

# Tuz Stresi ve BAP Varlığında *Amsonia orientalis*'in Antioksidan Enzimlerinin İncelenmesi

Yonca Avcı Duman\*<sup>1</sup>, Arda Acemi<sup>2</sup>, Halil Toygar<sup>2</sup>, Yonca Yüzügüllü<sup>2</sup>, Fazıl Özen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Kocaeli, +90262 3032019, yavci@kocaeli.edu.tr

<sup>2</sup> Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Kocaeli, +90262 303871

\*İletişimden sorumlu yazar / Corresponding author

Geliş /Received: 16 Haziran (June) 2016

Kabul /Accepted: 5 Aralık (December) 2016

DOI: 10.18466/cbayarfbe.280726

## Özet

*Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae), dünyada sadece Türkiye'nin kuzeybatısı ve Yunanistan'ın kuzeydoğusunda yayılış gösteren, tıbbi ve ekonomik öneme sahip yapısında çok sayıda glikozitler ve glikoalkaloitler bulunduran, nadir ve tükenme tehdidi altında olan bir bitki türüdür. Bitkinin tükenme tehlikesi altına girişinin önemli sebeplerinden biri olarak giderek artan abiyotik stres koşulları düşünülmektedir. Çalışmamızda, tuzluluk stresinin *Amsonia orientalis*'in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve MDA seviyeleri ile antioksidan enzimlerinin (SOD, CAT, POD) üzerindeki etkisi; stresi yatıştırmak amacıyla 1,0 mg/mL benzilaminopürin (BAP) varlığında elektrofotometrik ve fotometrik olarak irdelenmiştir. Artan tuz stresi koşullarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve MDA seviyelerinin benzer olarak yüksek tuz konsantrasyonlarında arttığı ancak düşük tuz konsantrasyonlarında azaldığı; üç antioksidan enzimin de spesifik aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir. Elektrofotometrik analizler sonucunda artan tuz stresinin bitkinin Fe-SOD ve Cu/Zn-SOD aktivitelerini inhibe ettiği, Mn-SOD aktivitesinde değişiklik oluşturmadığı, CAT ve POD aktivitelerinin ise tüm tuz konsantrasyonlarında korunduğu gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler** – *Amsonia orientalis*, antioksidan enzimler, *in-vitro*, MDA, tuz stresi.

## Investigation of Antioxidant Enzymes of *Amsonia orientalis* in the Presence of Salt Stress and BAP

### Abstract

*Amsonia orientalis* Decne (Apocynaceae), is a threatened plant species providing many glycosides and glycoalkaloids which have medicinal and economic significance. The species has a natural distribution only in the north-west of Turkey and the north-east of Greece. Abiotic stress factors are thought to be major causes of plant limited distribution. . Thus, the effect of the increasing salt concentrations on MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and antioxidant enzymes (SOD, CAT, POD) of *Amsonia orientalis* was investigated in the presence of 1.0 mg/mL benzylaminopurine (BAP)-due to sooth effect of BAP- spectrophotometrically and electroprotometrically. It was found that salt stres decreased to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contend but elevated at high concentrations of NaCl and enhanced the specific activities of antioxidant enzymes tested. Electroprotometric analysis showed that Fe-SOD and Cu/Zn-SODs activities were inhibited while Mn-SOD, CAT and POD activities remained their activities against increasing salt stres.

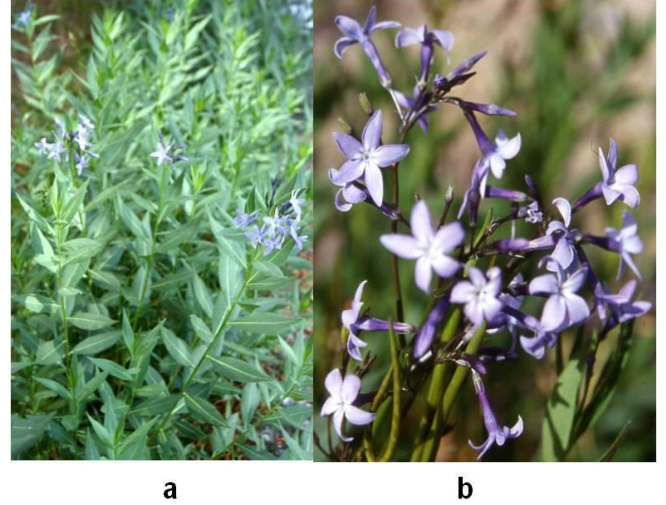
**Keywords** – *Amsonia orientalis*, antioxidant enzymes, *in-vitro*, MDA, salt stress.

