

197

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM ME446  
TARAFINDAN ÜRETİLEN ABSİSİK ASİT,  
SENTETİK ABSİSİK ASİT ve METİL  
ESTERLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI

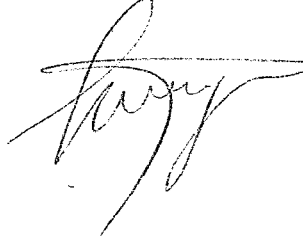
Nesrin ÖZMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI


"Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne"

İş bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Suna BOZCUK



Üye Doç. Dr. Bayram YILDIZ



Üye Yrd. Doç. Dr. Ş. Fatih TOPCUOĞLU



Onay

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

26/09/1991

Doç. Dr. Sadık KELEŞ

Enstitü Müdürü



## Ö Z E T

Bu çalışmada, sentetik metillenmemiş- ve metillenmiş-absisik asit (ABA) ile *Phanerochaete chrysosporium* ME446'dan elde edilen metillenmemiş- ve metillenmiş-ABA'nın biyolojik aktivitelerinde bir farklılığın olup olmadığı incelenmiştir. Ayrıca, metillemenin sentetik ve fungal ABA'nın biyolojik aktivitesinde değiştirip değiştirmediği araştırılmıştır. Deneylerde ABA'nın etkisi yulaf koleoptil büyüme testi ile test edilmiştir. Testlerde  $10^{-4}$ M ABA çözeltileri kullanılmıştır.

*P. chrysosporium* ME446'dan elde edilen ABA'nın miktar tayininde spektrofotometre tekniği kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda elde edilen bulgulara ve varyans analizi sonuçlarına göre, sentetik metillenmemiş- ve metillenmiş-ABA ile fungal metillenmemiş- ve metillenmiş-ABA'nın biyolojik aktivitelerinde bir farklılığın olmadığı bulunmuştur. Ayrıca, metilleme işleminin her iki tip ABA'nın büyüme inhibisyonu üzerindeki biyolojik aktivitesini değiştirmediği saptanmıştır.

## ABSTRACT

In this study, differences in biological activities of methylised and non-methylised abscisic acid (ABA) were compared with that of methylised and non-methylised ABA obtained from *Phanerochaete chrysosporium* ME446. In addition, it has also been investigated that whether methylation of fungal and synthetic ABA results in any difference of biological activities of these chemicals. In the experiments, the effects of ABA were tested using with *Avena* coleoptile growth test. ABA solutions prepared at  $10^{-4}$  M concentration were used in the tests. The quantities of ABA obtained *P. chrysosporium* ME446 were determined using spectrophotometric technique.

The results obtained from experiments and statistical analysis showed that there is no difference in biological activities between methylised and non-methylised synthetic ABA and methylised and non-methylised fungal ABA. Moreover it was also shown that methylation of both kind of ABA has not been resulted in any change in the biological activity regarding to inhibition of growth.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın tez konusu olarak seçiminde ve planlanmasında bana yön veren ve çalışmalarım sırasında katkılarını esirgemeyen, değerli tez hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ş. Fatih TOPÇUOĞLU'na, çalışmalarım süresince yardım, uyarı ve yapıcı eleştirileri ile büyük desteğini gördüğüm saygıdeğer hocam Sayın Prof.Dr. Suna BOZCUK'a (H.Ü. Fen Fakültesi) sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca, çalışmalarımda kullandığım fungus ekstraktlarını sağlayan Sayın Arş.Grv. Ali ÜNYAYAR'a, istatistiksel değerlendirmelerde yardımlarını gördüğüm Sayın Arş. Grv. M.Doğan GÜLKAÇ'a ve tezimin daktilo edilmesinde emeği geçen eşim Sayın Arş.Grv. Murat ÖZMEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans öğrenimim sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Fen Bilimleri Enstitüsü eski müdürü Sayın hocam Prof.Dr.A. Nihat BOZCUK'a (H.Ü. Fen Fakültesi) teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışmayı maddi olarak destekleyen İnönü Üniversitesi Araştırma Fonu'na da teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	iv
TABLolar DİZİNİ .....	v
1. GİRİŞ .....	1
2. MATERYAL ve METOD .....	6
2.1. Kullanılan Fungus ve Üretim Tekniği .....	6
2.2. ABA Ekstraksiyon ve Saflaştırma İşlemleri .....	6
2.3. Evaporasyon İşlemleri .....	10
2.4. Metilleme İşlemleri .....	10
2.5. Standart Metillenmiş-ABA'nın Hazırlanması .....	12
2.6. İnce Tabaka Kromatografisi İşlemleri .....	13
2.7. ABA Bölgelerinin UV Işığında Belirlenmesi .....	13
2.8. ABA Bölgelerinin Kazınması ve Silikajelden ABA'nın Çözünmesi İşlemleri .....	14
2.9. ABA Miktarının Spektrofotometre Yöntemi İle Tayini .....	14
2.10. Biyolojik Test (Yulaf Koleoptil Büyüme Testi) İçin ABA Çözeltilerinin Hazırlanması .....	15
2.10.1. Fungal stok metillenmemiş- ve metillenmiş-ABA çözeltilerinin hazırlanması .....	15
2.10.2. Sentetik stok metillenmemiş- ve metillenmiş-ABA çözeltilerinin hazırlanması .....	16
2.11. Biyolojik Test (Yulaf Koleoptil Büyüme Testi) .....	16
2.11.1. Yulaf Koleoptil Büyüme Testi için çeşitli uygulama gruplarının hazırlanması .....	17
2.11.2. Yulaf koleoptillerinin büyütülmesi .....	17
2.11.3. Yulaf koleoptillerinin kesilmesi .....	18
2.11.4. Yulaf koleoptil boylarının ölçülmesi .....	19
2.12. İstatistik Analiz .....	19

