

DOI: 10.5578/fmbd.66807

## UV-C Stresinin 6-Benzilaminopürin Varlığında Çoğaltılmış *Amsonia orientalis*'in *In vitro* Sürgün Gelişimi ve Antioksidan Enzimleri Üzerine Etkileri

Yonca Yüzügüllü Karakuş<sup>1</sup>, Halil İ. Toygar<sup>1</sup>, Arda Acemi<sup>1</sup>, Yonca Avcı Duman<sup>2</sup>, Fazıl Özen<sup>1</sup><sup>1</sup>Kocaeli Üniversitesi, Fen - Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kocaeli<sup>2</sup>Kocaeli Üniversitesi, Fen - Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Kocaeli

e-posta: yonca.yuzugullu@kocaeli.edu.tr

Geliş Tarihi: 13.11.2017 ; Kabul Tarihi:19.04.2018

### Özet

Bu çalışmada abiyotik faktörlerden biri olan UV-C stresinin 6-benzilaminopürin varlığında çoğaltılmış *Amsonia orientalis*'in *in vitro* sürgünleri üzerindeki etkileri, sürgünlerin morfolojik özellikleri, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen peroksit) ve MDA (malondialdehit) seviyeleri ile antioksidan enzimleri analiz edilerek irdelenmiştir. Test edilen 3,47 (15 dk), 6,94 (30 dk) ve 13,87 (60 dk) kJ m<sup>-2</sup>'lik UV-C radyasyon dozlarının hepsi sürgün uzunluğu ile sürgün sayısında kontrole (UV-C uygulanmamış bitki) oranla düşüşe sebep olmuştur. Radyasyon kaynaklı oluşan bu stres 6-benzilaminopürin varlığında sürgün gelişimini yavaşlatsa da tamamen durdurmamıştır. UV-C radyasyon uygulamaları antioksidan enzimler üzerine farklı etkiler göstermiştir. SOD (süperoksit dismutaz) aktivitesi artan radyasyon dozuna bağlı olarak kontrole göre önemli ölçüde azalırken, POD (peroksidaz) aktivitesinde artış gözlenmiştir. CAT (katalaz) aktivitesinin ise radyasyondan önemli ölçüde etkilenmediği görülmüştür. Artan UV-C dozlarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve MDA seviyelerinin benzer olarak arttığı bulunmuştur. Elektroforetik analizler sonucunda SOD enzimi için üç farklı izozim (Cu/Zn-SOD, Fe-SOD ve Mn-SOD) tespit edilmiş olup, artan UV-C stresinin bitkinin Cu/Zn-SOD aktivitesini tamamen inhibe ettiği gözlenmiştir. Sonuçlar bitkinin UV stresine karşı gösterdiği savunma mekanizmasında peroksidazların incelenen diğer antioksidan enzimlere göre öncelikli rol aldığına işaret etmektedir.

### Anahtar kelimeler

*Amsonia orientalis*;  
katalaz; peroksidaz;  
süperoksit dismutaz;  
UV stresi

## The Effects of UV-C Stress on *In vitro* Shoot Development and Antioxidant Enzymes of *Amsonia orientalis* Cultured in the Presence of 6-Benzylaminopurine

### Abstract

In this study, the effects of UV-C stress –being one of the abiotic stress factors– on *in vitro* shoot development and antioxidant enzymes of *Amsonia orientalis* cultured in the presence of 6-benzylaminopurine were examined based on the analysis of morphometric parameters, antioxidant enzymes, MDA (malondialdehyde) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents of *in vitro* shoots. All tested UV-C radiation dosages; 3.47 (15 min), 6.94 (30 min) and 13.87 (60 min) kJ m<sup>-2</sup> reduced shoot length and shoot number compared to the control (non UV-C-applied). In the presence of 6-benzylaminopurine, radiation-sourced stress decreased shoot development but did not totally inhibit. UV-C radiation exerted different effects on antioxidant enzymes. It was found that SOD (superoxide dismutase) activity was reduced with respect to increasing radiation doses while POD peroxidase activity was enhanced. CAT activity was not significantly affected by radiation. Long-term UV-C exposure has been shown to increase similarly both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA levels. Electrophoretic analysis showed that there are three SOD isozymes (Cu/Zn-SOD, Fe-SOD ve Mn-SOD) found and Cu/Zn-SOD was totally inhibited under all UV-C treatments. The results indicate that peroxidases play more important role than the other antioxidant enzymes in the plant's defense mechanism against UV stress.

### Keywords

*Amsonia orientalis*;  
catalase; peroxidase;  
superoxide dismutase;  
UV stress