## 1 Giriş

*Amsonia orientalis* parlak mavi-mor çiçekli tıbbi öneme sahip bir bitkidir. Birçok doğal ürünün başlangıç bileşiği olan ve izoproneid yapısında bulunan sekologanın *A. orientalis* köklerindeki zengin içeriği (%3,27 (w/w)) *A. orientalis*'i farmasotik (eczacılık) endüstrisi için uygun bir hammadde kaynağı olabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanı sıra taksonun 12 çeşit alkaloid bulundurduğu da rapor edilmiştir [4]. Bu alkaloidlerin bir kısmı anti kanser özellikleriyle tıbbi öneme sahiptirler [5]. Aynı bitki ile yapılan başka bir çalışmada ise bitki bünyesindeki çeşitli kardiyolojik glikozitler, glikoalkaloitler ve yeni glikozitler izole edilerek bu bileşiklerden ikisinin glikozit, birinin aglikon ve bir tanesinin de glikoalkaloit olduğu, bu glikoalkaloitin daha önce literatürde *Rhazya* (*syn. Amsonia*) *stricta*'dan tanımlanan scictosamide olduğu belirtilmiştir [6]. *A. orientalis* ile yapılan son çalışma ise bitkinin kuru toprak üstü kısımlarından izole edilen altı yeni flavonoid glikozit ile ilgilidir [3]. *A. orientalis* üzerine yapılan çalışmalarda özütünün, çalışılan mayalardan ikisi üzerinde standart antibiyotiklerden daha fazla antimikrobiyal etki gösterdiği, bir maya üzerinde nystatin antibiyotiği ile eşit etki gösterdiği, bir mayanın ise bu bitkinin özütüne karşı dirençli olduğunu ve kullanılan on bakteriden altısına karşı standart antibiyotiklere göre daha fazla bir inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir [7]. Yakın bir geçmişte yayınlanan bulgularda ise bitkinin *in vitro* sürgün çoğaltımı ve elde edilen sürgünlerden yüksek miktarda kallus üretimi gerçekleştirilmiş olup [8]; bu kallus dokuları ileriki çalışmalar için hücre süspansiyon kültürlerinin kurulumunda kullanılması planlanmaktadır. Ayrıca bitkinin yüksek kapasitede *in vitro* çoğaltımı çeşitli bitki düzenleyicilerinin varlığında sağlanmış ve etkin bir *in vitro* çoğaltım protokolü oluşturulmuştur [9].

Tıbbi öneminin yanında çiçekli bitki olması dolayısıyla *A. orientalis* Batı Avrupa ve Amerika'daki bahçelerde süs bitkisi olarak da kullanılmaktadır [1]. *A. orientalis* (Şekil 1), başta kuraklık, tuzluluk, soğuk, ultraviyole radyasyonu, ağır metal gibi stres gibi çevresel - abiyotik stres şartları olmak üzere çeşitli nedenlerle yeryüzünden giderek tükenmektedir. Çevresel kaynaklı stresler sonucunda Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS; süperoksit radikali (O<sub>2</sub>-), hidrojenperoksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve hidroksil radikali (OH)) üretimi artar. ROS seviyesindeki bu artış hücre zarı por

çapının genişlemesine ve protein, pigment ve DNA gibi biyomoleküllerde hasara neden olmaktadır. Bitkiler ROS'ları katalizleyerek hücreleri bu hasardan koruyacak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler [10].



**Şekil 1:** *Amsonia orientalis* (a. Genel görünüm, b. Çiçek ve meyve) [1].

Antioksidanlar bitkilerin savunma mekanizmasında önemli role sahiptirler. Temel işlevleri, metabolik olaylar sonucu meydana gelen reaktif oksijen bileşiklerini ortamdaki uzaklaştırarak bitkiyi bu radikallerin zararlı etkisinden korumaktır [11]. Bunlar arasında en önemli olan antioksidanlar olarak katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve peroksidaz (POX) gelmektedir. Katalazlar, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in su ve moleküler oksijene parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir ve doğada yaygın olarak bulunmaktadırlar [12]. Peroksidazlar (POD) da hem/demir grubu içeren enzimler olup hidrojen peroksit varlığında fenol ve aromatik gibi çeşitli bileşiklerin oksidasyonunu katalizlerler. Süperoksit dismutaz (SOD) ise bitkilerde yaygın olarak bulunmakla birlikte esas fonksiyonu süperoksit radikali (O<sub>2</sub>-) hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dönüştürmektir; reaksiyon ürünü olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ise yukarıda belirtildiği gibi katalaz enzimi ile ortamdaki uzaklaştırılır [11]. Antioksidan enzim seviyelerinin belirlenmesinin yanı sıra malondialdehit (MDA) seviyesi de stres şartlarına bağlı olarak ROS tarafından kaynaklanan hücresel hasarın belirlenmesinde iyi bir belirteç görevi görmektedir. Bu yüzden hücre zarı stabilitesi MDA içeriği test edilerek yapılabilmektedir.

*In vitro* sürgünlerin çoğaltımında sıklıkla kullanılan bir sitokin olan benzilaminopürin (BAP) aynı zamanda tarla çalışmalarında osmotik stres ve tuz stresi gibi çeşitli çevresel stres faktörlerinin etkilerinin yatırılmasında da kullanılmaktadır. Büyümeyi teşvik edebileceği gibi aynı zamanda engelleyebilmektedir. Bu yüzden uygulama konsantrasyonlarının iyi ayarlanması gerekir [13,14]. Çalışma grubumuz bu sitokinini önceki çalışmaların ışığında, bitki stres faktörlerine maruz bırakılmadan önce *in vitro* sürgün çoğaltımı için kullanmıştır. Önceki çalışmalarımızda, BAP'ın *Amsonia orientalis* için en etkili sürgün çoğaltım konsantrasyonu 1,0 mg/L olarak bulunmuştur. Bu nedenle mevcut çalışmada sürgün çoğaltımı için bu konsantrasyon tercih edilmiştir. Özet olarak bu çalışmamızda artan *in vitro* tuz stresi koşullarında bitkimiz için en fazla büyümeyi sağlayan 1,0 mg/L konsantrasyondaki BAP varlığında bitkinin uygulanan abiyotik stres karşısında antioksidan enzim profili, MDA seviyesi ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği incelenmiştir.