3. BULGULAR .....	20
3.1. Çeşitli Uygulama gruplarının Yulaf Koleoptil Büyümesi Üzerine Etkileri .....	20
4. SONUÇ VE TARTIŞMA .....	23
5. KAYNAKLAR .....	26

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>sayfa</u>
Şekil 1.1 (S)-absisik asit'in yapısı .....	2
Şekil 1.2 Cis ve Trans-ABA'nın yapısı .....	2
Şekil 1.3 (S)-absisik asit'in metil esteri .....	4
Şekil 2.1 ABA ekstraktlarının saflaştırılması için uygulanan işlemlerin akış şeması .....	7
Şekil 2.2 Eterli diazald'ın destilasyon şeması ..	11
Şekil 2.3 Koleoptillerin kesilmesinde kullanılan alet .....	18
Şekil 3.1 Yulaf koleoptil büyüme testi ile çeşitli uygulama gruplarına bağlı olarak koleoptil boylarının değişimi .....	21



## TABLOLAR DİZİNİ

	<u>sayfa</u>
Tablo 3.1. Çeşitli uygulama gruplarında yulaf koleoptil büyüme testi ile elde edilen ortalama koleoptil boyları .....	20
Tablo 3.2. Çeşitli uygulama gruplarında yulaf koleoptil büyüme testi için varyans analizi sonuçları .....	22

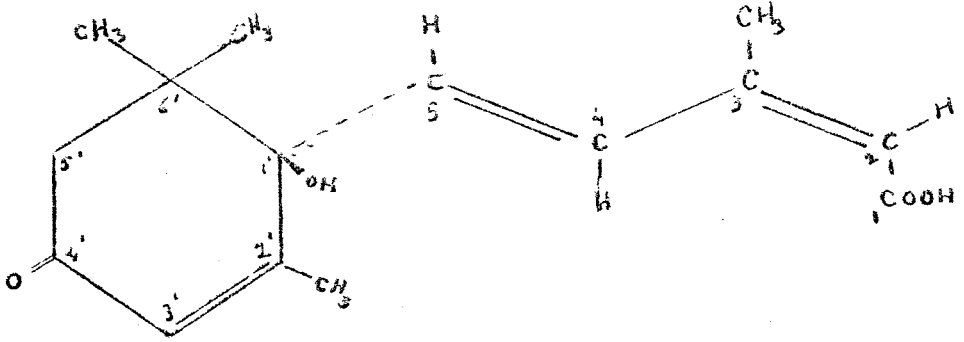
## 1. GİRİŞ

Hayvanlarda olduğu gibi, bitkilerde de yaşamsal faaliyetleri etkileyen ve hormon adı verilen büyüme maddelerinin sentezlendiği bilinmektedir. Bitki büyüme maddelerinin saptanması, kimyasal yapılarının aydınlatılması ve bitkilerde meydana gelen birçok fizyolojik olayları kontrol ettiğinin anlaşılması sonucu, insanoglu bitkilerin büyüme ve gelişmelerindeki esasları değiştirebilmiş, büyüme yavaşlatmış ya da hızlandırabilmiştir. Bitki büyüme maddelerinin bir kısmı bitki büyüme ve gelişimini uyarıp hızlandırdığından stimülatör adını alır. Auxin, gibberellin ve sitokinler bu gruba girmektedir. Diğer bir kısmı da büyüme ve gelişmeyi durduran, gerileten etkiye sahip olduğundan inhibitörler olarak adlandırılırlar. Örneğin, absisik asit (ABA) doğal bir bitki büyüme inhibitörüdür.