## 1. Giriş

*Amsonia orientalis* mavi-mor renkli ve oldukça sık dizilişli çiçeklere sahip çiçek durumundan dolayı Batı Avrupa ve Amerika'daki bahçelerde süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Özen 2002). Ülkemizde ise Balıkesir, Bursa ve İstanbul olmak üzere üç yerde rapor edilmiştir (Özen 2006). *Amsonia* türleri diğer Apocynaceae (Zakkumgiller) familyası üyeleri gibi lateksli gövdeye sahiptirler. *Nerium* gibi kimi akrabalarının lateksi zehirli alkaloidlere sahip olsa da *Amsonia* türlerinin lateksi nisbeten zehirsizdir. Bu lateksin insanlara karşı zararlı olduğu bilinir; fakat bitkinin geyik ve diğer memeliler tarafından yenmesine engel olur. Bitkinin bu özelliği onun bahçelerde ve peyzaj düzenlemelerinde kullanılmasında avantaj sağlar (Darke 2005). *A. orientalis*'in bünyesinde Apocynaceae familyasının diğer birçok üyesi gibi tıbbi ve ekonomik öneme sahip çok sayıda glikozitler ve glikoalkaloitler bulundurduğu bilinmektedir (Itoh vd. 2002). Kimyasal yapıları tanımlanmış olan bu maddelerin özellikle kalp ve kanser hastalıkları olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Özen 2006). Bitki aynı zamanda antimikrobiyal aktiviteye de sahiptir (Akyalçın vd. 2006). Yakın bir geçmişte yayınlanan bulgularda bitkinin *in vitro* sürgün çoğaltımı ve elde edilen sürgünlerden yüksek miktarda kallus üretimi gerçekleştirilmiş olup (Acemi vd. 2012); bu kallus dokularının ileriki çalışmalar için hücre süspansiyon kültürlerinin kurulumunda kullanılması planlanmaktadır. Ayrıca bitkinin yüksek kapasitede *in vitro* çoğaltımı çeşitli bitki düzenleyicilerinin varlığında sağlanmış ve en fazla sürgün çoğaltımı sağlayan 6-benzilaminopürin (BAP) konsantrasyonu  $1 \text{ mg l}^{-1}$  olarak bulunmuştur (Acemi vd. 2013). BAP *in vitro* çoğaltım çalışmalarında sıkça kullanılan ve sürgün çoğaltımı üzerine güçlü etkisiyle bilinen bir yapay sitokinidir. BAP'ın aynı zamanda çeşitli çalışmalarda, bitkilerde tuz ve su streslerinin ortaya çıkardığı olumsuz etkileri yatıştırdığı da bildirilmiştir (Rulcová ve Pospíšilová 2001, Gurmani vd. 2011).

*Amsonia orientalis*, başta abiyotik stres şartları ve insan faktörü olmak üzere çeşitli nedenlerle giderek tükenmektedir (Acemi vd. 2017). Bitkinin stres şartlarına verdiği tepkilerin aydınlatılması, bitkinin popülasyon yoğunluğunun artırılması, doğaya yeniden kazandırılması ve bu türün tükenme tehlikesinin ortadan kaldırılması için önemlidir.

Güneş ışın tiplerinden biri olan UV (Ultraviyole) ışınları dalga boylarına göre üç gruba ayrılır: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) ve UV-C (100-280 nm). Bunlardan canlılar için en zararlı olanı UV-C olarak bilinmektedir (Tevini 2004). Çoğunlukla insan etkileri ile meydana gelen ozon tabakasındaki incelmeler sonucu, yeryüzüne düşen UV miktarında artış yaşanmaktadır (Georgieva vd. 2015). Moleküler seviyede UV radyasyonuna maruz kalmak, canlılar için ölümcül sonuçlar doğurabilir. DNA, RNA, protein, lipid ve bitki hormonları gibi UV absorblayan biyolojik moleküllerle etkileşimleri nedeniyle UV, önemli çevresel stres faktörüdür (Caldwell vd. 1998). Aminoasitleri hedef alarak protein, enzimlerin yapılarını ve lipid peroksidasyonu ile membran yapısını bozduğu tespit edilmiştir (Hightower vd. 1994). Yaptığı etkiler sonucu membrandaki taşıyım engellenmektedir. Bu durum da fotosentetik aktiviteyi olumsuz yönde etkilemektedir (Allen vd. 1998).

Bu çalışmada, son zamanlarda hava kirleticileri nedeniyle ozon tabakasındaki incelmeler sonucu yeryüzüne ulaşan UV ışınlarının artmasına bağlı olarak artabilecek UV-C radyasyonunun muhtemel etkileri önemli bir süs bitkisi ve tıbbi bitki olan *A. orientalis*'de *in vitro* sürgün gelişiminde kullanılan ve sentetik bir sitokin olan BAP uygulamasıyla birlikte incelenmiştir. Bu amaçla, sürgün gelişimi, antioksidan enzim profilleri, malondialdehit ve hidrojen peroksit içerikleri analiz edilmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1 Bitkinin *in vitro* çoğaltımı ve UV-C stresinin oluşturulması

Eksplant kaynağı olarak Kocaeli Üniversitesi, Umuttepe Kampüsü'nde bulunan koruma parselinde yetiştirilen bitkiler kullanılmıştır. Bu bitkilerden alınan nodal eksplantların önce %70 (v/v) etil alkol içerisinde 2 dakika ardından %1 (v/v) sodyum hipoklorit içerisinde 10-12 dakika bekletilip yüzeysel sterilizasyonları sağlanmıştır. Sonrasında eksplantlar 1 mg l<sup>-1</sup> 6-benzilaminopürin (BAP) içeren Murashige ve Skoog (MS) (1962) sürgün çoğaltım ortamına ekilmiş ve 1 aylık kültür periyodu sonunda denemelerde kullanılacak nodları içeren sürgünler elde edilmiştir. Kullanılan BAP konsantrasyonu bitkide optimum büyümeyi sağladığı için tercih edilmiştir (Acemi vd. 2013). Elde edilen sürgünlerden alınan nodal eksplantlar 1 mg l<sup>-1</sup> BAP içeren MS besi ortamında kültüre alınmışlar ve UV-C uygulamalarına maruz bırakılmışlardır. Denemelerde 1 mg l<sup>-1</sup> BAP ilaveli ve ilavesiz olmak üzere iki adet kontrol grubu kullanılmıştır. Bitkiler kültür periyodunun 1., 15. ve 30. günlerinde 15, 30 ve 60 dakika olmak üzere 3 ayrı grup halinde, toplamda 3 defa olmak üzere 30 cm mesafeden, steril kabin içerisinde UV-C radyasyonuna maruz bırakılmıştır. Kullanılan UV-C kaynağı bir floresan (Sylvania, G15W) olup en fazla 253,7 nm dalgaboyunda etkinlik göstermektedir. Bitkinin maruz kaldığı UV-C radyasyon seviyeleri her bir uygulamada 3,47 (15 dk), 6,94 (30 dk) ve 13,87 (60 dk) kJ m<sup>-2</sup> olarak belirlenmiştir (Severo vd. 2015). Bir aylık kültür periyodunun sonunda gerekli morfolometrik ölçümler (sürgün uzunluğu ve sürgün sayısı) yapılmıştır. Kültür şartları büyütme kabininde 80 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fotosentetik foton yoğunluğundaki ışık altında 16/8 sa ışıklandırma periyodunda, 23±1 °C olarak uygulanmıştır. Tüm stres faktörü denemelerinde aynı kültür şartları uygulanmıştır.