## 2 Materyal ve Yöntem

### 2.1. Tuzluluk stresinin oluşturulması

*Ex vitro* koruma parsellerinde bulunan 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 40 ml 1,0 mg/l benzilaminopürin (BAP) içeren Murashige & Skoog (MS) [15] sürgün çoğaltım ortamına ekilmiş ve 1 aylık kültür periyodu sonunda tuzluluk stresi denemelerinde kullanılacak nodları içeren sürgünler elde edilmiştir. Aynı işlem, *in vitro* sürgünler kullanılarak sürekli olarak tekrar edilmiş ve gerekli eksplant kaynağı bu yöntemle sağlanmıştır. Elde edilen sürgünlerden alınan nodal eksplantlar 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 mM NaCl içeren MS besi ortamında kültüre alınmışlardır. Bir aylık kültür periyodunun sonunda gerekli morfolometrik ölçümler (sürgün uzunluğu, sürgün sayısı, kök uzunluğu, kök sayısı) yapılmıştır. Kültür şartları büyütme kabininde 80 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fotosentetik foton yoğunluğundaki ışık altında 16/8 ışıklandırma periyodunda, 23±1 C° olarak uygulanmıştır. Tüm stres faktörü denemelerinde aynı kültür şartları uygulanmıştır.

### 1.2. Ham Ekstraktın Hazırlanması

Hedeflenen çalışmaları gerçekleştirmek üzere artan tuz stresi varlığında yetiştirilen bitki materyallerinden ham ekstraktlar hazırlanmıştır. 1 mg/mL BAP içeren besiyeri ortamı, kontrol (MS), 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 mM tuz stresi varlığındaki bitki örnekleri 20 katı hacimdeki 50 mM potasyum fosfat (pH 7.0) tampon ile homojenize edilmiştir. Homojenizat kaba filtre kağıdı ile filtre edilmiş ve 14000 g, +4 °C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir (Sigma 4-16 K). Süpernatant bitkinin artan tuz stresi varlığında biyokimyasal parametrelerinin incelenmesi için kullanılmıştır.

### 1.3. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi

Artan tuz stresi varlığında antioksidan enzim aktiviteleri (SOD; süperoksit dismutaz, POD; peroksidaz, CAT; katalaz) spektrofotometrik ve elektroforetik olarak incelenmiştir.

SOD aktivitesi; NBT (Nitroblue tetrazolium)'nin 560 nm'de fotokimyasal redüksiyonunun incelenmesi ile belirlenmiştir [16]. Reaksiyon, 75 mM NBT, 18 mM l-methionine, 0.1 mM EDTA, 2 µM riboflavin ve enzim içeren toplam 3 mL 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.0) gerçekleştirilmiştir. Riboflavin en son karanlık ortamda ilave edilmiştir ve reaksiyon karışımı 30-W floresan ışığı altında 15 dakika inkübe edilmiştir. Tuz ile muamele edilmeyen bitki ekstraktı kontrol olarak kullanılmıştır. 1 ünite SOD aktivitesi %50 redüksiyon inhibisyonunu sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

POD aktivitesi; pyrogallol oksidasyon yöntemi ile incelenmiştir [17]. Reaksiyon; 10 mM pyrogallol, 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; 425 nm'de fosfat tampon içinde pyrogallol için ε (sönümleme katsayısı) 2640 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> alınarak eşitlik 1'de gösterildiği gibi hesaplanmıştır [18]. Enzim aktivitesi; 5 dakikada 1 mg purpurogallin oluşması için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır [19].

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 enzimin 37 °C'de 2 dakika inkübe edilmesi ile gerçekleştirilmiş, reaksiyon 1M HCl 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> µmol<sup>-1</sup>) [20]. Enzim aktivitesi eşitlik 1'e göre hesaplanmıştır.

$$EA: \frac{\left(\frac{OD_{425}}{\epsilon}\right) \times \text{Re aksion hacmi (mL)}}{\text{İnkübasyon süresi (dakika)} \times \text{Enzim hacmi (mL)}} \times \text{Seyrelme faktörü} \quad (1)$$

Tüm örnekler için protein miktar tayini Bradford yöntemine göre yapılmıştır [21].

## 2.4 Lipid Peroksidasyon Ürünleri ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> İçeriğinin

### Belirlenmesi

Ham extrattaki lipid peroksidasyonu, MDA içeriğinin belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir [22]. 0.4 mL ham ekstrakt 0.4 mL tiyobarbitürik (TBA; 0.25 M HCl içinde hazırlanan %15 (w/v) trikloroasetik asit, %0.375 (w/v) TBA çözeltisi) karıştırılmıştır. Karışım 95 °C'de 15 dakika inkübe edilmiş, ardından buz banyosunda 10 dakika bekletilmiş ve 1500 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. 532 ve 600 nm'deki absorbanslar kaydedilmiştir (Biorad Smartspect 3000). MDA içeriği  $[(A_{532}-A_{600}) / 156] \times 10^3 \times \text{Seyrelme faktörü}$  eşitliğine göre hesaplanmıştır.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği, ekstraktın potasyum iyodür (KI) ile muamelesinden sonra belirlenmiştir. 2.5 mL'lik reaksiyon karışımı; %0.1 trikloroasetik asit (TCA)%0.1 KI 0.5 mL ham ekstrakt ve 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu içermektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı; bilinen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarları ile standart eğrisi oluşturulan grafik ile belirlenmiştir [23].