Günümüzde büyüme maddelerinin bitki büyüme ve gelişmesinin kontrolünde yaygın bir biçimde kullanılmaları ülkemiz için henüz başlangıç aşamasındadır. ABA'nın bitkiler üzerindeki fizyolojik etkilerinin çok çeşitli olması, onun tarımda yaygın bir şekilde kullanılabileceğini ve bu durumun tarımsal çalışmalar için büyük bir ekonomik önem taşıyabileceğini akla getirmektedir.

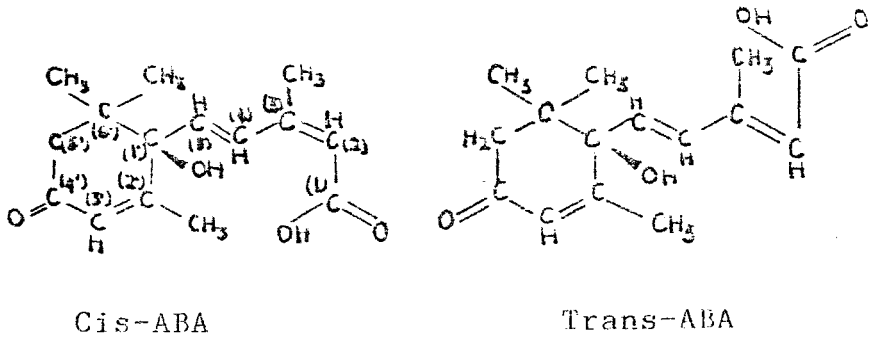
Absisik asit (ABA), 3-metil-5(1'-hidroksi-4'-okso-2', 6'-trimetil-2'-siklohekzen-1'-il)-cis, Trans-2,4-pentadienoik asittir (Addicott ve Lyon 1969). ABA'nın kapalı formülü  $C_{15}H_{20}O_4$  olup, organik çözücülerde ve suda çözünür (Ohkuma, vd. 1963; Addicott ve Lyon 1969'dan).

ABA'nın doğal olarak oluşan formu (S)-(+)-absisik asittir (Şekil 1.1). sentetik rasemik absisik asit ise (RS)-(+)-absisik asittir. Kısaca ABA'nın doğal olarak oluşan formu için (S)-ABA, sentetik rasemik formu için ise (RS)-ABA işaretleri kullanılır (Addicott ve Lyon 1969; Weaver 1972).



Şekil 1.1 (S)-absisik asit'in yapısı (Addicott ve Lyon 1969'dan).

Doğal olarak oluşan ABA daima (+) formundadır (Phillips 1971). ABA'nın cis ve trans olmak üzere iki geometrik izomeri vardır (Şekil 1.2). Bir çok bitkide ABA'nın doğal olarak oluşan izomeri cis-ABA olup, literatürde "ABA" olarak kısaltılmıştır (Milborrow 1970).

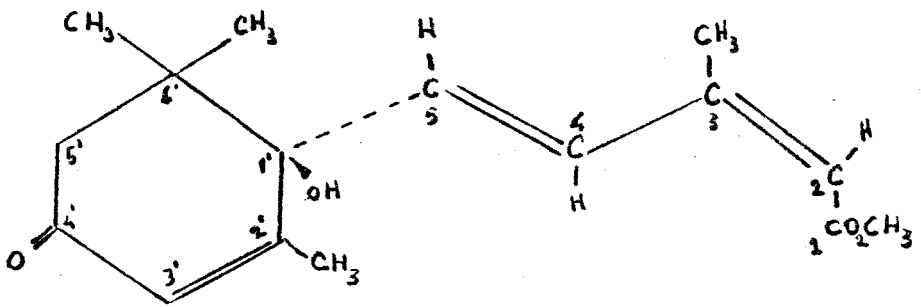


Şekil 1.2. Cis ve trans-ABA'nın yapısı (Phillips 1971'den).

Bitkilerde ABA'nın daha çok yapraklarda sentezlendiği kabul edilmekte (Kaşka 1971; Hoad 1973;1975; Zeevaart 1977; Setter ve Burn 1981), kök gibi diğer organlarda ise sentezi yolunda çelişkili görüşler ileri sürülmektedir (Bradford ve Hsiao 1982: Sakurai, vd. 1985'den). Literatürlere göre ABA çeşitli bitkilerin yaprak, gövde, kök, tohum, embriyo, endosperm, tohum kabuğu, tomurcuk, rizom ve tuber gibi çok değişik kısımlarında yüksek miktarlarda bulunmuştur (Dörffling 1972; Weaver 1972). Bundan başka ABA'nın varlığı çeşitli bitkilerin floem (Hoad 1973; 1978; Zeevaart 1977) ve ksilem (Hoad 1975; Loveys 1977)

olabileceği de bildirilmiştir (Bozcuk ve Topçuoğlu 1982).