### 2.2 Ham ekstraktın hazırlanması

Hedeflenen çalışmaları gerçekleştirmek üzere artan UV-C stresi varlığında yetiştirilen bitki materyallerinden ham ekstraktlar hazırlanmıştır (Acemi vd. 2017). Bitki örnekleri 20 katı hacimdeki 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tampon ile homojenize edilmiştir. Homojenat kaba filtre kağıdı

ile filtre edilmiş ve 14000 × g, 4 °C'de 15 dakika santrifüj (Sigma 4-16 K) edilmiştir. Süpernatant, bitkinin artan UV stresi varlığında biyokimyasal parametrelerinin incelenmesi için kullanılmıştır.

### 2.3 Antioksidan enzim aktivitelerinin incelenmesi

Artan UV-C stresi varlığında antioksidan enzim aktiviteleri (SOD; süperoksit dismutaz, E.C. 1.15.1.1., POD; peroksidaz, E.C. 1.11.1.X, CAT; katalaz, E.C. 1.11.1.6) spektrofotometrik ve elektrofotometrik olarak incelenmiştir. SOD aktivitesi; NBT (Nitroblue tetrazolium)'nin 560 nm'de fotokimyasal indirgenmesinin incelenmesi ile belirlenmiştir (Beauchamp ve Fridovich 1973). Reaksiyon, 75 mM NBT, 18 mM L-metiyonin, 0,1 mM EDTA, 2 µM riboflavin ve enzim içeren toplam 3 mL 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0) gerçekleştirilmiştir. Riboflavin en son karanlık ortamda ilave edilmiş ve reaksiyon karışımı 30 W gücünde bir floresan ışığı altında 15 dakika inkübe edilmiştir. UV-C ile muamele edilmeyen bitki ekstraktları kontrol olarak kullanılmıştır. Bir ünite SOD aktivitesi %50 indirgenme inhibisyonunu sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. POD aktivitesi; pirogalol oksidasyon yöntemi ile incelenmiştir (Targovnik vd. 2012). Reaksiyon; 10 mM pirogalol, 100 µL seyreltilmiş enzim ve 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren toplam 2 mL 50 mM fosfat tamponu içinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 25 °C'de 5 dakika inkübe edilmiş ve enzimatik reaksiyon 1 mL 2,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile sonlandırılmış 425 nm'de artan absorbanslar kaydedilmiştir. Enzim aktivitesi; 420 nm'de fosfat tampon içinde pirogalol için ε (ekstinksiyon katsayısı) 2640 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> alınarak eşitlik 1'de gösterildiği gibi hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi; 5 dakikada 1 mg purpurogalin oluşması için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Valetti ve Picó 2013). CAT aktivitesi; 240 nm'deki absorbans azalması takip edilerek ölçülmüştür. Reaksiyon 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve uygun oranda seyreltilmiş enzimi içeren toplamda 1 mL'lik karışımın 37 °C'de 2 dakika inkübe edilmesi ile gerçekleştirilmiş, reaksiyon 1M HCl (1 mL) ile sonlandırılmıştır. Bir ünite enzim aktivitesi 1 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parçalanması için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için ε değeri 0,039 cm<sup>2</sup>

$\mu\text{mol}^{-1}$ ) (Aebi 1974). Tüm örnekler için protein miktarı belirlenmesi Bradford (1976) yöntemine göre yapılmıştır. Enzim aktivitesi aşağıdaki formülden hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim aktivite (U/mg)} = \frac{\Delta\text{OD}/\Delta t \times \text{Reaksiyon hacmi (ml)} \times \text{Seyreltme faktörü}}{\epsilon \times \text{İnkübasyon süresi (dk)} \times \text{Enzim hacmi (ml)}}$$

## 2.4 Lipid peroksidasyonun belirlenmesi

Lipid peroksidasyon seviyesi; malondialdehit (MDA) içeriğinin belirlenmesine göre gerçekleştirilmiştir (Turan ve Tripathy 2013). Buna göre 0,2 mL ham enzim ekstraktı ile 0,4 mL tiyobarbitürik asit (TBA) reaktifi karıştırılmıştır. TBA reaktifi 0,25 M HCl içinde %15 (w/v) TCA (trikloroasetik) asit ve %0,375 (w/v) TBA içermektedir. Karışım 95 °C'de 15 dakika karıştırılmış ardından buz banyosunda soğutulmuş ve  $13000 \times \text{g}'de$  10 dakika santrifüj edilmiştir. Örneklerin 532 ve 600 nm'deki absorpsanları kaydedilmiştir. MDA içeriği  $\epsilon$  değeri  $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  alınarak aşağıdaki formülden hesaplanmıştır.

$$\text{MDA miktarı } (\mu\text{mol/g}) = [(A_{532} - A_{600})/156] \times 10^3 \times \text{Seyreltme faktörü}$$

## 2.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinin belirlenmesi

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği; potasyum iyodür (KI) reaksiyonu sonrası spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Reaksiyon karışımı toplam 2,5 mL 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0) %0,1 (w/v) TCA, 1 M KI ve 0,5 mL ham enzim ekstraktı içermektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini hesaplamak için bilinen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında standart eğri hazırlanmıştır (Doupis vd. 2011).