## 2.5 Elektroforetik Analizler

SDS-PAGE Bio-Rad Mini-Protean sistemi kullanılarak; %4 yükleme jeli ve %12 ayırma jeli hazırlanarak gerçekleştirilmiştir [24]. Örnekler indirgeme ajanı içeren yükleme tamponu ile 100 °C'de 5 dakika kaynatılmışlardır. Protein marker'ı olarak SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard (LC5925) kullanılmıştır. Elektroferez 100 V'da 10 dakika ardından 120 V'da 2-3 saat yürütülerek gerçekleştirilmiştir. Yürütülen jeller

gümüş boyama ile boyanmıştır [25].

SOD, POD ve CAT enzimlerinin elektroforetik analizleri non-denaturing %4 yükleme ve %12 yürütme jeli hazırlanarak, 4 °C'de, ilk 10 dakika 100 V ardından 1-2 saat 120 V'da Biorad mini protean II elektroferez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Jel üzerinde SOD aktivite tayini şu yöntemle yapılmıştır: yürütülen jel 30 saniye aralıklarla 3 defa saf su ile yıkanıp ardından 750 µM 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 olarak 8 mM KCN ve 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edilmiştir [26].

Jel üzerinde POD aktivitesi, yürütülen jelin oda sıcaklığında; 50 mM pH 7 fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM pyrogallol ve 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edilmesi sonucu turuncu-kahverengi bantların oluşumu ile takip edilmiştir.

CAT aktivitesi ise, yürütülen jelin; 50 mM pH 7 fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 5 dakikalık inkübasyonunun ardından koyu mavi arka alanda transparan bantlar görünene dek 50 mM pH 7 fosfat tamponunda hazırlanan 30 mM TEMED, 2,5 mM NBT, 5 mM riboflavin ile inkübasyonu sonucu belirlenmiştir [27].

## 3 Bulgular ve Tartışma

### 3.1 Tuz Stresinin Bitkinin Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

1,0 mg/mL BAP içeren besiyeri ortamında tuz stresinden kaynaklanan oksidatif stresin antioksidan enzimler üzerindeki etkileri incelenmiş ve artan stres koşullarında ölçülen enzim aktivite değerleri belirlenmiştir.

Deney koşullarında; 75 mM NBT, 18 mM 1-methionine, 0,1 mM EDTA, 2 µM riboflavin ve farklı hacimlerde enzim içeren toplam 3 mL 50 mM pH 7.0 potasyum fosfat reaksiyon çözeltisinde % 50 inhibisyonun sağlandığı enzim hacmi her bir grafikten elde edilen doğrusal denklemden yararlanılarak hesaplanıp, 1 ünite enzim olarak tanımlanmış olup, tüm tuz konsantrasyonları varlığında benzer grafikler

çizilmiştir. Elde edilen tüm grafik ve grafik denklemlerinden yararlanılarak her bir stres koşulu için SOD aktivitesi belirlenmiştir. Tüm stres koşulları için protein analizlerinden yararlanılarak oluşturulan ve aktivite (U/mL), protein (mg/mL) ve spesifik aktiviteyi (U/mg) içeren veriler Çizelge 1'de verilmiştir.

**Çizelge 1.** Artan tuz stresi varlığında, 1,0 mg/mL BAP ortamında *A. orientalis*'in protein miktarı, SOD aktivitesi ve spesifik aktivitesi.

Örnek, (mM NaCl)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mL)
Kontrol	0.48	0.65	0.75
25	0.69	0.75	0.92
50	0.55	0.55	1.00
75	0.60	0.80	0.76
100	0.55	0.67	0.81
125	0.57	0.70	0.82
150	0.45	0.64	0.71

Artan tuz stresi koşullarında 1,0 mg/mL BAP ortamında *A. orientalis*'in SOD enzim aktivitesi ve spesifik aktivitesi 125 mM NaCl konsantrasyonuna kadar artarken 150 mM NaCl varlığında kontrol değerine ulaşmıştır. SOD aktivitesindeki artış abiyotik strese bağlı oluşan oksidatif strese karşı savunma açısından ve bitkilerin stres koşulları altında canlılığı sürdürmesine katkı sağlama bakımından önemli rolü bulunmaktadır. Bu anlamda Ahmed ve ark. [28] tarafından yapılan bir çalışmada tuz stresi koşullarında artan SOD aktivitesi rapor edilmiş ve bitkinin stres koşullarında canlılığını sürdürebilmesinde bu aktivitenin katkısı belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da artan tuz stresi koşullarında artan SOD aktivitesinin, bitkinin canlılığını sürdürmede önemli katkısı olduğu düşünülmektedir.

POD; abiyotik strese karşı direnç gösteren önemli bir antioksidan enzimdir. 1,0 mg/mL BAP içeren ve artan tuz stresi varlığında değişen POD enzim aktivitesi Çizelge 2'de verilmiştir.

