuda, hücrede ve hücrel kompartmanlarda bulunur. GSH'n antioksidan özelliğı sisteinin sülfidril grubundan kaynaklanır. GSH ikinci bir GSH molekülü ile sülfidril grubundan bağlanarak bir disülfid bağı oluşturur ve ortaya okside glutatyon (GSSG) çıkar. GSH kimyasal olarak singlet oksijen ile süperoksit ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek serbest radikalleri etkisizleştirmede doğrudan rol oynar. Ayrıca lipit peroksidasyonu sırasında açığa çıkan açıl peroksitleri uzaklaştırarak membran yapısının kararlılığına katkı sağlar.

Askorbik asit (vitamin C) hayvan ve bitki dokularında bulunan önemli antioksidan bileşikler arasında yer alır. Askorbat indirgeyici olarak çalışarak oksidatif hasara karşı koruma sağlar. Ayrıca askorbat birçok reaksiyonda elektron vericisi olarak da rol oynar (Keser, 2005).

Karotenoitler hem bitkileri hem de hayvanları oksidatif hasara karşı koruyan ve yağda çözünebilen moleküllerdir.  $\beta$ -karoten, vitamin A'nın esas öncül maddesidir. Karotenoitler son derece güçlü singlet oksijen ( $^1O_2$ ) temizleyicisi olup ayrıca hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleri ile de doğrudan tepkimeye girerek lipid peroksidasyonu zincirini kırıcı özelliklere sahiptir (Eryılmaz, 2007).

$\alpha$ -tokoferol (E vitamini) hidrofobik doğasından ötürü membranda yer alır ve iyi bir membran stabilizasyonu sağlar. Aynı zamanda vitamin E iyi bir singlet oksijen ve alkil peroksit avlayıcısıdır (Toprak, 2007).

Bitkilerde bulunan, flavonoidler ve lignin öncülleri gibi fenolik bileşikler, potansiyel antioksidantlardır. Polifenolik bileşikler; serbest radikal zincirlerini sonlandıran ve redoks aktif metal iyonlarını şelatlayarak lipid peroksidasyonunu engelleyen bileşiklerdir. Güçlü antioksidan bileşikler olan fenolikler, bitkilerde enfeksiyon, yaralanma, herbivorlar, ultraviyole radyasyonu, aşırı ışık şiddeti gibi çeşitli stres koşullarında aktivitelerini artırır (Eryılmaz, 2007).

Süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) yüksek derecede reaktif olan aktif oksijen türlerinden süperoksit anyon radikallerini ( $O_2^-$ ) katalizleyerek organizmalara oksijen varlığında hayatta kalma imkânını veren bir enzimdir. Bu reaksiyon oksijen metabolize eden tüm organizmalarda ve bazı anaerobik canlılarda gerçekleşir ve sonucunda moleküler oksijen ( $O_2$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) açığa çıkar. Bu enzim genelde aktif oksijen oluşturan hücre kompartmanlarında bulunur. Cu-Zn içeren SOD birçok ökaryotik canlıdan izole edilmiştir SOD'un tüm formları çekirdek tarafından kodlanır ve amino ucunun işaretlenmesi ile de gideceği hücre kompartmanı belirlenir.

Katalaz (EC 1.11.1.6) hidroperoksidaz olarak da isimlendirilir. Katalaz bir sitokrom sistemine sahip tüm aerobik canlılarda bulunan ve  $H_2O_2$ 'in su ve oksijene parçalanmasını katalizleyen özel bir proteindir (Eşitlik 2.3).  $H_2O_2$ 'nin hücreden uzaklaştırılması oksidatif hasardan korunmak için önemlidir. Bu görevde katalaz tarafından yürütülür.



Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'in bu şekilde uzaklaştırılması sayesinde daha reaktif olan hidroksil radikallerinin oluşumu önlenmiş olur. Katalaz çeşitli streslere karşı geliştirilen cevap mekanizmalarındandır.

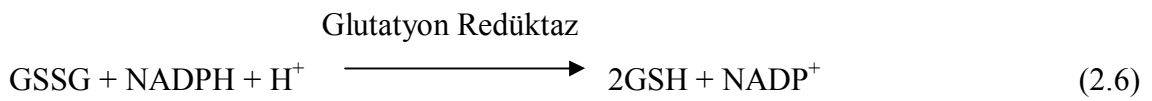
Peroksidaz (EC 1.11.1.7),  $H_2O_2$ 'in etkisini yok eden diğer bir grup enzimi ifade eder. Lignin sentezinde, IAA (indol asetik asit) sentezinde ve  $H_2O_2$ 'in suya dönüştürülmesinde yer alır. POD, guaiacol'u geniş oranda  $e^-$  vericisi olarak kullanır ve bu yüzden guaiacol peroksidaz olarak da isimlendirilir (Polat, 2007).

Askorbat peroksidaz (EC 1.11.1.11) peroksidaz enzim ailesinin bir üyesi olup mayadan insana kadar pek çok canlıda bulunur. Askorbat peroksidaz (APX) hidrojen perokside bağlı olarak farklı substratları katalizler (Eşitlik 2.4). Fakat enzimin fizyolojik substratı askorbattır. Askorbatın dışında bazı aromatik substratların ( $AH_2$ )'da oksidasyonunu katalizler (Şekil 2.4).



Fizyolojik koşullar altında reaksiyonun ara ürünü monodehidroaskorbat radikali olup başka bir enzimce tekrar askorbata indirgenir. Askorbat peroksidaz sitozolde, kloroplastlarda, peroksizomlarda bulunur (Eryılmaz, 2007)

Glutasyon redüktaz (EC 1.6.4.2), okside glutasyonun (GSSG) glutatyonu (GSH) indirgenmesini katalizleyen bir enzimdir (Eşitlik 2.6). Glutasyon redüktaz redoks döngüsünde önemli bir enzim olup, indirgenmiş hücrel GSH'ın hücrede yeterli seviyede kalmasını sağlar. GSH antioksidan olarak görev yapar ve serbest radikal ve organik peroksitlerle reaksiyona girer, amino asit taşınımında görev alır, glutasyon peroksidaz ve glutasyon S-transferaz enzimlerinin substratıdır.

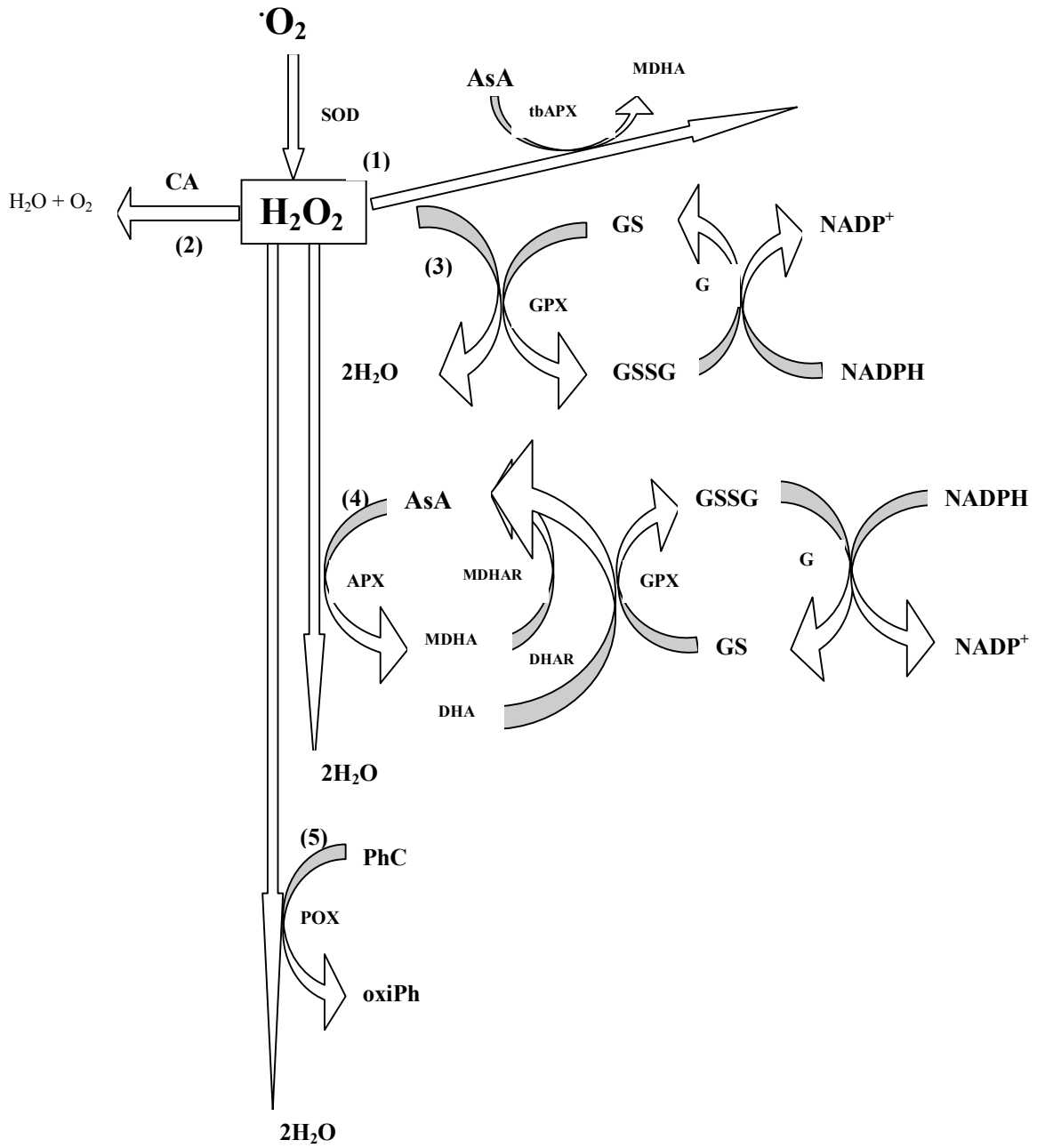


Endojen veya eksojen nitrik oksit uygulaması GSH oluşumunu azalttığı için hücrel dengeyi bozar. Bir stres meydana gelir ve enzimin inhibisyonu gerçekleşir. Glutasyon redüktaz mitokondrilerde ve peroksisomlarda bulunmuştur.