## 2.6 Elektroforetik analizler

SOD, POD ve CAT enzimlerinin elektroforetik analizleri denatüre edici özelliği olmayan %4 (v/v) yükleme ve %12 (v/v) yürütme jeli hazırlanarak, 4 °C'de, ilk 10 dakika 100 V ardından 1-3 saat 120 V'da Biorad mini protean II elektroferez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizde her bir kuyucuğa 20  $\mu\text{g}$  bitki ekstraktı yüklenmiştir. Jel üzerinde SOD aktivite tayini için yürütülen jel 30 saniye aralıklarla 3 defa saf su ile yıkanıp ardından 750  $\mu\text{M}$  NBT, 0,13 mM metiyonin ve 20 mM riboflavin ile iki adet 30 W'lık floresan ışık altında bantlar belirginleşene kadar inkübe edilmiştir. SOD bantları koyu mavi-mor arka alanda transparan

olarak belirlenmiştir. SOD'un izoformlarını belirlemek için yürütülen jeller ayrı ayrı 8 mM KCN ve 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edilmiştir (Pan vd. 2006). Jel üzerinde POD aktivitesi, yürütülen jelin; oda sıcaklığında 50 mM (pH 7,0) fosfat tamponunda hazırlanan %0,53 (w/w) pirogalol ve %0,04 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edilmesi sonucu turuncu-kahverengi bantların oluşumu ile takip edilmiştir (Valetti ve Picó 2013). CAT aktivitesi ise, yürütülen jelin; 50 mM (pH 7,0) sodyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 5 dakikalık inkübasyonu ardından koyu mavi arka alanda transparan bantlar görünene dek 50 mM (pH 7,0) sodyum fosfat tamponunda hazırlanan 30 mM TEMED (Tetrametiletildiamin), 2,5 mM NBT, 5 mM riboflavin içeren çözeltide inkübasyonu sonucu belirlenmiştir (Manchenko 2002).

## 2.7 İstatistiksel analiz

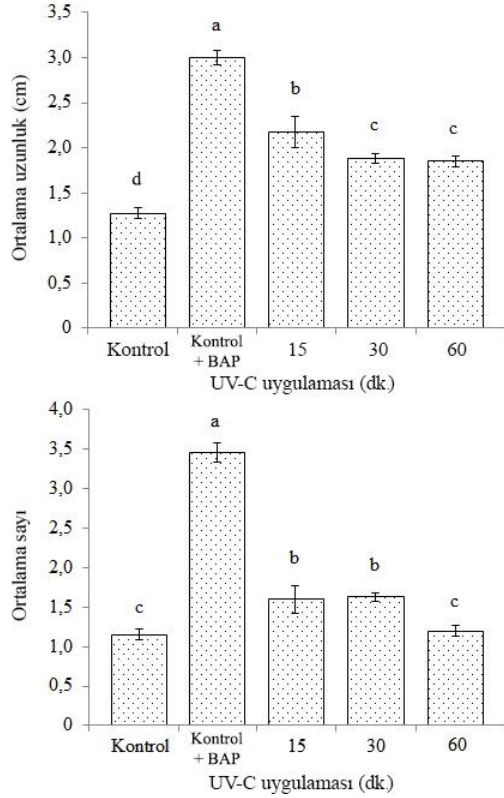
Çalışmada her bir tekrarda 30 eksplant kullanılmış olup, deneyler 3 tekrarlı yapılmıştır. Ölçümler 30 günlük kültür periyodu sonunda gerçekleştirilmiştir. Veriler arasındaki farklılığın belirlenmesinde istatistiksel değerlendirme IBM SPSS Statistics 19 programı kullanılarak Duncan testine (p<0.05) göre gerçekleştirilmiştir.

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1 UV-C stresinin bitkinin sürgün gelişimine etkisi

UV'nin sadece epidermal değil aynı zamanda mezofil hücrelerine de olumsuz etki yaptığı bilinmektedir (Bornman vd. 1983). Buna karşın Shiozaki vd. (1999) bezelye bitkilerinin sürgün uzunluklarının ve yaş ağırlıklarının UV radyasyonu uygulaması ile arttığını kaydetmiştir. Benzer şekilde yerfıstığı ve maş fasulyesi tohumları 5, 10, 20, 30 ve 60 dakika UV-C ile muamele edilip ekildiklerinde büyüme parametrelerinde olumlu etkiler gözlemlenmiştir (Siddiqui vd. 2011). Çalışmamızda UV-C uygulamaları BAP ilaveli kontrole göre ortalama sürgün uzunluğu ve sayısında önemli düzeyde inhibisyona neden olmuştur (Şekil 1). Literatürde UV-C ışık uygulamasının bazı süs bitkilerinin büyüme parametreleri üzerinde olumlu etkiler gösterdiği rapor edilmiş (Darras vd. 2013) fakat mevcut araştırmada sürgün uzunluğu ve sayısı BAP ilaveli kontrole göre azalmıştır. UV-C uygulama

süresi arttıkça bitkiye ulaşan enerji toplamının artmasına bağlı olarak büyüme parametreleri üzerinde negatif etkiler gösterdiği ileri sürülebilir. Benzer olumsuz etkiler, *Raphanus sativus* var. *sativus* (turp), *Lactuca sativa* (marul) ve *Spinacia oleracea* (ispanak) bitkilerinde taze ağırlığın azalması ve yapraklar üzerinde yaralar oluşması ile gözlemlenmiştir (Kobashigawa vd. 2011).