**Çizelge 2.** Artan tuz stresi varlığında 1,0 mg/mL BAP ortamında *A. orientalis*'in protein miktarı, POD aktivitesi ve spesifik aktivitesi

Örnek, (mM NaCl)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mL)
Kontrol	3.64	0.65	5.63
25	2.61	0.42	6.18

50	3.18	0.37	8.50
75	3.09	0.39	7.92
100	3.79	0.56	6.80
125	4.35	0.63	6.87
150	4.09	0.62	6.63

Çizelge 2'den görüldüğü gibi artan tuz konsantrasyonu varlığında en yüksek spesifik aktivite değeri 50 mM NaCl varlığında gözlenmiştir. Bu konsantrasyondan itibaren spesifik aktivite değeri kademeli olarak düşmesine rağmen kontrol değerinin üzerinde spesifik aktivite değerleri gözlenmiştir. Aktivitede en şiddetli artış %119 olarak 125 mM tuz varlığında gözlenirken spesifik aktivitede en fazla artış 50 mM tuz varlığında %159 olarak belirlenmiştir. POD aktivitesi ile yüksek tuz konsantrasyonları varlığında 1,0 mg/mL BAP varlığında bitkinin POD enzim aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Tuz stresi koşullarında POD enziminin artan aktivitesi; elma ağacının yaprak ve sürgünlerinde [29], yonca bitkisinde [30] çeltik yapraklarında [31] rapor edilmiştir. Artan POD aktivitesi, bitkinin artan tuz stresi koşullarına karşı savunma gösterebildiğinin belirteçidir.

CAT hidrojen peroksidi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) su ve moleküler oksijene yıkararak canlı sistemi oksidatif yıkımdan koruyan bir başka önemli antioksidan enzimdir. Artan tuz stresi varlığında, 1,0 mg/mL BAP varlığında bitkinin CAT enzim aktivitesinin değişimi Çizelge 3'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.** Artan tuz stresi varlığında 1,0 mg/mL BAP ortamında *A. orientalis*'in protein miktarı, CAT aktivitesi ve spesifik aktivitesi

Örnek, (mM NaCl)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mL)
Kontrol	0.20	0.65	0.32
25	0.17	0.42	0.40
50	0.17	0.37	0.45
75	0.19	0.39	0.48
100	0.18	0.56	0.32
125	0.19	0.63	0.30
150	0.18	0.62	0.30

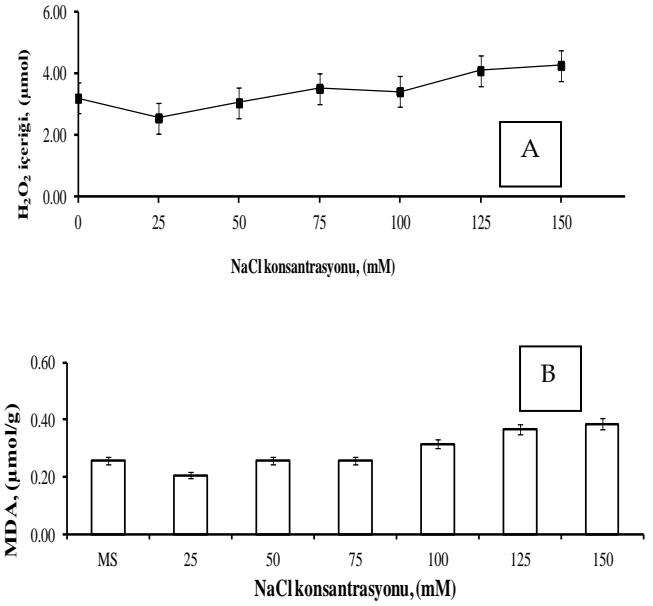
Çizelge 3'ten görüldüğü gibi- *A. orientalis* CAT aktivitesi 1,0 mg/mL BAP içeren ortamda ve artan tuz varlığında azalmış olmasına rağmen spesifik aktivitesi artan tuz konsantrasyonu varlığında artmış, en

yüksek değere (%150'lik artış ile) 75 mM tuz konsantrasyonu varlığında, en düşük spesifik aktivite değerine (%94) ise 125 ve 150 mM tuz konsantrasyonu varlığında ulaşmıştır. Tuz stresi varlığında artan CAT aktivitesi literatürde rapor edilmesine rağmen [31], *in-vitro* koşullarda uygulanan tuz stresinin bitkinin CAT enziminin aktivitesinde azalma görülen çalışmalar da rapor edilmiştir [32]. Bizim çalışmamızda CAT spesifik aktivitesinde gözlenen bu artış bitkinin tuz stresi koşullarına karşı gösterdiği savunma olarak yorumlanabilir.

Abiyotik stres koşulları altında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi ROS türleri bitkinin savunma sistemi için önemli sinyal molekülü görevi görür [33]. Bitki tuzluluk gibi herhangi bir abiyotik strese maruz kaldığı zaman stres koşullarına karşı duyarlılığı artar ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesi değişir. ROS seviyesinin düşürülmesi SOD, POD, CAT gibi antioksidan enzimler ile sağlanır [34]. Literatürde antioksidan savunma sistemlerinin varlığına rağmen abiyotik stres koşulları varlığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesinin arttığı [35], ya da değişmediği [36] çalışmalar rapor edilmiştir. Bu çalışmamızda artan tuz stresi varlığında düşük tuz konsantrasyonlarında (25-75 mM NaCl) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesinin azaldığı fakat yüksek tuz konsantrasyonlarında (125,150 mM NaCl) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinin kontrol seviyesine çıktığı gözlenmiştir (Şekil 2A). Bu durum, bitkinin antioksidan enzim sistemleri ile açıklanabilir: Artan NaCl konsantrasyonu varlığında artan SOD aktivitesi ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında artış olabilmektedir. Fakat aynı koşullarda CAT ve POD aktivitelerinin de artması H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalizini hızlandırmaktadır. Bu durum düşük tuz konsantrasyonlarında azalan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını açıklamaktadır. Azalan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı fakat artan antioksidan enzim aktiviteleri literatürde rapor edilmiştir [37].