Organik maddelerin molekül yapılarının aşırı sıcaklık, şiddetli ışık gibi çeşitli faktörlerle etkilendiği ve buna bağlı olarak da fizyolojik etkisinin değiştiği bilinmektedir. ABA'nın da bir organik madde olması nedeniyle molekül yapısının bazı çevresel faktörlerden etkileneceği ve inaktivasyona uğrayabileceği düşünülmektedir. Bu durumun önlenmesi için ABA'nın metillenmesi gerektiğine inanılmaktadır. Ancak günümüze kadar, ABA'nın metillenmesi durumunda biyolojik aktivitelerinde bir değişikliğin olup olmadığı konusunda kesin ve yeterli literatüre rastlanmamıştır. Bu literatürler incelendiğinde bulguların da çelişkili olduğu görülmektedir. Bu konuda Koshimizu ve arkadaşları (1966), yaptıkları bir çalışmada ABA'nın metil esterlerinin (Şekil 1.3) büyüme inhibisyonu üzerinde aktif olduğunu saptamışlardır. Başka bir çalışmada ise ABA-metil esterinin büyümeyi inhibe etmediği rapor edilmiştir (Jones ve Mansfield 1971). Ayrıca yine bu konuda yapılan diğer bir çalışmada da ABA-metil esterinin stomaların kapanmasında inaktif olduğu belirtilmiştir (Kriedemann, vd. 1972).



Şekil 1.3. (S)-absisik asit'in metil esterini (Milborrow 1974' dan değiştirilerek).

Bazı fungusların sekonder bir metabolit olarak ABA sentezlediklerine ilişkin kanıtların bulunması (Assante vd. 1977; Marumo vd.1982; Horgan, vd. 1983; Bennett, vd.

1984; Yamashita 1985; Kettner ve Dörffling 1987; Norman, vd. 1988; Ünyayar 1990; Ünyayar, vd. 1990) ve funguslar tarafından üretilen ABA miktarlarının bitkilerdeki ortalama ABA miktarlarına göre çok daha yüksek değerlerde olduğunun rapor edilmesi (Assante, vd. 1977), funguslar tarafından üretilen ABA'nın biyolojik aktivitesinin çalışılmasını akla getirmektedir. Böyle bir çalışmanın sonucunda elde edilecek bulguların da funguslar tarafından üretilen ABA'nın tarımsal alanlarda kullanılabileceği konusunda bir fikir vereceğine inanılmaktadır.

İşte bu nedenlerle, ülke ekonomisine katkıda bulunmak üzere, çeşitli tarımsal alanlarda kullanılabilir özelliğinden dolayı, hem funguslarca üretilen ABA'nın hem de sentetik ABA'nın karşılaştırmalı olarak biyolojik aktivitelerini test etmek ve ayrıca bunların metillenmesi durumunda, biyolojik aktivitelerinde bir farklılığın olup olmadığını belirlemek amacı ile yapılan bu çalışma Yüksek Lisans Tezi konusu olarak seçilmiştir.

Bu çalışmada materyal olarak kullandığımız fungus türünün seçiminde Bölümümüz laboratuvarlarında kolayca üretilebilirliği etken olmuştur.

## 2. MATERYAL ve METOD

### 2.1. Kullanılan Fungus ve Üretim Tekniği

Çalışmamızda Basidiomycetes sınıfına giren beyaz çürükçül funguslardan *Phanerochaete chrysosporium* ME446 kullanılmıştır. Bu fungus İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarından temin edilmiştir.

Bu fungus batık kültür tekniği ile, stok bazal ortamında (SBM) Yeşilada ve arkadaşları (1989) ve Ünyayar ve Kolankaya (1990)'ya göre üretilmiştir.