Glutasyon S-transferaz (EC 2.5.1.18) bir enzim ailesi olup çeşitli bileşiklerle indirgenmiş glutasyon arasında konjugasyonu sağlar (Eşitlik 2.7). Bu reaksiyon sonunda aktif olamayan, suda çözünebilen, daha az zararlı ürünler ortaya çıkar.



Çevresel stres faktörlerince oluşumu tetiklenen reaktif oksijen türlerine karşı (Glutasyon S-transferaz) GST'ler hücre membranını, DNA'yı ve proteinleri korur. GST aktivitesinin bitkilerde, böceklerde, mayalarda, bakterilerde ve özellikle karaciğer olmak üzere çoğu memeli dokularında bulunduğu ve detoksifikasyonda anahtar rol oynadığı bilinmektedir (Toprak, 2007).



Şekil 2.4. Bitkilerde reaktif oksijen türlerini zararsız hale dönüştüren hücresel ana metabolik yol (Posmyk ve ark., 2009)

Bitkinin üzerinde olumsuz etki oluşturan çevresel etmenler stres sebebidir. Stres genellikle bitkinin yaşayabilirlik, verimlilik, büyüme (biyolojik kütle birikimi) ya da primer özümleme işlemlerine ( $\text{CO}_2$  ve mineral alınımı) dayanılarak ölçülmektedir. Stres kavramı strese tolerans kavramı ile ilişkilidir. Stres toleransı bitkinin uygunsuz ortam koşulları ile başa çıkma potansiyelidir. Stres toleransı strese direnç olarak da ifade edilir. Bir bitki için stres oluşturan ortam diğeri için stres oluşturmaz.

Su kıtlığı (kuraklık), tuzluluk, düşük sıcaklık ve donma, yüksek sıcaklık, oksijen eksikliği, ışık azlığı, parazitizm gibi birçok fiziksel, kimyasal ve biyolojik etmen strese neden olabilir (Taiz ve Zeiger, 2008).

Bitkiler güneşten gelen ışık enerjisini fotosentez ile kimyasal enerjiye dönüştürürler. Ototrofik bitkiler ışık yoğunluğundan direkt olarak etkilenirler. Işık yoğunluğundaki değişiklik (azlık-fazlalık) metabolik olayların bozulmasına neden olur. Işık fotosentez üzerine etkiden başka bitki sıcaklığını ve fotomorfogenetik durumları etkileyerek stres oluşturabilir. Karanlık ortamdan ışıklı ortama geçişte karanlıkta yetişen bitkiler ışıklı ortamda yetişen bitkilere benzemeye başlarlar. Kloroplastların olgunlaşmasını gerektirmesi ve bitkilerde fenotipik değişikliklere neden olması sebebiyle ışık stresi olarak isimlendirilir. Bu değişiklikler gövde uzamasının inhibisyonu, aktif kök gelişimi ve renkte değişikliklerdir (klorofil, karotenoid ve antosiyanin sentezi).

Bitkiler yaprakları üzerine düşen ışığı ya absorbe ederler ya yansıtırlar veya geçirirler. Kloroplastlar, fitokromlar, kriptokromlar ışığı algılayarak cevap verilmesini sağlayan yapılardır. Kloroplastlar ışığı absorblayarak fotosentezde kullanırlar. Fitokromlar kırmızı ve kırmızı ötesi ışığı algılayarak bitkide çeşitli tepkilere (tohumun çimlenmesi, çiçek fotoperiyodizmi, büyüme, hareketler vs.) neden olurlar. Özellikle gövde uzamasının engellenmesinde fitokromlar etkilidir. Karanlıktan aydınlığa çıkarılan bitkilerde gövde uzamasının engellenmesi fitokromla beraber mavi ışığa da bağlıdır. Kriptokromlar ise mavi ışığı algırlarlar. Işık stresinde gövdenin fazla uzamasına neden olurlar. Fidelerin bulundukları ortamın yeteri kadar ışığa sahip olup olmadığını ya da onların daha fazla ışık alabilmek için daha fazla büyümeye ihtiyaçları olup olmadığını belirlemede fidelere yardım etmektedir (Kocaçalışkan, 2008).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

Fasulye (*Phaseolus vulgaris L.*) tohumları tohumculardan temin edilmiştir. Çalışmada fasüyenin baroma çeşidi kullanılmıştır.

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Araştırmamızda kullanılan kimyasallar; triklor asetik asit, potasyum iyodür, hidrojen peroksit, fosforik asit, glasiyel asetik asit, sülfosalisilik asit, potasyum di-hidrojen fosfat, quaiacol, sodyum hidroksit, metanol, etanol, kloroform, sodyum karbonat, tiobarbütirik asit, albumin, toluen (Merck), folin-ciocalteu (Sigma), coomasie brillant blue G-250, prolin, gallik asit (Fluka), ninhidrin, askorbik asit (Carlo erba) kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Aletler

|                          |                                                |
|--------------------------|------------------------------------------------|
| Manyetik karıştırıcı     | : Heidolph (Almanya )                          |
| Etüv                     | : Nüve (Ankara, Türkiye)                       |
| UV spektrofotometre      | :Jasco530 V-UV/VIS Spectrophotometer (Japonya) |
| Soğutmalı mikrosantrifüj | : Hettich R22 (Almanya)                        |
| Buzdolabı                | : Regal (Türkiye)                              |
| Otomatik pipetler        | : Eppendorf (Almanya)                          |
| pH metre                 | : Hanna (Romanya)                              |
| Santrifüj                | : Nüve (Ankara, Türkiye)                       |
| — 80° C derin dondurucu  | : Hettich (Almanya)                            |
| Hassas/Analitik terazi   | : Shimadzu (Osaka, Japonya)                    |

### **3.1.3. Kullanılan Çözeltiler**

#### **3.1.3.1. Homojenat Tamponu**

1. 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=7)

#### **3.1.3.2. Katalaz Aktivitesinin Ölçülmesi İçin Kullanılan Çözeltiler**

1. 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH = 7, aktivite tamponu)
2. 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Substrat çözeltisi)

#### **3.1.3.3. Peroksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi İçin Kullanılan Çözeltiler**

1. 60 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=7, Aktivite tamponu )
2. 7,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Substrat çözeltisi)
3. 10 mM Guaiacol (Substrat çözeltisi)

#### **3.1.3.4. Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi İçin Kullanılan Çözeltiler**

1. 35 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH = 7, Aktivite tamponu)
2. 0,5 mM Askorbik Asit (Substrat çözeltisi)
3. 3,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Substrat çözeltisi)

#### **3.1.3.5. Total Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

1. Folin- ciocalteu : Merck folin-ciocalteus reagent kullanıldı.
2. % 2' lik Sodyum karbonat çözeltisi
3. Metanol
4. Kloform

### **3.1.3.6. Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

1. % 0,1 (w/v) Triklor asetik asit (TCA)
2. 1 M Potasyum İyodür (KI)
3. 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=7)

### **3.1.3.7. Prolin Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

1. % 96' lık Glasiyel asetik asit
2. %3' lük Sülfosalisilik asit
3. Asit ninhidrin
4. Toluen

### **3.1.3.8. Malondialdehit Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

1. % 0,1 (w/v) Triklor asetik asit (TCA)
2. % 0,5'lik Thiobarbütirik asit (TBA)

### **3.1.3.9. Protein Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

1. Coomassie Brilliant Blue G- 250

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Toprak olarak % 50 torf, %50 bahçe toprağı kullanıldı. Torf ve toprak ayrı ayrı 4 mm'lik elek yardımıyla elendi, homojen şekilde karıştırıldı. Topraklar tartılarak 25 saksıya eşit miktarda konuldu.

Fasulye tohumları %'5 lik sodyum hipoklorit ile 10- 15 dakika yüzeysel sterilize edildi. Sonra iki defa destile suyla yıkandı. Tohumlar karanlık ortamda çimlendirildi. Her saksıya 6 adet tohum olacak şekilde ekim yapıldı. Saksıların 5 tanesi ışıktaki (15 saat ışık, 9 saat karanlık), 20 tanesi ise karanlık ortama konularak bitkilerin büyümesi sağlandı. Saksılar gün aşırı sulandı. Karanlık ortamda bitkilere geceleri su verildi. Ekimden 10 gün sonra 8 saksı karanlıktan aydınlığa çıkarıldı. Ekim yapıldıktan 15 gün sonra ise yapraklar hasat edildi. Analizler yapılincaya kadar numuneler- 80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

#### 3.2.2. Homojenat Hazırlanması

0,3 g yaprak dokusu 1,5 ml 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=7) tamponu içerisinde porselen havanda homojenize edildi. Homojenat eppendorf tüplerine konularak 4 °C'de 15000 x g'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant enzim aktiviteleri ve protein tayini için kullanıldı.