ROS, membran lipidlerini oksitleyerek geçirgenliğini artırır, meydana gelen hücre membranının hasarı hücrenin ölümü ile sonlanır [38]. Şekil 2 (B) artan tuz stresi koşullarında *A.orientalis*'in MDA içeriğini göstermektedir. 100-150 mM tuz konsantrasyonların-

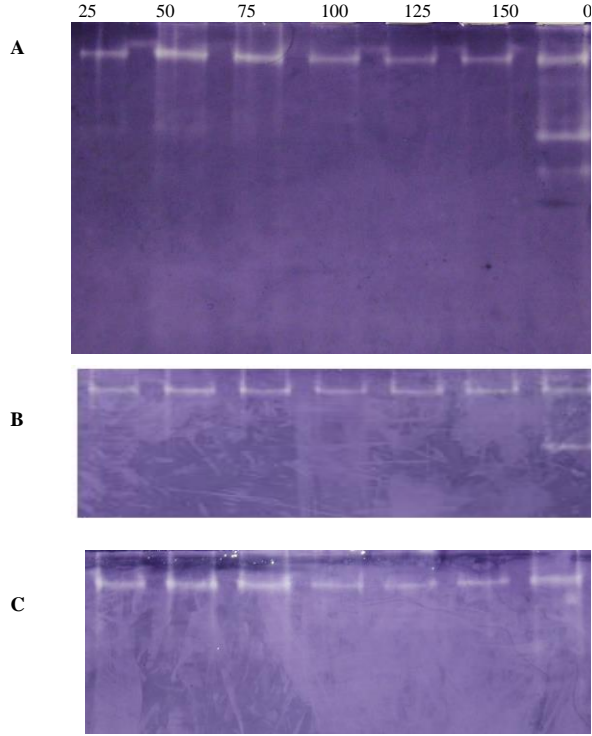
da bitkinin MDA içeriğinin arttığı belirlenmiştir. Bu durum yüksek tuz konsantrasyonlarının bitkide hücrel hasar oluşturduğunun kanıtı olabilmektedir



**Şekil 2.** *A. orientalis*'in artan tuz stresi varlığında ve BAP ortamında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği (A) ve lipid peroksidasyon değişimi grafiği (B). Değerler üç farklı üçlü denemenin ortalaması olup dikey çubuklar standart sapmayı ifade etmektedir.

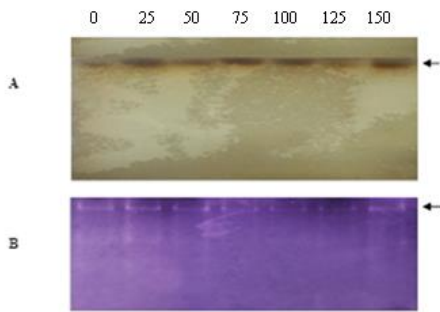
### 3.2 SDS-PAGE ve Native-PAGE Analizleri

SDS-PAGE ve Native-PAGE analizleri, elektrofotometrik analizler kısmında açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 3, artan tuz stresi koşullarında bitkinin SOD aktivitesinin zimogram analizini göstermektedir. A: inhibitörsüz koşullardaki SOD aktivitesi, B: 8 mM KCN varlığında SOD aktivitesi, C: 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında SOD aktivitesini ifade etmektedir. Şeklin üzerindeki rakamlar ise maruz bırakıldığı NaCl konsantrasyonudur.



**Şekil 3.** Artan tuz stresi koşullarında *A.orientalis*'in SOD aktivitesi için zimogram resmi

Tuz stresine maruz bırakılan ve bırakılmayan bitkide SOD aktivitesi için üç farklı bant belirlenmiştir (Şekil 2). KCN Cu/Zn-SOD aktivitelerini inhibe ederken, Cu/Zn-SOD ve Fe-SOD aktiviteleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından inhibe olmaktadır. İlk bant her iki inhibitörden de etkilenmediği için Mn-SOD olarak belirlenmiştir. Sonraki iki bant ise KCN'den etkilenmeyip H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inhibe olmuştur. Bu yüzden bu bantlar Fe-SOD olarak belirlenmiştir. Tuz stresi 125 ve 150 mM NaCl'ye çıktığında ise bantların keskinliğinde azalma belirlenmiştir.

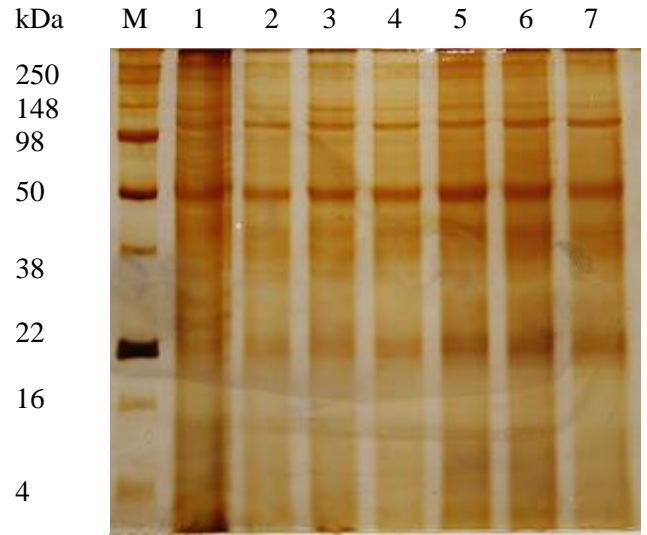


**Şekil 4.** Artan tuz stresi koşullarında *A.orientalis*'in POD (A) ve CAT (B) aktivitesi için zimogram resmi

Native-PAGE ile yapılan zimogram analizi sonucu

*A.orientalis*'in tek POD izozimi olduğu belirlenmiştir (Şekil 4A). Şekil 4A'dan da görüldüğü gibi jel üzerindeki POD aktivite şiddeti değişmemektedir. Bu sonuç POD aktivitesinin spektrofotometrik sonuçları ile de uyumludur.