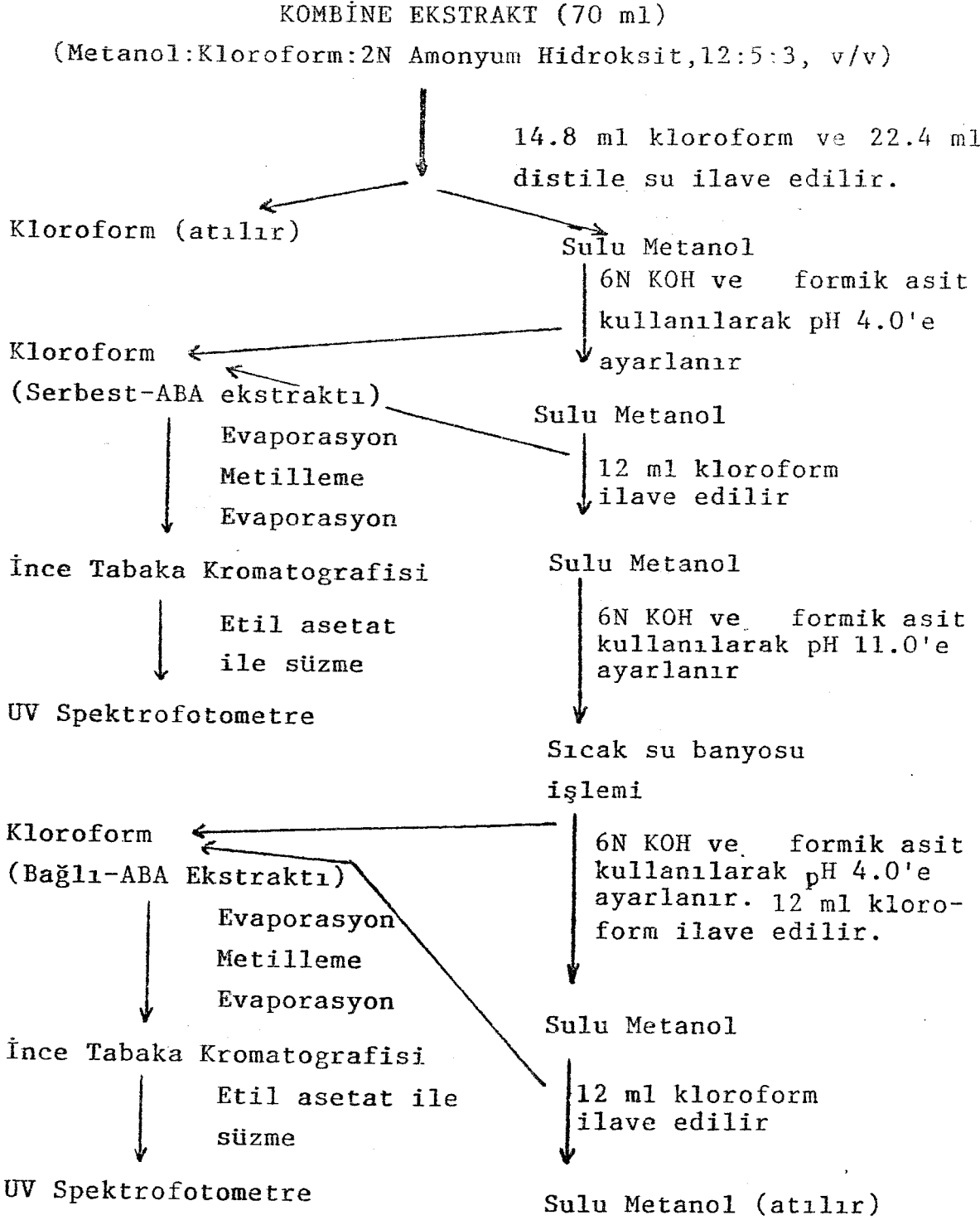
### 2.2. ABA Ekstraksiyon ve Saflaştırma İşlemleri

ABA ekstraksiyonu ve saflaştırılması küçük değişiklikler ile Topçuoğlu (1987) ve Ünyayar (1990)'a göre yapılmıştır. *P. chrysosporium* ME446'nın hücre dışı kültür filtratlarındaki ABA ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında kullanılan bu yöntem sırasıyla aşağıda olduğu gibi uygulanmıştır.

- a) Fungus türüne ait hücre dışı kültür filtratlarından 10'ar ml numune alınmıştır.
- b) Numuneler içinde 60 ml ekstraksiyon solventi (metanol-kloroform-2N amonyum hidroksit, 12:5:3, v/v) bulunan 100 ml'lik kapaklı, renkli şişelere konularak etiketlenmiştir. ABA'nın ışıktan ve pH değişimlerinden etkilenmesi için, şişelerin kapaklarının içi ve şişelerin dış yüzeyleri alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Böylece, saflaştırma işlemine hazır kombine ekstraktlar (70 ml) elde edilmiştir (Şekil 2.1).

Daha sonra bu şişeler  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda bir hafta süreyle saklanmıştır.

- c) Bu kombine ekstraktlar, 250 ml'lik ayırma hunilerine



Şekil 2.1. ABA ekstraktlarının saflaştırılması için uygulanan işlemlerin akış şeması (Topçuoğlu 1987; Ünyayar 1990'dan).

alınmış ve üzerlerine 14.8 ml kloroform ile 22.4 ml distile su konulmuştur. Bu ayırma hunileri kuvvetli olarak 3-4 kez çalkalanarak kloroform ve sulu metanol fazlarının birbirinden net olarak ayrılması sağlanmıştır. İki fazın birbirinden net olarak ayrılmadığı durumlarda güçlü bir hava kompresörü vasıtasıyla kloroform fazı içine hava üflenerek, ayırma işlemi çabuklaştırılmıştır. Altta kalan kloroform fazları ayırma hunilerindeki musluklar yardımıyla atılmıştır.

d) Ayırma hunilerinde kalan sulu metanol fazlarının pH'sı formik asit ve 6N KOH kullanılarak, 4.0'e ayarlanmıştır.