#### 3.2.3. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz hidrojen peroksidin ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), su ve  $\text{O}_2$ 'ne parçalanmasını katalizler. Aktivite ölçümü,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin su ve oksijene parçalanması sırasında meydana gelen renk açılmasının 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır. Aktivite ölçümünde 3 ml'lik reaksiyon karışımı 25 mM fosfat tamponu (pH=7), 15 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 50 µl homojenat ihtiva eder. Absorbans değişimi 2,5 dakika boyunca ölçüldü ve bir enzim ünitesi

dakikada 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  parçalayan enzim miktarı olarak hesaplandı. 240 nm de  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin ekstinksiyon katsayısı  $0.036 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$  dır (Havir ve Mchale, 1987).

#### 3.2.4. Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz aktivite ölçümünde 3 ml'lik karışım 20 mM fosfat tamponu (pH=7), 7,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10 mM guaiacol ve 10  $\mu\text{l}$  enzim ekstraktı içerir. En son enzim çözeltisinin eklenmesiyle reaksiyon başladı ve 2,5 dakika 470 nm'de optik dansitesi kaydedildi. Bir enzim ünitesi bir dakikada 1  $\mu\text{mol}$  guaiacol'u katalizleyen enzim miktarı olarak hesaplandı. Tetraquaiacol'ün ekstinksiyon katsayısı  $26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  dır (Angelini ve ark., 1990).

#### 3.2.5. Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz aktivite ölçümünde 3 ml'lik reaksiyon karışımı 33 mM fosfat tamponu(pH=7), 3 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  , 0,5 mM askorbik asit ve 50  $\mu\text{l}$  enzim ekstraktından oluşacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon aktivite ortamına en son hidrojen peroksitin ilave edilmesiyle başladı ve 2,5 dakika boyunca 290 nm'de absorbansı kaydedildi. Enzim aktivitesi askorbatın ekstinksiyon katsayısı  $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  kullanılarak hesaplandı (Karabal ve ark., 2003).

#### 3.2.6. Prolin Miktarının Belirlenmesi

Işık ve karanlık ortamda yetiştirilen bitki numunelerindeki prolin miktarının belirlenmesi için 0,4 g yaprak %4'lük 6 ml sülfosalisilik asitte homojenize edildi. Daha sonra homojenat süzgeç kâğıdından süzüldü. Her grup için üç ayrı tüpe 1'er ml numune, 1'er ml Glasiyel asetik asit ve 1'er ml asit ninhidrin konuldu. Tüpler etüvde  $100^\circ\text{C}$ 'de 1 saat bekletildi. Etüvden alınan tüpler 10 dakika buz banyosuna bırakıldı. Sonra üzerlerine 2'er ml toluen ilave edilerek karıştırıldı. 10 dakika inkübasyondan sonra tüplerde iki faz oluştu. Üstteki pembemsi fazın 520 nm' de absorbansı ölçüldü. Sonuçlar

prolinden hazırlanan standart grafikten yararlanılarak g taze doku başına prolin miktarı hesaplandı (Bates ve ark. 1973).

Standart grafik için 10 mg saf prolin 50 ml destile suda çözüldü. Hazırlanan stok çözeltiden tüplere sırasıyla 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl konuldu. Üzerleri 1 ml'ye destile su ile tamamlandı. Tüplere 1 ml %96'lık glasiyel asetik asit ve 1 ml asit ninhidrin eklendi. Tüpler etüvde 100 °C'de 1 saat bekletildi. 10 dakika buz banyosunda inkübe edilen tüplere 2'şer ml tolüen ilave edilerek vorteksle karıştırıldı. Üsteki pembe fazın 520 nm'de absorbansı kaydedildi (Ulus, 2007).

### 3.2.7. Malondialdehit Tayini

Kontrol ve muamele gruplarında 0,5 g yaprak 5 ml %0,1 (w/v) TCA ile homojenize edilerek 10000xg'de 20 dakika santrifüj edildi. 0,5 ml süpernatant üzerine 1 ml % 0,5 TBA içeren TCA ilave edilerek 95 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra buz banyosunda soğutulmak suretiyle reaksiyon durduruldu. Karışım 15 dakika 10000xg'de tekrar santrifüj edildi. Spektrofotometre de 532 nm' de ölçüm yapılarak absorbanslar kaydedildi. Non-spesifik absorpsiyonlar için her bir numunenin 600 nm'deki absorbansı da ölçülerek absorbanstan düşüldü (Velikova ve ark., 2000).

### 3.2.8. Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesi

0,3 g yaprak dokusu 3 ml %1' lik (w/v) TCA'da homojenize edilerek homojenat 12000 x g de santrifüj edildi. 0,5 ml süpernatant üzerine 10 mM (pH=7) fosfat tamponu ve 1 M KI ilave edildi. Elde edilen karışımın absorbansı 390 nm' de ölçüldü. Daha sonra hidrojen peroksitten hazırlanan standart grafikten yararlanılarak ışıklı ve karanlık ortamda yetişen bitkilerdeki hidrojen peroksit miktarı belirlendi (Velikova ve ark., 2000).

Standart grafik için 163 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stok çözeltisinden sırasıyla 50, 100, 200, 300, 400, 500 ve 700 µl pipetlendi. Her bir tüpe 1 ml 1 M KI ilave edildi. Daha sonra son

hacimler 10 mM fosfat tamponu ile 2 ml' ye tamamlandı. Hazırlanan tüplerin absorbansı 390 nm' de okunarak kaydedildi (Karataş, 2007).

### 3.2.9. Protein Miktarının Belirlenmesi

Yapraklardaki protein miktarı Bradford (1976) yöntemine göre belirlenmiştir. Bu yöntemde Coomasie brilliant blue G-250 boyası kullanıldı. Bu boya negatif yüklü olduğu için protein üzerindeki pozitif yüklere bağlanır. Bu boyanın kırmızı ( $A_{\max}=465$  nm) ve mavi ( $A_{\max}=595$  nm) formları vardır. Boya ile proteinin bağlanması kırmızı formu mavi forma dönüştürür. Bu yöntem çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Reaksiyon çok defa tekrarlanabilir ve hızlı şekilde oluşur. Meydana gelen renk stabilitesini 1 saat kadar koruyabilir.

Numunelerdeki protein miktarını belirlenmesinde enzim homojenatı kullanıldı. Işık, etiyole ve de-etiyole yaprak numuneleri için 2' şer tüp alındı. Her bir tüpe 2,5 ml Coomasie brilliant blue G-250 boyası konuldu ve süpernatantlardan 20 µl eklendi. Tüpler vortekste karıştırılıp, 10 dakika inkübasyondan sonra 595 nm' de absorbanslar ölçüldü. Standart grafik yardımıyla yapraklardaki protein miktarı belirlendi.

Standart grafik için ilk önce 1ml' sinde 1 mg protein çözeltisi ihtiva eden sıgır serum albumin çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden tüplere sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 µl pipetlendi ve son hacimler destile su ile 100 µl' ye tamamlandı. Her bir tüpün üzerine 2,5 ml Coomasie brilliant blue G-250 eklendi ve tüpler vorteksle karıştırıldı. 10 dakika inkübasyondan sonra 595 nm' de ölçüm yapıldı. Absorbansa karşılık protein miktarından standart grafik hazırlandı.

### 3.2.10. Total Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Total fenolik madde miktarı Folin-Ciocaltaeu yöntemine göre yapıldı. 2 g yaprak 10 ml metanol içerisinde homojenize edildi. Homojenat erlene alındı ve üzerine 1:2 oranında kloroform ve metanol ilave edilerek manyetik karıştırıcıda 1 saat karıştırıldı. Karışım

süzüldü. Bu işlem çözeltiler renksizleşinceye kadar tekrarlandı. Çözeltiler darası alınmış cam balonlara konuldu ve rotary evaporatörde çözücüler uçuruldu. Kuru ağırlıklar tespit edildi. Madde konsantrasyonu eşit olacak şekilde cam balonlara metanol ilave edilerek çözüldü.

Fenolik madde tayini için her tüpe 450 µl su, 2,5 ml Folin-Ciocalteu, 2 ml %7,5 (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 100 µl stok çözeltiden ilave edildi. Karışım 10 saniye vorteksenerek 45 °C'de 15 dakika etüvde bekletildi. 765 nm'de absorpsanlar ölçülerek standart grafik yardımıyla numunelerdeki total fenolik madde miktarı hesaplandı.

Total fenolik bileşik miktarı gallik asitten hazırlanan standart grafik yardımıyla belirlendi. Standart grafik için 1 ml'sinde 1 mg gallik asit bulunan stok çözelti hazırlandı. 50 µl, 100 µl, 250 µl, 300 µl ve 400 µl tüplere pipetlendi. Üzerleri 500 µl'ye destile su ile tamamlandı. Daha sonra her tüpe 2,5 ml Folin-Ciocalteu, 2 ml %7,5 (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilave edildi. Absorpsanlar 765 nm'de ölçülerek gallik asit konsantrasyonlarına karşılık gelen absorpsanlar yardımıyla standart grafik hazırlandı (Pennycooke ve ark., 2004).