**Şekil 1.** Artan UV-C stresi koşullarının *A. orientalis*'in ( $1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP varlığında çoğaltılmış) sürgün gelişimine etkileri.

### 3.2 UV-C stresinin bitkinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin incelenmesi

Ultraviyole ışınlarının yeryüzüne ulaşması, bitkinin fizyolojik gelişimi ve biyolojik parametreleri için stres faktörü oluşturmaktadır. Bu stres faktörüne karşı bitkinin savunma mekanizması üzerine etkisinin anlaşılması için SOD, POD ve CAT antioksidan enzimlerinin aktiviteleri incelenmiştir. Çizelge 1'de verildiği üzere artan UV-C stresi en dramatik etkiyi SOD enzimi üzerinde göstermiştir. SOD enzim üretiminde bitkinin maruz kaldığı UV-C sonucu zamana bağlı olarak kontrole oranla azalma gözlenmiştir. Diğer yandan CAT aktivitesinde önemli bir değişiklik kaydedilmemiştir. POD aktivitesinde

ise kısa süreli UV-C uygulamasında kontrole göre %21 oranında artış gözlenmiştir. 30 ve 60 dakikalık UV-C uygulamalarında POD aktivitesinde gözlenen artış zamana bağlı olarak azalmasına rağmen kontrole göre daha fazla enzim üretildiği bulunmuştur.

**Çizelge 1.** Artan UV-C stresi koşullarında *A. orientalis*'in ( $1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP varlığında çoğaltılmış) SOD, POD ve CAT aktivitelerinde gözlenen değişim.

UV-C uygulaması	SOD aktivite (U/mg)	POD aktivite (U/mg)	CAT aktivite (U/mg)
Kontrol	0,75±0,03 a	0,64±0,03 c	0,32±0,01 a
Kontrol + BAP	0,74±0,02 a	0,66±0,01 c	0,32±0,01 a
15 dakika	0,48±0,02 b	0,80±0,01 a	0,32±0,02 a
30 dakika	0,39±0,01 c	0,78±0,05 ab	0,30±0,03 a
60 dakika	0,36±0,01 d	0,71±0,05 bc	0,30±0,02 a

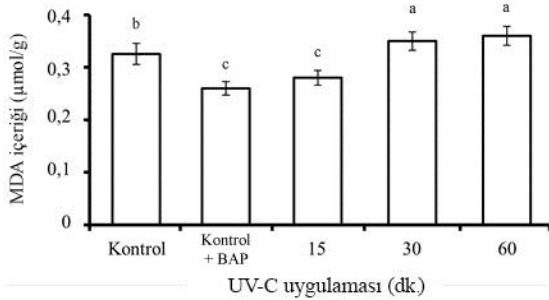
a-d; Bir kritere ait kolondaki farklı harfler, istatistiksel olarak ortalamalar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ( $P < 0.05$ ). Standart sapma ( $\pm SS$ ).

SOD, POD ve CAT enzimleri bitkilerde bulunan doğal antioksidanlardır. Temel işlevleri strese bağlı olarak bitkide oluşan aşırı miktardaki reaktif oksijen bileşiklerinin (ROS) ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Bu nedenle, kısa süreli UV ışınlarına (UV-A, UV-B veya UV-C) maruz bırakılan bazı bitkilerde antioksidan enzim miktarlarında önemli ölçüde artışların gözlemlendiği vurgulanmıştır (Erkan vd. 2008, Younis vd. 2010, Mohammadi vd. 2012, Chairat vd. 2013). Benzer şekilde, mevcut çalışmada da POD aktivitesinde UV-C uygulamasına bağlı olarak artış gözlenmiştir. Diğer yandan, *Isatis indigotica* (Chen 2009), *Oryza sativa* ve *Phaseolus vulgaris* (Raghuvanshi ve Sharma 2016) gibi bitkilerde UV stresine bağlı olarak SOD aktivitesinde düşüşler rapor edilmiştir. SOD aktivitesinde strese bağlı gözlenen bu azalmanın oluşan süperoksit iyonunun ( $O_2^-$ ) enzimin baş edemeyeceği kadar yüksek miktarlarda üretilmesinden kaynaklı olabileceği önerilmiştir (Navari-Izzo ve Rascio 1999). Bu çalışmada süperoksit iyonunun düzeyi her ne kadar ölçülmemiş de olsa SOD'un benzer şekilde etkilendiği ileri sürülebilir. Strese bağlı olarak oluşan aşırı hidrojen peroksit birikiminin CAT yanında askorbat-glutasyon döngüsünde yer alan enzimler ile önlenmesi bilinmektedir (Ma vd. 2014). Buna bağlı olarak gerek SOD aktivitesindeki azalma gerekse CAT üretimi değişmeden kalırken, POD

aktivitesindeki artış, UV kaynaklı oluşan  $H_2O_2$ 'nin CAT enziminden ziyade diğer antioksidanlar tarafından uzaklaştırılmış olabileceğine işaret etmektedir.