e) 100 ml'lik cam ekstraksiyon balonları hazırlanmıştır. Bunun için ekstraksiyon balonları kloroform ile çalkalanarak temizlenmiş ve ağızları açık kalacak şekilde dış tarafı alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Dik durabilmesi içinde uygun plastik kaplara yerleştirilmiştir.

f) Ayırma hunilerinde kalan ve pH'sı 4.0'e ayarlanmış sulu metanol fazlarının üzerlerine 12.0 ml kloroform eklenmiştir. Bu ayırma hunileri kuvvetli olarak 3-4 kez çalkalanarak, kloroform ve sulu metanol fazlarının homojen bir şekilde karıştırılıp, dinlenme sırasında birbirinden net olarak ayrılması sağlanmıştır. Altta kalan kloroform fazları ayırma hunilerindeki musluklar yardımıyla, daha önceden hazırlanan ekstraksiyon balonlarına alınmıştır.

g) Ayırma hunilerinde kalan ve pH'sı 4.0'e ayarlanmış sulu metanol fazlarının üzerine tekrar 12.0 ml kloroform konulmuştur. Ayırma hunileri kuvvetli olarak tekrar 3-4 kez çalkalanarak kloroform ve sulu metanol fazları birbirinden net olarak ayrılması sağlanmıştır. Altta kalan kloroform fazı ayırma hunilerindeki musluklar yardımıyla aynı ekstraksiyon balonlarına alınmıştır. Böylece ilk olarak balonlara alınan bu kloroform fazları içindeki ABA, serbest-ABA'dır. Bu ekstraksiyon balonları ağızları alüminyum folyo ile sıkıca kapatıldıktan sonra,  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda evaporasyon işlemine kadar saklanmıştır.



h) Ayırma hunilerinde kalan sulu metanol fazlarının pH'sı formik asit ve 6N KOH kullanılarak, 11.0'e ayarlanmıştır.

ı) Ayırma hunilerinde kalan ve pH'sı 11.0'e ayarlanmış sulu metanol fazları 100 ml'lik erlenlere alınmıştır. Erlenler ağızları fazla sıkı olmamak üzere folyo ile kapatılarak, 1 saat süreyle 62°C'de su banyosunda bırakılmıştır. Ancak, erlenler bu süre içinde her 10 dakikada bir çalkalanmıştır.

j) Bir saat sonra erlenler su banyosundan çıkarılmış ve içlerindeki sulu metanol fazlarının pH'sı formik asit ve 6N KOH kullanılarak 4.0'e ayarlanmıştır.

k) 5 no.lu işlem tekrarlanmıştır.

l) Erlenler içinde bulunan ve pH'sı 4.0'e ayarlanmış sulu metanol fazları ayırma hunilerine alınmıştır. Daha sonra, ayırma hunilerindeki bu sulu metanol fazları üzerine 12.0 ml kloroform konulmuştur. Ayırma hunileri, kuvvetli olarak 3-4 kez çalkalanarak, kloroform ve sulu metanol fazlarının homojen şekilde karışması ve dinlenme sırasında birbirinden net olarak ayrılması sağlanmıştır. Altta kalan kloroform fazları ayırma hunilerindeki musluklar yardımıyla, daha önce hazırlanan ekstraksiyon balonlarına alınmıştır.

m) Ayırma hunilerinde kalan, pH'sı 4.0'e ayarlanmış sulu metanol fazlarının üzerlerine tekrar 12.0 ml kloroform konulmuş ve yukarıda açıklanan işlemler yinelenmiştir. Böylece, ikinci kez ekstraksiyon balonlarına alınan bu kloroform fazları içindeki ABA ise bağlı-ABA'dır. Bu balonlarda ağızları alüminyum folyo ile sıkıca kapatıldıktan sonra -80°C'de derin dondurucuda evaporasyon işlemine kadar saklanmıştır.

n) Ayırma hunilerinde kalan sulu metanol fazları atılmıştır.

### 2.3. Evaporasyon İşlemleri

Ekstraksiyon balonlarında bulunan hem serbest-ABA, hem de bağlı-ABA ekstraktlarını içeren kombine kloroform fazları Rota-Evaporatör aleti ile 45°C'de su banyosu içinde tamamen kuruyuncaya kadar, evapore edilmiştir. Evaporasyon işlemi sonunda numunelerin bir kısmı metillenmeden, bir kısmı da metillendikten sonra ince tabaka kromatografi işlemleri yapılmıştır.

### 2.4. Metilleme İşlemleri

1. Kuruyan numunelerin metillenmesinde kullanılan diazometan Şekil 2.2.' de görülen düzenek yardımıyla ve Topçuoğlu (1987)'nin yöntemi esas alınarak elde edilmiştir.