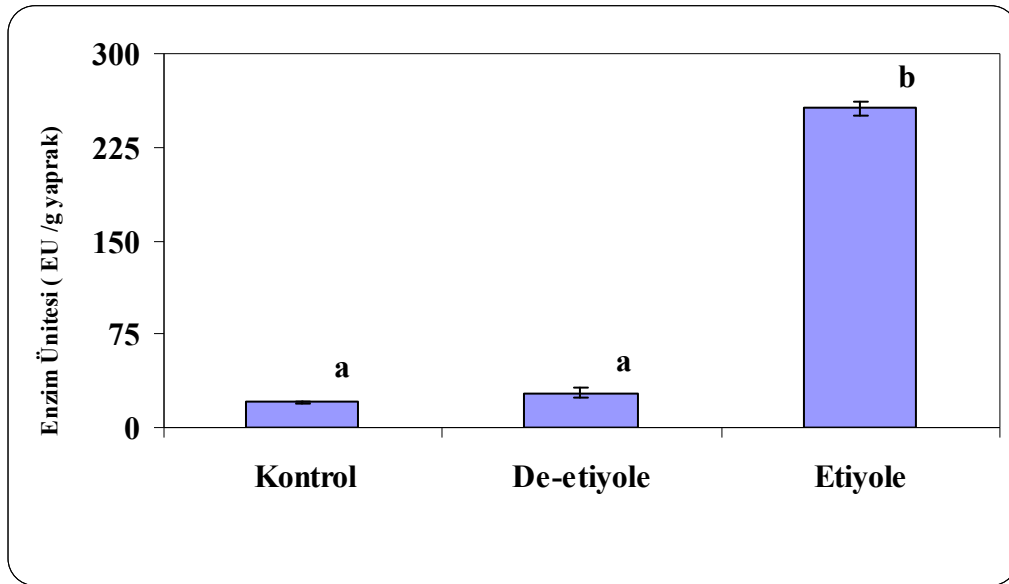
### 3.2.11. İstatistik Analiz

Kontrol ve uygulama gruplarındaki farklılıklar Duncan çoklu aralık testine göre p<0,05 önemlilik değerinde yapılmıştır. Çalışmada her grup için 4 tekrar yapılmıştır (n=4). İstatistikî analizler SPSS for Windows 11.5 Standart version paket programı ile yapıldı. Kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile yapıldı (Duncan, 1955).

#### 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

##### 4.1. Katalaz Aktivite Sonuçları

Kontrol ve uygulama gruplarındaki katalaz aktivitesinde gözlenen değişiklikler Şekil 4.1 ve Tablo 4.1’ de gösterilmiştir. Karanlık ortamda yetişen (etiyolet) bitkilerde katalaz aktivitesi kontrol ve de-etiyole bitkilere göre önemli oranda ( $p<0,05$ ) yüksek bulunmuştur. Kontrol ve de-etiyole fasulye yapraklarındaki katalaz aktiviteleri arasında önemli bir fark yoktur.



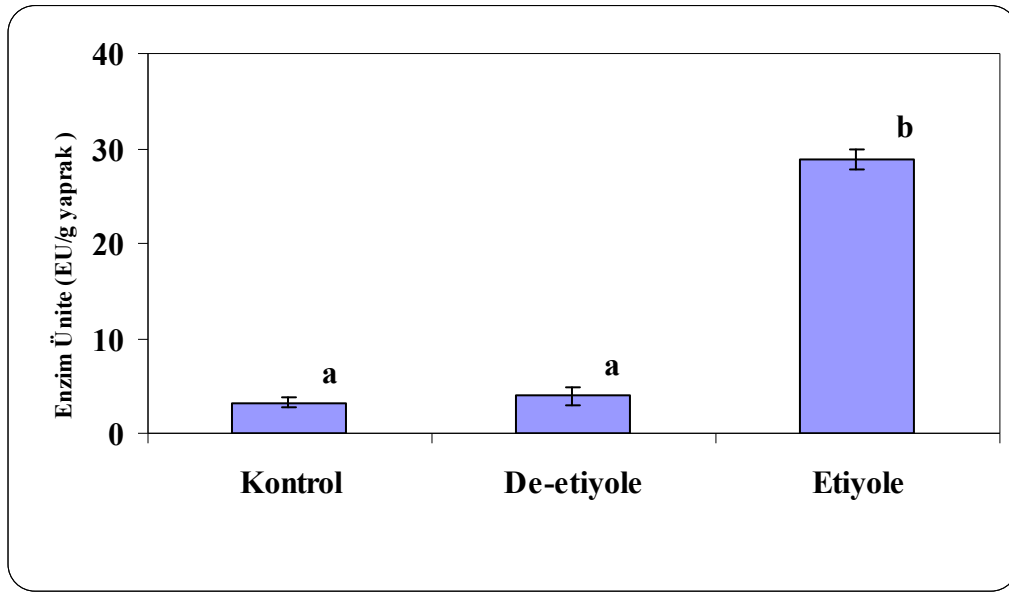
Şekil 4.1. Katalaz aktivitesi sonuçları

Tablo 4.1. Katalaz aktivitesi sonuçları

| Grup       | Enzim Ünitesi (EU/g yaprak) |
|------------|-----------------------------|
| Işık       | 20,53 a $\pm$ 0,78          |
| De-etiyole | 27,89 a $\pm$ 3,5           |
| Etiyole    | 256,06 b $\pm$ 5,06         |

#### 4.2. Peroksidaz Aktivite Sonuçları

Peroksidaz aktivitesinin kontrol ve uygulama gruplarındaki değişimi Şekil 4.2' ve Tablo 4.2' de gösterilmiştir. Etiyole bitkilerde peroksidaz aktivitesi kontrol ve de-etiyole bitkilere göre önemli oranda ( $p<0,05$ ) artış göstermiştir. De-etiyole ve ışıklı ortamda yetişen bitkilerde peroksidaz aktivitesi benzer değişim göstermiştir.



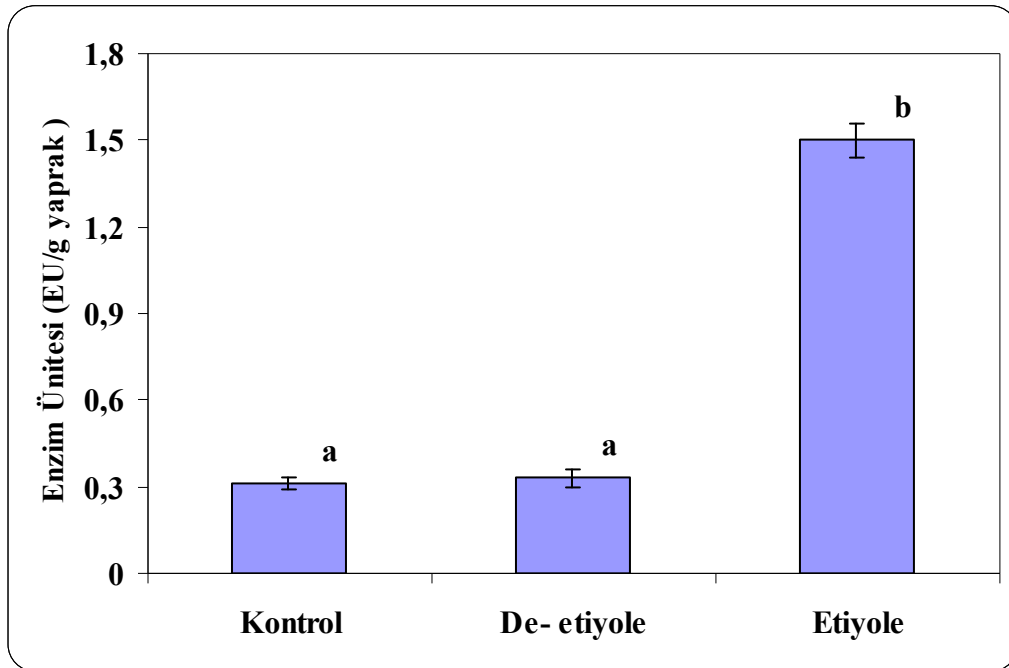
Şekil 4.2. Peroksidaz aktivitesi sonuçları

Tablo 4.2. Peroksidaz aktivitesi sonuçları

| Grup       | Enzim Ünitesi (EU/g yaprak ) |
|------------|------------------------------|
| Işık       | 3,25 a $\pm$ 0,53            |
| De-etiyole | 3,95 a $\pm$ 0,95            |
| Etiyole    | 28,81 b $\pm$ 1,08           |

#### 4.3. Askorbat Peroksidaz Aktivite Sonuçları

Askorbat peroksidaz aktivitesinin kontrol ve uygulama gruplarına göre değişimi Şekil 4.3' te gösterilmiştir. ve Tablo 4.3' te gösterilmiştir. Etiyole bitkilerde askorbat peroksidaz aktivitesi kontrol ve de-etiyole fasulye bitkilerinden daha fazla bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Kontrol ve de-etiyole bitkilerde askorbat peroksidaz aktivitesi arasında önemli fark gözlenmemiştir.