POD aktivitesinde olduğu gibi enzim tek CAT izoenzime sahiptir ve yüksek tuz stresi koşullarında da jel üzerinde CAT aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 4B). Spektrofotometrik analizin yanı sıra tuz stresine maruz bırakılmış ve bırakılmamış bitkinin protein miktarları SDS-PAGE analiz olarak da incelenmiş ve Şekil 5'de gösterilmiştir.



**Şekil 5.** Tuz stresi koşullarında *A. orientalis*'in SDS-PAGE analizi. M: Protein marker, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 numaralı kuyucuklar sırasıyla kontrol, 150, 125, 100, 75, 50 ve 25 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılan bitki ekstraktlarını ifade etmektedir. Her kuyucuğa 15 µg protein yüklenmiştir.

Şekil 5'e göre; 1 numaralı kuyucuk tuz stresinin olmadığı bitki ekstraktının protein profilini göstermektedir. Bantlar keskin ve yoğundur. Ancak tuz stresinin artan konsantrasyonlarında bantların keskinliği stres miktarına bağlı olarak azalmaktadır. Özellikle 25 ve 50 mM NaCl varlığındaki bantların keskinliği *A.orientalis*'in hafif tuzlu topraklarda yetişebilme olasılığını güçlendirmektedir. Bunun yanı sıra, artan tuz stresi koşullarında hiçbir protein bandının tamamen kaybolduğu gözlenmemiştir. Protein bantlarının keskinliğinin azalmasına rağmen tamamen kaybolmaması bitkinin artan tuz stresinin hiçbir polipeptid sentezini baskılamadığını göstermektedir. Bu di-renci, 1,0 mg/mL BAP varlığının oluşturduğu düşünülmektedir.

#### 4 Sonuç

Sonuç olarak *A. orientalis*'in artan tuz stresi koşullarına 1,0 mg/mL BAP varlığında direnç gösterdiği belirlenmiştir. Azalan protein miktarına rağmen korunan antioksidan enzim aktiviteleri bu dirence katkı sağlamaktadır. Bitkinin yetiştiği doğal koşullar göz önünde bulundurulduğu zaman sadece tuzluluk stresi abiyotik stress olarak görülmemelidir. Bu stresin yanı sıra kuraklık, UV ve ağır metal iyon etkileri de bitkinin yaşamının sürekliliği için tehdit oluşturabilmektedir. Bu kapsamda ülkemiz için önemli bir bitki olan *A. orientalis*'in antioksidan enzimleri üzerine yukarıda bahsedilen çeşitli stress faktörlerinin etkisi grubumuz tarafından çalışılmaya devam edilmektedir.

#### Teşekkür

Bu çalışma 113Z609 no'lu TÜBİTAK projesinin bir parçasıdır.

#### 5 Kaynaklar

- [1] Özen, F. *Amsonia orientalis* Decne (Apocynaceae), The Karaca Arboretum Magazine. 2002; 6, 169-172.
- [2] Darke, R. *Amsonia* in cultivation, The Plantsman. 2005; 4, (2), 72-75.
- [3] Itoh, A.; Kumashiro, T.; Tanahashi, T.; Nagakura, N.; Nishi, T. Flavonoid Glycosides from *Rhazya orientalis*, Journal of Natural Products. 2002; 65, (3), 352-357.
- [4] Dabiné Lengyel, E.; Turiak, Gy.; Nyaradiné, Szabady.; Zambo, I.; Tétényi, P.; Hermeicz, I. Determination of Secologanin Content from Shoots of *Rhazya orientalis* (Dcne) A. DC. Using the Hplc Method, Herba Hungarica. 1986; 25, (2), 141-150.
- [5] Özen, F. Türkiye'de Tükenme Tehlikesinde Olan Bir Türün Otekojisi: *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae), Balıkesir Üniversitesi Fen Bil. Enst. Dergisi. 2006; 8, (1), 4-9.
- [6] Akın, S.; Özen, F.; Yıldırım, O. *Rhazya orientalis* (Dcne) Bitkisinden Kardiyoaktif Glikosidlerin, Glikoalkoidlerin ve Yeni Glikosidlerin İzole Edilmesi ve Yapılarının Aydınlatılması, TÜBİTAK TBAG-1516 (196T038) Nolu Proje, 2001.
- [7] Akyalçın, H.; Özen, F.; Dülger, B. Anatomy, Morphology, Palynology and Antimicrobial Activity

of *Amsonia orientalis* Decn (Apocynaceae) Growing in Turkey, International Journal of Botany. 2006; 2 (1), 93-99.