Eterli diazald'ın destilasyonu için:

a) 100 ml'lik erlenler içerisinde, 5.0 g KOH 8.0 ml distile suda eritilmiştir. Daha sonra üzerine %96'lık 25.0 ml etil alkol ilave edilmiş ve bu karışım, 65°C'de su banyosu içinde bulunan balonun içine (B) konulmuştur.

b) 250 ml'lik erlenler içerisinde, 21.5 g diazald (N-metil-N-nitroso-p-toluensülfonamid) 200 ml eter ile eritilmiştir. Bu eterli diazald 250 ml'lik bir ayırma hunisine (A) boşaltılmıştır. Ayırma hunisi, Şekil 2.2.'de görüldüğü gibi sisteme monte edilmiştir.

c) Destilasyon sonucu eterli diazald'ın toplanacağı balonun (C) etrafına buz parçaları yerleştirilmiştir.

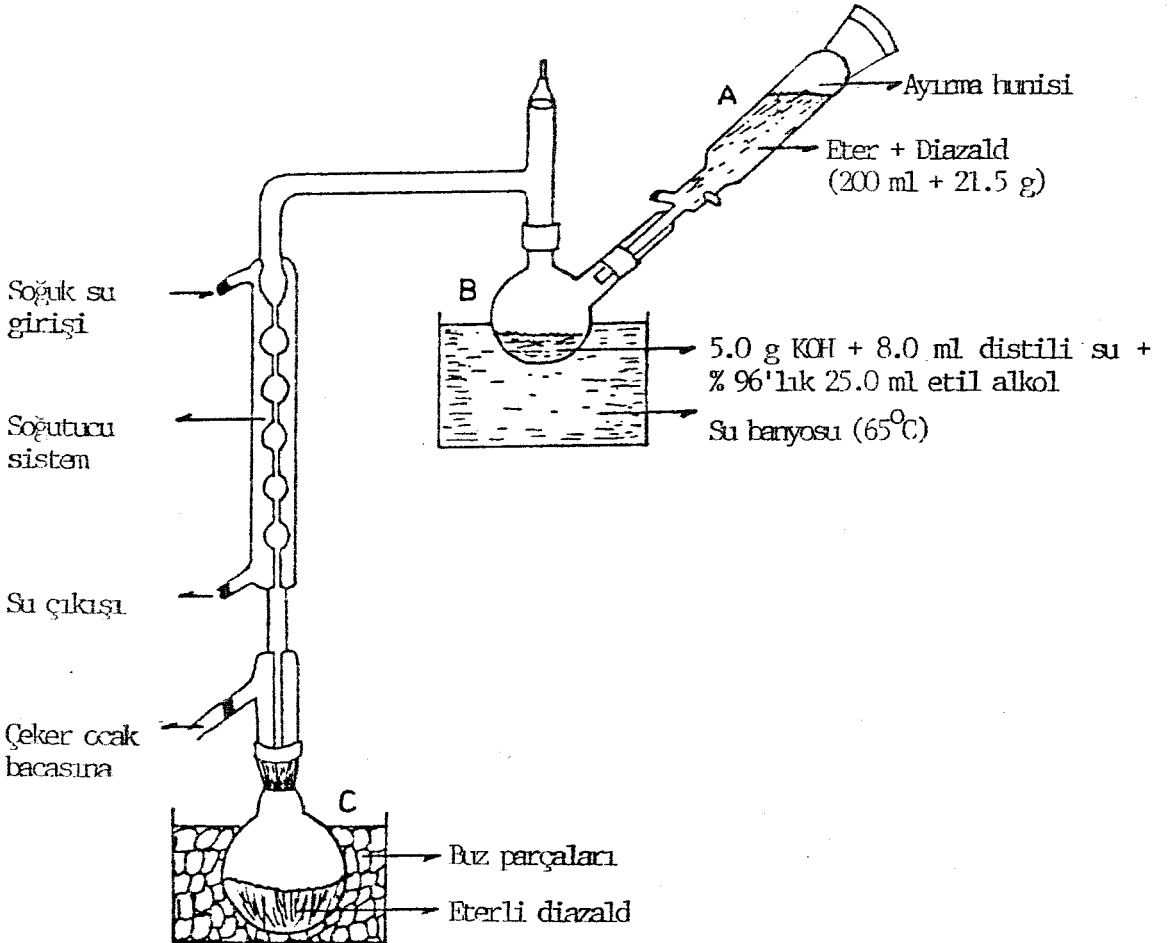
d) Soğutucu sistem için gerekli suyun akışı sağlanmıştır.

e) Ayırma hunisinin musluğu çok hafif açılarak, eterli diazald'ın damla damla su banyosu içindeki balona boşalması sağlanmıştır.

f) Destilasyon sonucunda altın sarısı renkte elde

edilen eterli diazald, 9:1 v/v oranında metanol ile karıştırılmıştır.

g) Tüm bu işlemler sonucu elde edilen eterli diazometan, dış tarafı alüminyum folyo ile sarıllı renkli bir şişe içerisinde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda metilleme işlemine kadar saklanmıştır. Diazald çok zehirli bir madde olduğu için eterli diazald'ın destilasyonu çeker ocak içinde yapılmıştır.