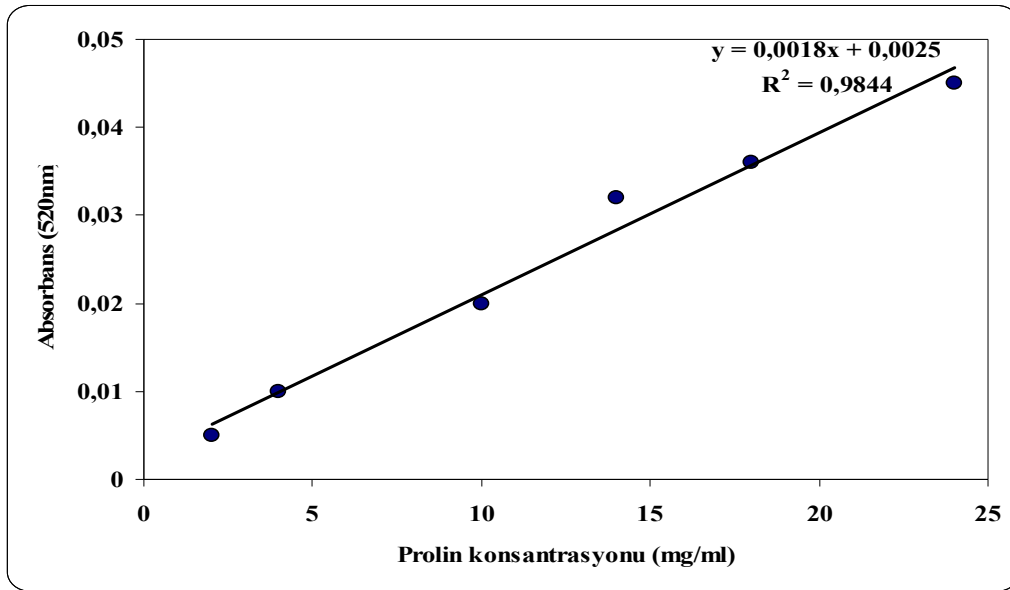
Şekil 4.3. Askorbat peroksidaz aktivitesi sonuçları

Tablo 4.3. Askorbat peroksidaz aktivitesi sonuçları

| Grup       | Enzim Ünitesi (EU/g yaprak ) |
|------------|------------------------------|
| Işık       | 0,31 a $\pm$ 0,02            |
| De-etiyole | 0,33 a $\pm$ 0,03            |
| Etiyole    | 1,5 b $\pm$ 0,06             |

#### 4.4. Prolin Standart Grafiği

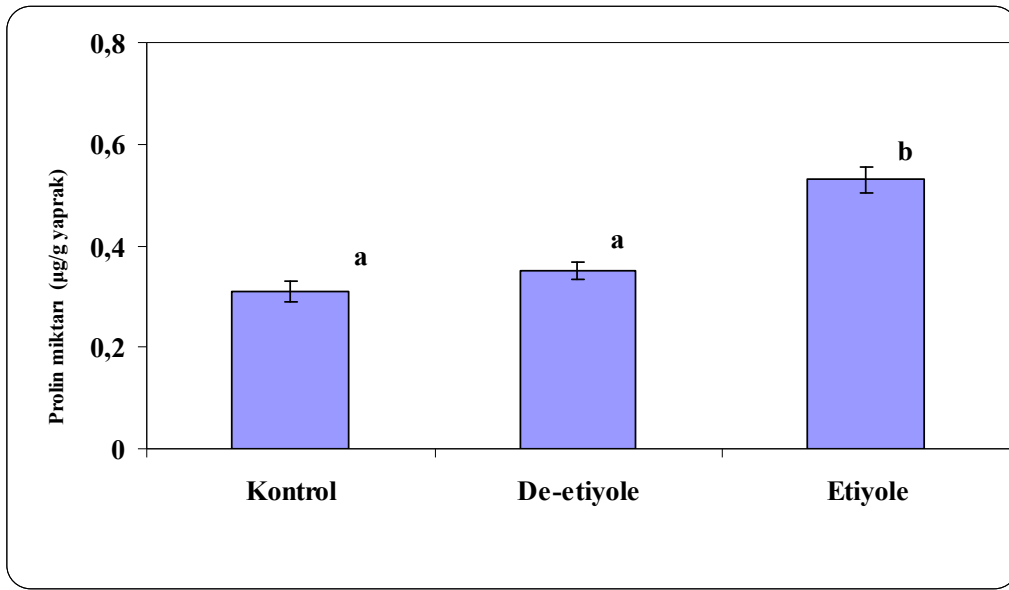
Standart grafik prolin kullanılarak hazırlandı. Şekil 4.4' de prolin miktarına karşılık gelen absorbanslar gösterildi.



Şekil 4.4. Prolin miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik

#### 4.5. Prolin Miktarı Sonuçları

Uygulama ve kontrol gruplarında prolin miktarının değişimi Şekil 4.5 ve Tablo 4.4’de gösterildi. Etiyole bitkilerde prolin miktarı diğer gruplara göre önemli oranda artmıştır. Fakat de-etiyole ve kontrol bitkileri arasında prolin miktarı bakımından önemli bir fark olmadığı görüldü.



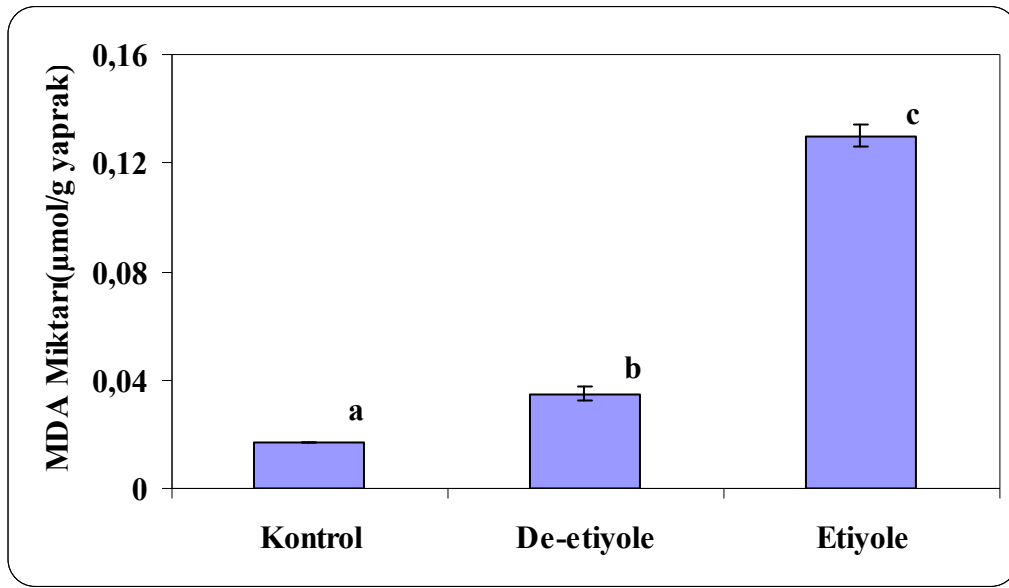
Şekil 4.5. Prolin miktarı sonuçları

Tablo 4.4. Prolin miktarı sonuçları

| Grup       | Prolin Miktarı (µg/g yaprak) |
|------------|------------------------------|
| Işık       | 0,31 a $\pm$ 0,02            |
| De-etiyole | 0,35 a $\pm$ 0,017           |
| Etiyole    | 0,53 b $\pm$ 0,025           |

#### 4.6. Malondialdehit Miktarı Sonuçları

Malondialdehit miktarının kontrol ve uygulama gruplarına bağlı olarak değişimi Şekil 4.6 ve Tablo 4.5’ de gösterilmiştir. Lipid peroksidasyonu kontrol bitkilerinde minimum miktarda gözlenirken de-etiyole ve etiyole bitkilerde önemli oranda artmıştır ( $p<0,05$ ).



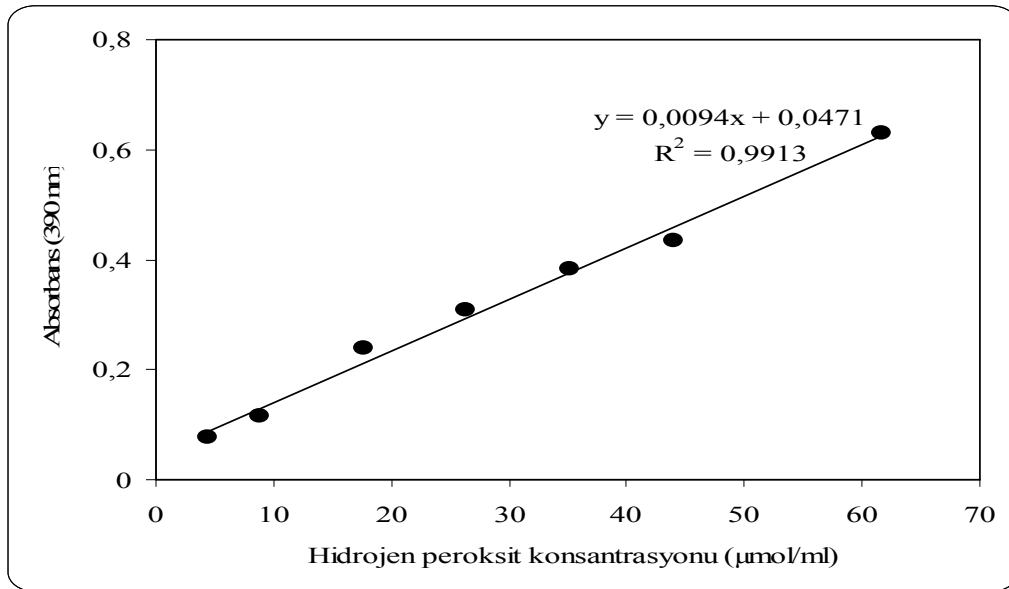
Şekil 4.6. Malondialdehit miktarı sonuçları

Tablo 4.5. Malondialdehit miktarı sonuçları

| Grup       | Malondialdehit Miktarı (µmol/g yaprak) |
|------------|----------------------------------------|
| Işık       | 20,53 a $\pm$ 0,0003                   |
| De-etiyole | 27,89 b $\pm$ 0,0023                   |
| Etiyole    | 256,06 c $\pm$ 0,0041                  |