### 3.3 UV-C stresinin bitkinin lipid peroksidasyon seviyesi üzerine etkisi

MDA içeriği, strese maruz kalan bitkinin membran lipidlerinde ROS kaynaklı oluşan hücre hasarını tayin etmede kullanılır. Çalışmada, artan UV-C stresi ile *A. orientalis*'in MDA içeriğinin de arttığı belirlenmiştir. MDA içeriğindeki en fazla artış 60 dakika UV stres koşullarında belirlenmiş; benzer bir istatistiki sonuç 30 dakika uygulamada da görülmüştür (Şekil 2). Bu durum bitki hücrelerindeki hasarın 30 dakika UV-C uygulamasından itibaren başladığını göstermektedir. Benzer şekilde, 4 ve 24 saat aralıklarında toplam  $50 \text{ kJ m}^{-2}$  UV-C radyasyonuna maruz bırakılan 70 günlük tütün bitkisinde (*Nicotiana tabacum*) MDA içeriğinde artış kaydedilmiştir (Saxena vd. 2011).

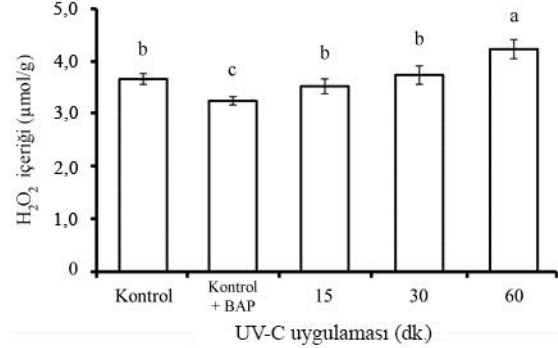


Şekil 2. Artan UV-C stresi koşullarında *A. orientalis*'in ( $1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP varlığında çoğaltılmış) MDA içeriğinin değişimi.

### 3.4 UV-C stresinin bitkinin $H_2O_2$ seviyesi üzerine etkisi

Reaktif oksijen bileşikleri hücrede fazla biriktiklerinde hücre membran lipidlerinin peroksidasyonu, protein ve nükleik asitlerin parçalanması gibi hücre canlılığını tehdit eden olaylara sebep olurlar. Bu tip bileşiklerden biri olan  $H_2O_2$ , bitki savunma mekanizmasında sinyal molekülü olarak görev yapar (Gong vd. 2001). Artan UV-C stresi koşullarında 15 dakika UV stres koşulundan itibaren  $H_2O_2$  içeriğinin artmasına neden olmuştur ve artış 30 ve 60 dakika UV-C stres koşulunda da devam etmiştir (Şekil 3). UV stresine

bağlı olarak bitkilerde gözlenen ROS seviyesindeki artışın, metabolik aktivitelerdeki düzensizlikler sonucu veya hücre zar proteini olan NADPH-oksidadazın aktivitesindeki artış sebebiyle oluşabileceği önerilmektedir (Kalbina ve Strid 2006).

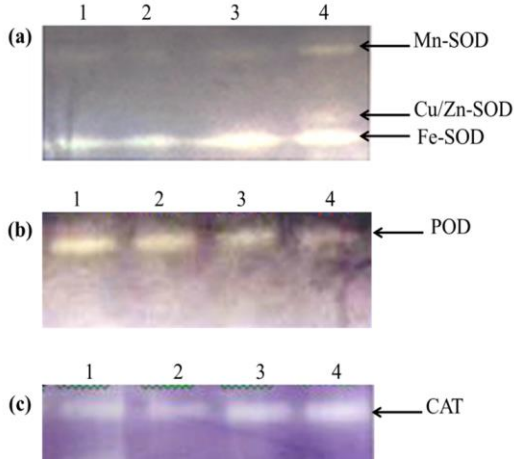


Şekil 3. Artan UV-C stresi koşullarında *A. orientalis*'te ( $1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP varlığında çoğaltılmış) gözlenen  $H_2O_2$  değişimi.

### 3.5 SOD, POD ve CAT enzimlerinin elektroforetik analizi

Elektroforetik analizler iki amaç doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilki artan UV-C stresine maruz bırakılan *A. orientalis*'te strese maruz bırakılmayan bitkilere oranla antioksidan enzimlerinin aktivitelerindeki olası değişiklikleri jel üzerinde gözlemlemek, ikincisi ise enzimlere ait izoformların varlığını analiz etmek üzerine kurulmuştur. Buna göre, UV-C stresine maruz bırakılan ve bırakılmayan *A. orientalis*'te SOD aktivitesi için üç farklı bant belirlenmiştir (Şekil 4a). Bu bantların isimlendirilmesi örneklerin yürütülmüş olduğu jelin KCN ve  $H_2O_2$  ile muamelesi sonrası yapılmıştır (Pan vd. 2006). Buna göre KCN ve  $H_2O_2$  ile inhibe edilmemiş bant Mn-SOD, sadece  $H_2O_2$  tarafından inhibe edilmiş olan bant Fe-SOD olarak isimlendirilirken her iki kimyasal tarafından inhibe olan bant Cu/Zn-SOD olarak tanımlanmıştır (Pan vd. 2006). Şekil 4a'da görüldüğü üzere jel üzerindeki SOD izoformlarının aktivite şiddeti strese maruz bırakılma süresi arttıkça azalmaktadır. Özellikle Cu/Zn-SOD izoformuna ait bantın UV-C varlığında tamamen inhibe edildiği görülmektedir. Benzer şekilde Mn-SOD ve Fe-SOD izoformlarına ait bantların keskinliğinde UV-C stresinin artışına bağlı olarak azalma gözlenirken, bu azalma Mn-SOD izoformunda dikkat çekicidir. Elektroforetik analiz

sonucu elde edilen bulgular spektrofotometrik analizler sırasında SOD aktivitesinde kontrole göre gözlenen %51'lik düşüşün (Çizelge 1), Cu/Zn-SOD ve Mn-SOD izoformlarından kaynaklı olabileceğine işaret etmektedir. *Amsonia orientalis*'e ait CAT ve POD enzimlerinin jel elektroforezlerinde bu enzimler tek bant halinde ortaya çıktıklarını göstermiştir (Şekil 4b&c).