- [8] Acemi, A.; Özen, F.; Kıran, R. Development of An Efficient Callus Production Protocol for *Amsonia orientalis*: A Critically Endangered Medicinal Plant. Eurasian Journal of Biosciences. 2012; 6, 105-112.
- [9] Acemi, A.; Özen, F.; Kıran, R. In vitro Propagation of *Amsonia orientalis* Decne. from Nodal Segments of Adult Plants. Propagation of Ornamental Plants. 2013; 13, (1), 25-32.
- [10] Khanna-Chopra, R. Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen speciesmediated chloroplast degradation. Protoplasma. 2012; 249, 469-481
- [11] Scandalios, G. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2005; 38, 995-1014.
- [12] Kurakov, A. V.; Kupletskaya, M. B.; Skrynnikova, E. V.; Somova, N. G. Search for Micromycetes Producing Extracellular Catalase and Study of Conditions of Catalase Synthesis. Applied Biochemistry and Microbiology. 2001; 37, 59-64.
- [13] Yang, L. Zu, Y. G.; Tang, Z. H. Ethylene improves *Arabidopsis* salt tolerance mainly via retaining K<sup>+</sup> in shoots and roots rather than decreasing tissue Na<sup>+</sup> content, Environmental and Experimental Botany. 2013; 86, 60-69.
- [14] Mohammadi, M.; Tavakoli, A.; Saba, S. Effects of foliar application of 6- benzylaminopurine on yield and oil content in two spring safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars. Plant Growth Regulation. 2014; 73, 219-226.
- [15] Murashige, T.; Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. Physiologia Plantarum. 1962; 15, 473-497.
- [16] Beuchamp, C.; Fridovich, I. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. Biochimica Biophysica Acta. 1973; 317, 50-64.
- [17] Targovnik ,A. M.; Cascone, O.; Miranda, M. V. Extractive purification of recombinant peroxidase isozyme c from insect larvae in aqueous two-phase systems, Separation Purification Technology. 2012; 98, 199-205.
- [18] Wu, G. Q.; Zhang, L. N.; Wang, Y. Y. Response of growth and antioxidant enzymes to osmotic stress in two different wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars seedlings. Plant Soil Environ. 2012; 58, (12), 534-539.
- [19] Valetti, N. W.; Picó, G. A friendly method for *Raphanus sativus* L. (wild radish) peroxidase purifica-



- tion by polyelectrolyte precipitation. Separation Purification Technology. 2013; 19, 1–6.
- [20] Aebi, H. In Bergmeyer H U (ed) Methods of enzymatic analysis, Vol. 2, New York: Academic. 1974; 673–675.
- [21] Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976; 72, 248–254.
- [22] Turan, S.; Tripathy, B.C. Salt and genotype impact on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in two rice cultivars during de-etiolation. Protoplasma. 2013; 250(1):209-22.
- [23] Doupis, G.; Chartzoulakis, K.; Beis, A.; Patakas, A. Allometric and biochemical responses of grapevines subjected to drought and enhanced ultraviolet-B radiation. Australian Journal of Grape and Wine Research. 2011; 17, 36–42.
- [24] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature. 1970; 227, (5259), 680-85.
- [25] Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis. 1987; 8, 93-99.
- [26] Pan, Y.; Wu, L. J.; Yu, Z. L. Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis Fisch*). Plant Growth Regulation. 2006; 49, 157-165.
- [27] Manchenko, G. P. Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels. CRC Press. 2002; 163.
- [28] Ahmed, C. B.; Rouina, B. B. Sensory, S., Boukhriss, M., Abdullah, F. B. Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010; 58 (7), 4216–4222.
- [29] Molassiotis, A. N.; Sotiropoulos, T. E.; Tanou, G.; Kofidis, G. Diamantidis G & Therios I Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. Biologia Plantarum. 2006; 50(1): 61-68.
- [30] Wang, X.; Han, J. Changes of proline content, activity, and active isoforms of antioxidative enzymes in two alfalfa cultivars under salt stress. Agricultural Sciences in China. 2009; 8(4), 432-440.
- [31] Lee, D. H.; Kim, T. S.; Lee, C. B. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa L.*). Journal of Plant Physiology. 2001; 158, 737-745.
- [32] Parida, A. K.; Das, A. B.; Sanada, Y.; Mohanty, P. Effects of salinity on biochemical components of the mangrove, *Aegiceras corniculatum*. Aquat. Bot. 2004; 80(2), 77-87.
- [33] Stone, J. R.; Yang, S. Hydrogen peroxide: A signaling messenger, Antioxidant Redox Signal. 2006; 8, 243.
- [34] Saha, P.; Chatterjee, P.; Biswas, A.K. Indian Journal of Experimental Biology. 2010; 48, 93-104.
- [35] Wang, W. B.; Kim, Y. H.; Lee, H. S.; Kim, K.Y.; Deng, X.P.; Kwak, S.S. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. Plant Physiol Biochem. 2009; 47, 570-577.
- [36] Noreen; Z.; Ashraf, M. Assessment of variation in antioxidative defense system in salt-treated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. J Plant Physiol. 2009; 1;166(16), 1764-1774.
- [37] Kim, S. Y.; Lim, J. H.; Park, M. R.; Kim, Y. J.; Park, T. I.; Seo, Y. W.; Choi, K. G.; Yun, S. J. Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. J Biochem Mol Biol. 2005; 38(2), 218-24.
- [38] Wu, G. Q.; Zhang, L. N.; Wang, Y. Y. Response of growth and antioxidant enzymes to osmotic stress in two different wheat (*Triticum aestivum L.*) cultivars seedlings. Plant Soil Environ. 2012; 58,(12), 534–539.