#### 4.7. Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Standart Grafik

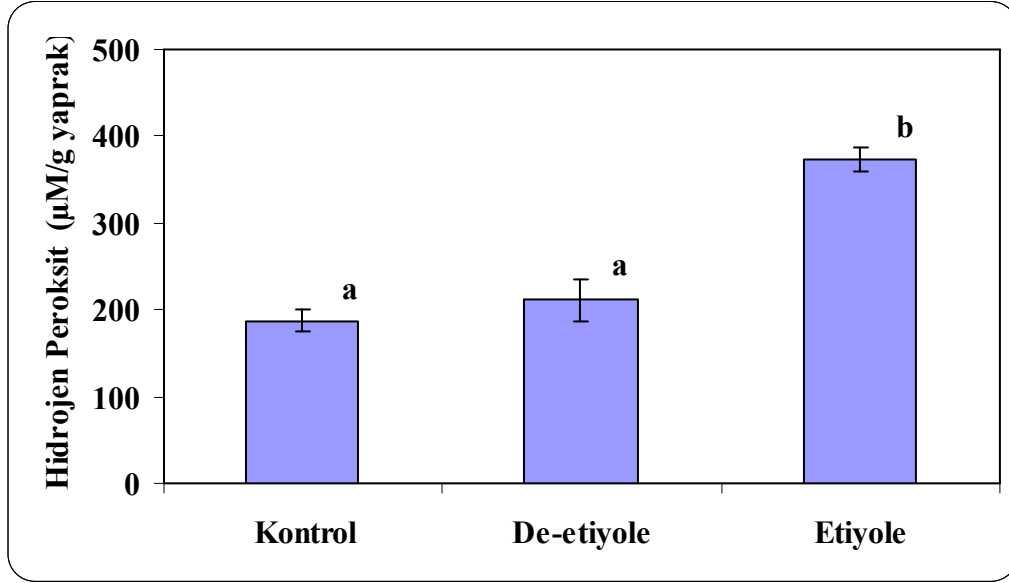
Standart grafik bölüm 3.2.8’de belirtildiği gibi hazırlandı. Kontrol ve uygulama gruplarında hidrojen peroksit miktarı hazırlanan standart grafikten yararlanarak hesaplandı. Standart çözeltilerin  $\mu\text{M}$  hidrojen peroksit karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.7’ de gösterildi.



Şekil 4.7. Hidrojen peroksit miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik

#### 4.8. Hidrojen Peroksit Miktarı Sonuçları

Kontrol ve uygulama gruplarında hidrojen peroksit miktarının değişimi Şekil 4.8 ve Tablo 4.6’da gösterildi. Etiyole bitkilerde  $H_2O_2$  miktarının maksimum miktarda olduğu, de-etiyole ve kontrol grupları arasında çok az fark olduğu gözlemlendi.



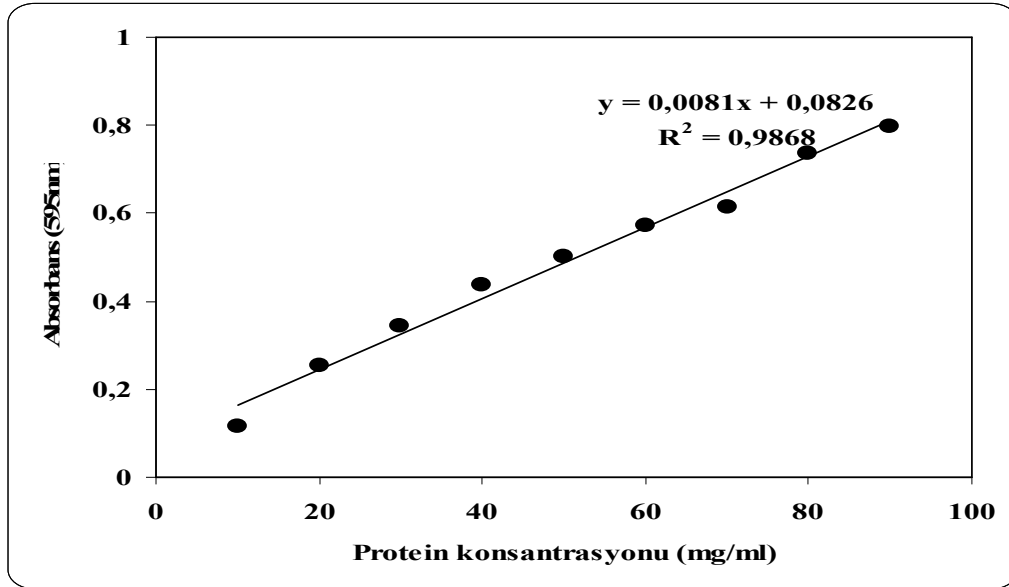
Şekil 4.8. Hidrojen peroksit miktarı sonuçları

Tablo 4.6. Hidrojen peroksit miktarı sonuçları

| Grup       | Hidrojen Peroksit Miktarı (µM/g yaprak) |
|------------|-----------------------------------------|
| Işık       | 187,74 a ± 13,25                        |
| De-etiyole | 211,14 a ± 23,96                        |
| Etiyole    | 373,54 b ± 14,44                        |

#### 4.9. Protein Standart Grafiği

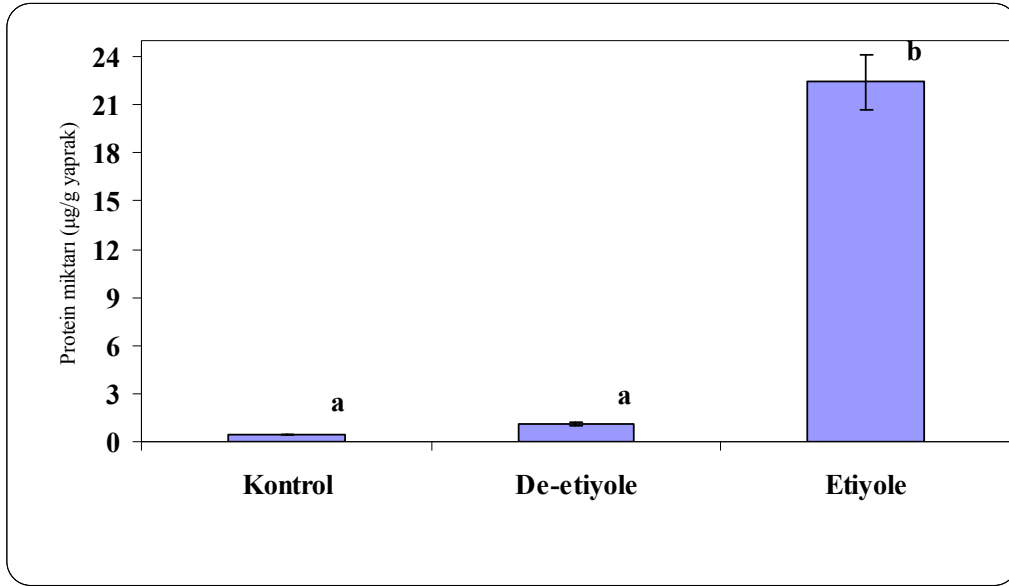
Sığır serum albumini kullanılarak standart grafik hazırlandı. Standart grafikte  $\mu\text{g}$  proteine gelen absorbanslar gösterildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Protein miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik

#### 4.10. Protein Miktarı Sonuçları

Protein miktarının kontrol ve uygulama gruplarında gösterdiği değişim Şekil4.13 ve Tablo 4.9’da belirtildi. Kontrol ve de-etiyole bitkilerdeki protein miktarı etiyole bitkilere göre çok az miktarda gözlemlendi ( $p<0,05$ ).



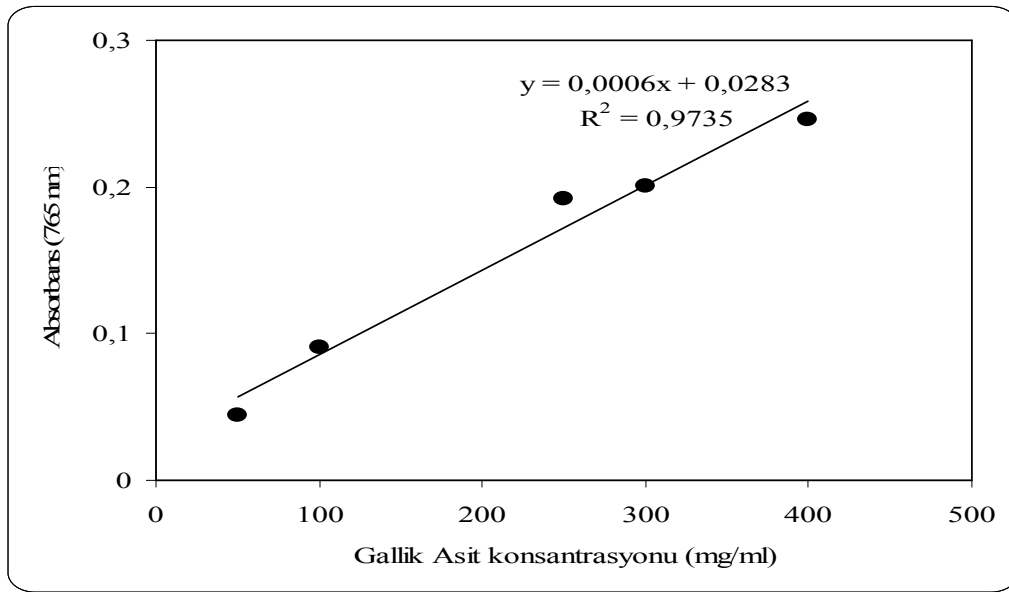
Şekil4.10. Protein miktarı sonuçları

Tablo 4.7. Protein miktarı sonuçları

| Grup       | Protein Miktarı (mg/g yaprak) |
|------------|-------------------------------|
| Işık       | 0,42 a $\pm$ 0,027            |
| De-etiyole | 1,1 a $\pm$ 0,101             |
| Etiyole    | 22,41 b $\pm$ 1,73            |