**Şekil 4.** Artan UV-C stresi koşullarında *A. orientalis*'in (1 mg l<sup>-1</sup> BAP varlığında çoğaltılmış) SOD (a), POD (b) ve CAT (c) aktiviteleri için elde edilen zimogramı (aktivite boyama). 1: 60 dakika UV-C uygulaması; 2: 30 dakika UV-C uygulaması; 3: 15 dakika UV-C uygulaması; 4: BAP ilaveli kontrol.

Bu çalışmaya benzer şekilde *Raphanus sativus* (Valetti ve Pico 2013) ve *Copeifera langsdorffii* (Maciel vd. 2007) bitkilerinden izole edilen peroksidazlara ait elektroforetik analizde de tek bant gözleendiği rapor edilmiştir. UV-C uygulamasının bu enzimler üzerindeki etkisi incelendiğinde ise jel üzerindeki CAT aktivite şiddetinin stres ortamının artmasına bağlı olarak değişmeden kaldığı, POD aktivite şiddetinin ise kontrole göre arttığı gözlenmiştir. Elde edilen aktivite sonuçları spektrofotometrik analiz bulguları ile uyumludur.

#### 4. Sonuç

Bu çalışma UV-C ışınına maruz bırakılan *A. orientalis* bitkisinde sürgün uzunluk ve sayısının olumsuz yönde etkilendiğini ve hidrojen peroksit (ROS) üretimine paralel olarak antioksidan bir enzim olan POD (peroksidaz) aktivitesinin radyasyona hiç maruz bırakılmayan bitkiye oranla arttığını göstermiştir.

Elde edilen bulgular, 1 mg l<sup>-1</sup> BAP varlığının sürgün sayısı ve uzunluğuna olumlu etki yapsa da bu etkilerin UV-C uygulamalarıyla sınırlandırıldığını göstermektedir. Buna rağmen uzun süreli UV-C uygulamasında bile bitkinin sürgün gelişimi yavaşlarsa da tamamen kaybolmamıştır. Literatürde bazı bitkilerde belirtilen UV-C'nin bitki gelişimi için olumlu etkileri *A. orientalis*'de bu çalışmada denenlerden daha düşük dozlarda görülebilir. UV-C stresinin hücresel etkilerini ortaya koyabilmek için moleküler düzeydeki araştırılması gerekmektedir.

#### Teşekkür

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (113Z609).

#### 5. Kaynaklar

- Acemi, A., Duman, Y., Karakuş, Y.Y., Kömpe, Y.Ö., Özen, F. 2017. Analysis of plant growth and biochemical parameters in *Amsonia orientalis* after *in vitro* salt stress. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, **58**, 231-239.
- Acemi, A., Özen, F., Kiran, R. 2012. Development of an efficient callus production protocol for *Amsonia orientalis*: A critically endangered medicinal plant. *Eurasian Journal of Biosciences*, **6**, 105-112.
- Acemi, A., Özen, F., Kiran, R. 2013. *In vitro* propagation of *Amsonia orientalis* Decne. from nodal segments of adult plants. *Propagation of Ornamental Plants*, **13**, 25-32.
- Aebi, H. 1974. Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer HU, Ed, Catalase. Academic Press, New York, 673-675.
- Akyaçın, H., Özen, F., Dülger, B. 2006. Anatomy, morphology, palynology and antimicrobial activity of *Amsonia orientalis* Decne (Apocynaceae) growing in Turkey. *International Journal of Botany*, **2**, 93-99.
- Allen, D.J., Nogues, S., Baker, N.R. 1998. Ozone depletion and increased UV-B radiation: is there a real threat to photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **49**, 1775-1788.