#### 4.11. Total Fenolik Bileşiklerin Miktarının Tayininde Kullanılan Standart Grafik

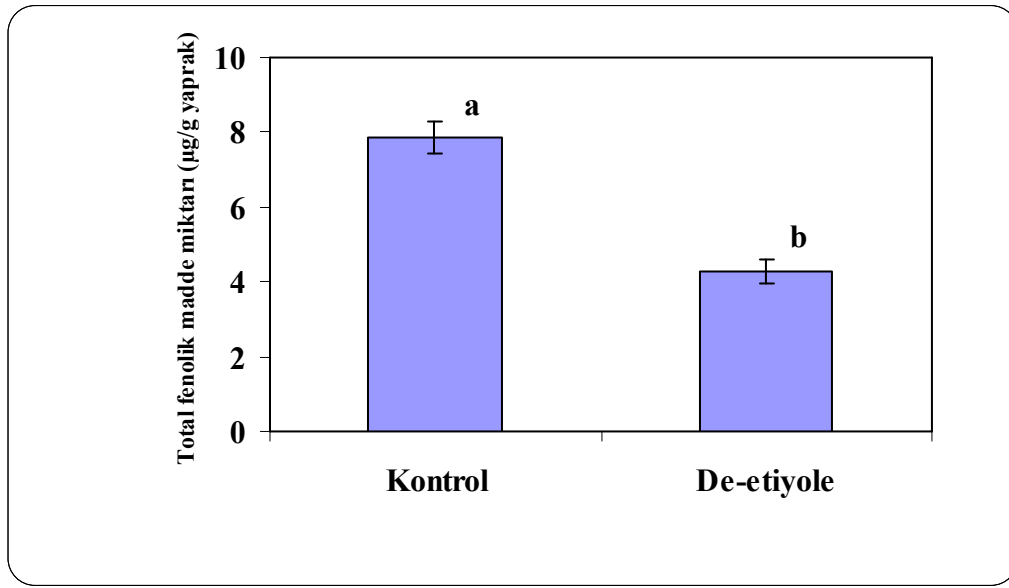
Standart grafik bölüm 3.2.10’de belirtildiği gibi hazırlandı. Kontrol ve uygulama gruplarında total Fenolik bileşik miktarları hazırlanan standart grafikten yararlanarak hesaplandı. Standart çözeltilerin  $\mu\text{g}$  gallik asite karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.11’ da gösterildi.



Şekil 4.11. Total fenolik madde miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik

#### 4.12. Total Fenolik Bileşik Miktarı Sonuçları

Total fenolik bileşiklerin miktarının kontrol ve uygulama gruplarında belirlenen değişimi Şekil 4.12 ve Tablo 4.8’de gösterildi. Etiyole bitkilerde total fenolik bileşikler gözlenmedi. De-etiyole bitkilerde total fenolik bileşik miktarı kontrol grubundan çok daha az bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).



Şekil 4.12. Total fenolik madde miktarı sonuçları

Tablo 4.8. Total fenolik madde miktarı sonuçları

| Grup        | Total fenolik bileşik miktarı (µg/g yaprak) |
|-------------|---------------------------------------------|
| Işık        | 7,87 a ± 0,43                               |
| De- etiyole | 4,29 b ± 0,32                               |

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karanlık-ışık dönüşümleri bitkilerin ilk gelişim safhasında organların yapısını ve büyümesini derinden etkiler. Toprak altındaki genç fidelerde güneş ışığına ulaşmak için hızlı büyüme meydana gelir. Buğdaygillerde bu olay çok belirgindir ve koleoptil toprak yüzeyine çıktığında büyüme ışık tarafından inhibe edilir. Bu fotomorfogenetik olay farklı fotoreseptörler vasıtasıyla gerçekleşir ve koleoptilden mesokotile sağlanan indol-3-asetik asitin azalmasıyla ilgilidir (Cona ve ark., 2003).

Hücre çeperinin kimyasal yapısı ve kalınlığı hücre büyümesini direkt etkiler. Hücre çeperinin yumuşama özellikleri çeperin yumuşama ve sertleşmesi arasındaki dengeye bağlıdır. Çeper gevşemesi enzimatik veya kimyasal ajanlarla sağlanır. Oksinlerin teşvik ettiği büyümede  $\text{OH}^\cdot$  radikalinin çeper gevşetme ajanı olarak rol oynayabileceği ileri sürülmektedir. Apoplastlarda  $\text{O}_2^\cdot$  sentezi çok olduğunda çeper peroksidazları veya plazma membranında NADP(H) oksidaz tarafından kullanılır. Hücre çeperindeki  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarı arttığında spontan olarak  $\text{OH}^\cdot$  radikaline dönüşür. Amin oksidazlar ve oksalat oksidazlar da apoplastlarda  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretimiyle ilgilidirler. Bezelye fidelerinde yapılan bir çalışmada; peroksidaz ve katalaz aktiviteleri etiyole fidelerde daha azdır. (Luhová ve ark., 2003). Işıktaki büyütülen bitkilerde peroksidaz aktivitesinin fazla olması lignin sentezinde rol oynamasından kaynaklandığı ifade edilmektedir. Etiyole bitkilere göre ışıktaki büyütülen bitkilerin daha sağlam yapılı ve boylarının kısa olması lignin senteziyle ilgili olduğu belirtilmektedir.

Prolin stres şartlarında çok yüksek seviyelerde biriktiğinden stres süresince prolinin rolü tartışmalı ve ilginç bir konudur. Prolinin enzimlerin aktif konformasyonunun korunmasında etkili olduğu ve bu yolla iyonların neden olduğu konformasyonel değişikliğe karşı enzimleri koruduğu bildirilmiştir (Cherian ve ark. 2006). Prolin gibi bileşikler ozmotik denge ajanı ve hücre içi yapıların korunmasında rol alırlar. Bu bileşikler hücrel osmolaritede artışa neden olur. Böylece hücreye su girişini yönlendirebilir ve dışarıya çıkışını azaltabilir. Bu da hücre uzaması için gerekli turgorun sürdürülmesini sağlar. Osmoz veya dehidrasyon stres şartlarında membran bütünlüğü ve protein denatürasyonunu önlemek için sürdürülmelidir. Prolin protein yapılarını ve

aktivitelerini korumak için enzimlerle etkileşebilir. Prolin sentezi pH ve redoks düzenlenmeleriyle de alakalıdır. Prolin stresten iyileşme süresince karbon, azot ve enerji için yedek kaynak olarak da rol oynar (Kavi Kishor ve ark. 2005).

Prolin ışık hasarının teşvik ettiği serbest radikallere karşı tilakoyit membranları korumada da ilgilidir. Değişik osmolitler arasında prolin serbest radikallerin tetiklediği hasarları ve singlet oksijene karşı bitkileri koruyan tek moleküldür. Prolin singlet oksijen söndürücü ve hidroksil radikalini uzaklaştırıcı bir rol oynayabildiği için membranlar kadar protein ve DNA' yı stabilize edebilir. Sorbitol, mannitol, myo-inositol ve prolin için hidroksil radikali giderme aktivitesi ölçülmüş prolinin etkili bir hidroksil radikal giderici olduğu bulunmuştur. Prolin sadece redoks sinyallerinde önemli bir molekül değildir aynı zamanda bütün bitkilerde tuz, metal ve dehidrasyon stres şartları altında oluşan ROS'ların etkili bir gidericisidir. CAT, POD ve PPO enzim aktiviteleri *in vivo* da prolin tarafından artırılır. Bununla birlikte enzimleri aktive etmede prolinin rolü konformasyonel değişikliklerle sınırlı olduğu ifade edilmektedir (Kavi Kishor ve ark. 2005). Bu çalışmada, lipid peroksidasyonunun fazla olduğu etiyole bitkilerde prolinin fazla olması prolinin çok yönlü fonksiyonlarıyla ilgilidir.

Kültürü yapılan bezelyenin 12 çeşidinde ve yabani bezelyenin bir alt türünde aminoksidaz, POD ve CAT aktiviteleri çalışılmıştır. Etiyole bitkilerle kıyaslandığında tüm yeşil bitkilerde POD ve CAT aktiviteleri yüksek bulunmuştur. Etiyole bitkilerde POD aktivitesindeki azalma lignin biyosentezindeki azalmayla ilgili olabileceği belirtilmektedir (Luhová ve ark. 2003).

Bu çalışmada, etiyole bitkilerde CAT, POD ve APX aktivitelerinin yüksek olması hidrojen peroksit üretimindeki artışla da ilgilidir. Bu enzimler katalizledikleri reaksiyonlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanırlar. Literatürlerde hidrojen peroksitle malondialdehit arasında doğrudan bir ilişki olduğu ve yüksek hidrojen peroksit konsantrasyonunun lipid peroksidasyonuna neden olduğu belirtilmektedir (Hajlaoui ve ark., 2009). Değişik stres şartlarına maruz kalan bitkilerde hidrojen peroksit konsantrasyonunun arttığı görülmüştür. Hidrojen peroksit ortamda süperoksit ve geçiş elementlerinin ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{1+}$  v.b ) olması durumunda daha aktif radikal olan

hidroksil radikaline dönüşebilir. Hidroksil radikali de membranlarda zincir reaksiyonlarını başlatarak lipid peroksidasyonuna neden olur (Luhová ve ark., 2003; Hajlaoui ve ark., 2009). Bu çalışmada etiyole bitkilerde hidrojen peroksit miktarı ve lipid peroksidasyonu önemli oranda artış göstermiştir.

Fenolik bileşikler sadece besin sistemlerinde oksidasyonu etkili bir şekilde önlerler ve insan vücudunda oksidatif hasarlara karşı koruyucu faktör olarak da iş görürler (Bartolomé ve ark., 1997). Belirli fenolik bileşiklerin sentezi, oksidasyonu ve miktarı stres çeşidine bağlı olarak değişmektedir (Pennycooke ve ark., 2004). Çimlenme sırasında mercimekte procyanidin-tipi bileşiklerde önemli yapısal değişiklikler meydana gelmesine rağmen, fenolik bileşik içeriğinde kayda değer bir değişiklik görülmemiştir (Bartolomé ve ark., 1997). Bu çalışmada, yeşil ve de-etiyole fasulye yapraklarında total fenolik bileşikler belirlenmiş ve yeşil bitki yapraklarında daha fazla total fenolik bileşik olduğu gözlenmiştir. Etiyole elma gövdelerinde (Sivaci ve ark., 2007) ve etiyole *Cichorium endivia* (Goupy ve ark., 1990) yapraklarında fenolik bileşiklerin azaldığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada etiyole bitki yapraklarında fenolik bileşikler Folin Ciocalteu yöntemiyle tespit edilememiştir. Fakat etiyole, de-etiyole ve yeşil yapraklarda total fenolik bileşiklerin tedrici bir şekilde artması fenolik bileşik sentezinde ışığın doğrudan rol oynadığını göstermektedir. Fenolik madde içeriği ışık ve ışık yoğunluğuyla değişmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Angelini, R., Manes, F., Federico, R., 1990. Spatial and functional correlation between daimine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta*, 182, 89-96.
- Bartolomé, B., Estrella, I., Hernández, T., 1997. Changes in phenolic compounds in lentils (*Lens cullinaris*) during germination and fermentation. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 205, 290- 294.
- Bates, L.S., Waldren R.P., Teare I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39, 205-207.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248.
- Cherian, S., Reddy, M.P., Ferreira, R.B., 2006. Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance: progress and future prospects. *Biologia plantarum*, 50 (4), 481-485.
- Cona, A., Cenci, F., Cervelli, M., Federico, R., Mariottini, P., Moreno, S., Angelini, R., 2003. Polyamine Oxidase, Hydrogen Peroxide-Producing Enzyme, Is Up-Regulated by Light and Down-Regulated by Auxin in the Outer Tissues of the Maize Mesocotyl. *Plant Physiology*, 131, 803-813.
- Çakmak, I., Marschner, H., 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant physiology*, 98, 1222-1226.
- Demirci, Ö., 2006. *Phanerochaete chrysosporium*'un antioksidatif sistem üzerine astrazon kırmızı fbl tekstil boyasının etkisi. İnönü Üniversitesi. (Yüksek Lisans Tezi). Fen bilimleri enstitüsü. Malatya
- Duncan, B.D., 1955. Multiple range and multiple F-tests. *Biometrics*. p. 1- 42.
- Eryılmaz, F., 2007. Bakır (Cu) uygulanmış mısır (*Zea mays* L.) fidelerindeki antioksidan aktivitelerin fizyolojik ve anatomik yönden incelenmesi. (Doktora Tezi). İstanbul Üniversitesi. Fen bilimleri Enstitüsü. İstanbul.
- Graham, L.E., Graham, J.M., Wilcox, L.W., 2008. Bitki Biyolojisi Çeviri edtorü: Prof.Dr. Kani Işık. Palme Yayınları . Ankara, s.202-204.
- Goupy, P.M., Varoquauaz, P.J.A., Nicolas, J.J., Macheix, J.J., 1990. Identification and localization of hidroxicinnamoyl and flavonol derivatives from endive (*Cichorium endivia* L. cv. Geante Maraichere). *J. Agric. Food Chem.*, 38, 2116-2121.
- Hajlaoui, H., Denden, M., El Ayebe, N., 2009. Changes in fatty acids composition, hydrogen peroxide generation and lipid peroxidation of salt-stressed corn (*Zea mays* L.) roots. *Acta Physiol Plant* 31, 787-796.
- Havir, E.A., Mchale, N.A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol*, 84, 450-455.
- Kadıoğlu, A., Kaya, Y., 2005. Genel Botanik. Kültür Eğitim Vakfı Yayınevi. Erzurum, s. 156-250.
- Karabal, E., Yücel, M., Öktem, H.A., 2003. Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. *Plant Science*, 164, 923-925.

- Karanlık, S., 2001. Değişik buğday genotiplerinde tuz stresine dayanıklılık ve dayanıklılığın fizyolojik nedenlerinin araştırılması. (Doktora Tezi), Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Karataş, İ., 2007. *Troparolum majus* L. yapralarının uzun süre karanlıkta bırakıldıktan sonraki fotosentez yapabilme yeteneğine hormonların etkisinin incelenmesi. (Yüksek Yisans Tezi), GOÜ. Fen Bilimleri Enstitüsü. Tokat.
- Kavi Kishor, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Sri Laxmi, P., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. Current Science 88 (3), 424-439.
- Keser, G., 2005. *Nasturtium officinale* R. Br.'de kurşunun strese bağlı enzimlerin aktivitelerine, gelişmeye, mineral ve klorofil içeriğine etkileri. (Doktora Tezi). Çukurova Üniversitesi. Fen bilimleri Enstitüsü. Adana.
- Kocaçalışkan, İ., 2008. Bitki hormonları. Bitki Fizyolojisi. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara. s. 129-145.
- Kocaçalışkan, İ., 2008. Stres fizyolojisi. Bitki Fizyolojisi. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara. s. 219-222.
- Levitt, J., 1980. Responses of plants to environmental stress, I. Chilling, freezing and high temperature stresses, p.607, Academic press, Inc., 2<sup>nd</sup> edition.
- Luhová, L., Lebeda, A., Hedererova, D., Pec, P. 2003. Activites of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum* L. under different light conditions. Plant Soil Environ., 49 (4), 151-157.
- Parida, A.K., Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants a review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 60, 324- 349.
- Pennycooke, J.C., Cox, S., Stushnoff, C., 2005. Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia × hybrida*). Environmental and Experimental Botany, 53, 225-232.
- Polat, S., 2007. *Triticum* L'un bazı çeşitleri ve *Aegilops* L. Türünde düşük sıcaklıkta bazı antioksidan enzim aktivitelerinin ve fizyolojik parametrelerin araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Pomysk, M.M., Kontek, R., Janas, K.M. 2009. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72, 6-602.
- Stratil, P., Klejdus, B., Kuban, V., 2006. Determination of total content phenolic compaunds and their antioxidant activity in vegetables-evaluation of spectrophotometric methods. J.Agric. Food Chem., 54, 607-612.
- Symons, G.M ve Reid, J.B., 2003. Interactions between light and plant hormones during de-etilation. J. Plant Growth Regulation, 22, 3-14.
- Sivaci, A., Sökmen, M., Günes, T., 2007. Biochemical changes in green and etiolated stems of MM106 apple rootstock. Asian Journal of Plant Sciences, 6(5), 839-843.
- Taiz, L. ve Zeiger, E. 2008. Stres fizyolojisi. Bitki Fizyolojisi, Üçüncü baskıdan çeviri. Editör: Prof. Dr. İsmail Türkan. Palme Yayıncılık. Ankara, s. 591-602.
- Toprak, G., 2007. Cd (II) ve Cu (II) ağır metal stresi uygulanan *Phanerochaete chrysosporium*'da antioksidan enzimlerde değişen miktarların belirlenmesi. (Yüksek lisans tezi). Erciyes Üniversitesi. Fen bilimleri enstitüsü. Kayseri.

- Ulus, Y., 2007. Farklı dozlardaki kadmiyumun maydanoz (*Petroselinum hortense Hoffm*) bitkisinde fotosentetik pigmentler ve oksidatif enzim aktivitelere etkisi (Yüksek Lisans Tezi) GOÜ. Fen Bilimleri Enstitüsü. Tokat.
- Velikova, V., Yordanov, I., Edrava, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151, 59-66.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler:

Adı Soyadı : Bülent AKGÜL  
 Doğum Tarihi ve Yer : 17/07/1979 - Yıldızeli/ SİVAS  
 Medeni Hali : Evli  
 Yabancı Dili : Almanca  
 Telefon : 0 533 251 81 55  
 e-mail : [fabza58@hotmail.com](mailto:fabza58@hotmail.com)

### Eğitim

| Derece        | Eğitim Birimi                                | Mezuniyet Tarihi |
|---------------|----------------------------------------------|------------------|
| Yüksek Lisans | GOÜ Fen Bilimleri Enstitüsü                  | 2010             |
| Lisans        | 19 Mayıs Üni. Eğt.Fak. Biyoloji Öğretmenliği | 1998             |
| Lise          | Sivas Atatürk Lisesi                         | 1994             |

### İş Deneyimi

| Yıl        | Yer                     | Görev             |
|------------|-------------------------|-------------------|
| 1998- 2000 | Kastamonu/ Küre         | Öğretmen          |
| 2000-2001  | Siirt / Eruh            | Y. Subay Öğretmen |
| 2001- 2003 | Kastamonu/ Küre         | Öğretmen          |
| 2003- 2006 | Tokat/ Artova           | Öğretmen          |
| 2006-..... | Tokat İbn-i Kemal İ.Ö.O | Öğretmen          |

### Yayınlar:

1.....

### Hobiler:

Futbol , kitap okuma...