- Beauchamp, C.O., Fridovich, I. 1973. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochimica et Biophysica Acta*, **317**, 50-64.
- Bornman, C.H. 1983. Possibilities and constraints in the regeneration of trees from cotyledonary needles of *Picea abies* in vitro. *Physiologia Plantarum*, **57**, 5-16.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Caldwell M.M., Björn L.O., Bornman J.F., Flint S.D., Kulandaivelu G., Teramura A.H., Tevini, M. 1998. Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **46**, 40-52.
- Chairat, B., Nutthachai, P., Varit, S. 2013. Effect of UV-C treatment on chlorophyll degradation, antioxidant enzyme activities and senescence in Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*). *International Food Research Journal*, **20**, 623-628.
- Chen, Y.P. 2009 Response of antioxidant defense system to laser radiation apical meristem of *Isatis indigotica* seedlings exposed to UV-B. *Plant Signaling and Behavior*, **4**, 571-573.
- Darke, R. 2005. *Amsonia* in cultivation. *The Plantsman*, **4**, 72-75.
- Darras, A.I., Demopoulos, V., Bali, I., Katsiloulis, O., Kratimenou, E. 2013. Brief exposures of ultraviolet-c (UV-C) irradiation improves flowering of ornamental plants. *Acta Horticulturae*, **1002**, 95-101.
- Doupis, G., Chartzoulakis, K., Beis, A., Patakas, A. 2011. Allometric and biochemical responses of grapevines subjected to drought and enhanced ultraviolet-B radiation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **17**, 36-42.
- Erkan, M., Wang, S.Y., Wang, C.Y. 2008. Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and decay in strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **48**, 163-171.
- Georgieva, M., Nikolova, I., Bonchev, G., Katerova, Z., Todorova, D. 2015. A comparative analysis of membrane intactness and genome integrity in pea, barley, and wheat in response to UVC irradiation. *Turkish Journal of Botany*, **39**, 1008-1013.
- Gong, M., Chen, B., Li, Z., Guo, L. 2001 Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Plant Physiology*, **158**, 1125-1130.
- Gurmani, A.R., Bano, A., Khan, S.U., Din, J., Zhang, J.L. 2011. Alleviation of salt stress by seed treatment with abscisic acid (ABA), 6-benzylaminopurine (BA) and chlormequat chloride (CCC) optimizes ion and organic matter accumulation and increases yield of rice (*Oryza sativa* L.). *Australian Journal of Crop Science*, **5**, 1278-1285.
- Hightower, K.R., McCready, J.P., Borchman, D. 1994. Membrane damage in UV-irradiated lenses. *Photochemistry and Photobiology*, **4**, 485-490.
- Itoh, A., Kumashiro, T., Tanahashi, T., Nagakura, N., Nishi, T. 2002. Flavonoid glycosides from *Rhazya orientalis*. *Journal of Natural Products*, **65**, 352-357.
- Kalbina, I., Strid, A. 2006. The role of NADPH oxidase and MAP kinase phosphatase in UV-B-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment*, **29**, 1783-1793.
- Kobashigawa, C., Tamaya, K., Shimomachi, T. 2011. Effect of UV-C treatment on plant growth and nutrient contents. Proc. 6th IS on Light in Horticulture, Eds.: E. Goto and S. Hikosaka, *Acta Horticulturae*, ISHS, 907.
- Ma, H., Xu, X., Feng, L. 2014. Responses of antioxidant defenses and membrane damage to drought stress in fruit bodies of *Auricularia auricula-judae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **30**, 119-124.
- Maciel, H.P.F., Gouvêa, C.M.C.P., Toyama, M., Smolka, M., Marangoni, S., Pastore, G.M. 2007. Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves. *Química Nova*, **30**, 1067-1071.
- Manchenko, G.P. 2002. Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gel, 1st ed., CRC Press, 163-165.



- Mohammadi, N., Mohammadi, S., Abdossi, V., Akbar Boojar, M.M. 2012. Effect of UV-C radiation on antioxidant enzymes in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* cv. Camarosa). *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, **7**, 860-864.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.
- Navari-Izzo, F., Rascio, N. 1999. Plant response to water-deficit conditions. Chapter 10, (in) Handbook of Plant and Crop Stress 2nd ed., (eds.) Pessaraki, M., Marcel-Dekker Press, 231-271.
- Özen, F. 2002. *Amsonia orientalis* Decne (Apocynaceae). *The Karaca Arboretum Magazine*, **6**, 169-172.
- Özen, F. 2006. Türkiye'de tükenme tehlikesinde olan bir türün otekojisi: *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae). *Balikesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü Dergisi*, **8**, 4-9.
- Pan, Y., Wu, L.J., Yu, Z.L. 2006. Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Plant Growth Regulation*, **49**, 157-165.
- Raghuvanshi, R., Sharma, R.K. 2016. Response of two cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. (French beans) plants exposed to enhanced UV-B radiation under mountain ecosystem. *Environmental Science and Pollution Research International*, **23**, 831-842.
- Rulcová, J., Pospíšilová, J. 2001. Effect of benzylaminopurine on rehydration of bean plants after water stress. *Biologia Plantarum*, **44**, 75-81.
- Saxena, S.C., Joshi, P.K., Grimm, B., Arora, S. 2011. Alleviation of ultraviolet-C-induced oxidative damage through overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase. *Biologia*, **66**, 1052-1059.
- Severo, J., Tiecher, A., Pirrello, J., Regad, F., Latché, A., Pech, J-C., Bouzayen, M., Rombaldi, C.V. 2015. UV-C radiation modifies the ripening and accumulation of ethylene response factor (ERF) transcripts in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **102**, 9-16.
- Shiozaki, N., Hattori, I., Gajo, R., Tezuka, T. 1999. Activation of growth and nodulation in a symbiotic system between pea plants and leguminous bacteria by near UV radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **50**, 33-37.
- Siddiqui, A., Dawar, S., Zaki, M.J., Hamid, N. 2011. Role of ultra violet (UV-C) radiation in the control of root infecting fungi on groundnut and mung bean. *Pakistan Journal of Botany*, **43**, 2221-2224.
- Targovnik, A.M., Cascone, O., Miranda, M.V. 2012. Extractive purification of recombinant peroxidase isozyme c from insect larvae in aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, **98**, 199-205.
- Tevini, M. 2004. Plant responses to ultraviolet radiation stress. Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. G. C. Papageorgiou and Govindjee (Eds.). Springer, Netherlands, 605-621.
- Turan, S., Tripathy, B.C. 2013. Salt and genotype impact on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in two rice cultivars during de-etiolation. *Protoplasma*, **250**, 209-222.
- Valetti, N.W., Picó, G. 2013. A friendly method for *Raphanus sativus* L. (wild radish) peroxidase purification by polyelectrolyte precipitation. *Separation and Purification Technology*, **119**, 1-6.
- Younis, M.E.B., Hasaneen, M. N.A.G., Abdel-Aziz, H.M.M. 2010. An enhancing effect of visible light and UV radiation on phenolic compounds and various antioxidants in broad bean seedlings. *Plant Signaling and Behavior*, **5**, 1197-1203.