Şekil 2.2. Eterli diazald'ın destilasyon şeması (Topçuoğlu 1987'den).

2. Kuruyan numuneler elde edilen eterli diazometan ile metillenmiştir. Bunun için, içinde kurumuş numuneler bulunan ekstraksiyon balonlarına 5.0'er ml eterli diazometan konulmuştur. Ekstraksiyon balonları 30 dakika çeker ocak içinde bekletilmiştir. Balonlar bu süre esnasında ara sıra çalkalanmıştır. Bu süre sonunda ekstraksiyon balonlarında kalan eterli diazometan 2.3 de verilen yöntemle göre evapore edilmiştir. Evaporasyon işleminden sonra içinde metillenmiş ABA ekstraktlarının bulunduğu ekstraksiyon balonlarının ağızları parafilm ve alüminyum folyo ile sıkıca kapatıldıktan sonra,  $-80^{\circ}\text{C}$ ' de derin dondurucuda ince tabaka kromatografisi işlemlerine kadar saklanmıştır.

Ekstraksiyon balonlarında bulunan bu metillenmiş ABA ekstraktları, metillenmemiş-ABA ekstraktları ile birlikte, ince tabaka kromatografisinde kullanılacak esas numunedir.

## 2.5. Standart Metillenmiş-ABA'nın Hazırlanması

Standart metillenmiş-ABA (Standart-Me-ABA), serbest ve bağlı-ABA ekstraktlarının metillenmesine uygun olarak, sentetik-ABA'nın (Sigma, No:A-7383) eterli diazometan ile metillenmesiyle hazırlanmıştır.

İnce tabaka kromatografisi çalışmalarında standart olarak  $10^{-2}$  M ABA kullanılmıştır.  $10^{-2}$  M ABA hazırlamak için 50.0 ml'lik ekstraksiyon balonu içerisinde 26.4 mg sentetik-ABA 10.0 ml eterli diazometan ile çözülmüştür. İçerisinde çözülmüş ABA bulunan ekstraksiyon balonu 30 dakika çeker ocak içerisinde bekletilmiştir. Bu süre sonunda evaporasyon işlemi ile metillenen ABA kurutulmuştur. Metillenmiş ve kurumuş ABA'nın üzerine 10.0 ml toluen ilave edilerek, çalkalanmıştır. Böylece, çalışmalarda kullanılan metillenmiş  $10^{-2}$  M ABA hazırlanmıştır.

Hazırlanan  $10^{-2}$  M ABA, dış tarafı alüminyum folyo ile sarılı renkli şişelerde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklanmıştır.

## 2.6. İnce Tabaka Kromatografisi İşlemleri

1. İnce tabaka kromatografisi plakaları (20x20 cm) inorganik floresans bir bileşik içeren silikajel  $\text{GF}_{254}$  ile 0.25 mm kalınlığında kaplanmıştır. Daha sonra bu cam plakalar etüvde  $100^{\circ}\text{C}$ 'de 90 dakika kurutulmuştur.

2. Cam plakalar, kenarlarından 2.0 mm kazınarak, eşit beş bölüme ayrılmıştır. Bu bölümlerden ilk dördüne metilenmemiş- veya metillenmiş-ABA ekstraktları, 5.sine ise standart-Me-ABA tatbik edilmiştir.

3. Ekstraksiyon balonlarında bulunan metillenmemiş- ya da metillenmiş-ABA ekstraktları, her defasında 0.5 ml etil asetat ile çözümlenerek, iki defa çok ince uçlu pastör pipeti yardımı ile etiketlerine göre cam plakalar üzerine bant oluşturularak tatbik edilmiştir. Ayrıca, her cam plaka üzerine nokta halinde iki damla  $10^{-2}$  M standart-Me-ABA tatbik edilmiştir.

4. Bu cam plakalar, içerisinde kloroform-etil asetat (9:1 v/v) karışımı solvent bulunan ince tabaka kromatografisi tankı içine yerleştirilmiştir. Cam plakalar solvent sistemi üst kenara yükselene kadar tankın içinde bekletilmiştir. Solvent sisteminin yükselmesi tamamlandığında cam plakalar tanktan çıkarılmış ve daha sonra bir vantilatör karşısında kurutulularak etiketlenmiştir.

## 2.7. ABA Bölgelerinin UV Işığında Belirlenmesi

ABA bölgelerinin belirlenmesinde ultraviyole ışığı kullanılmıştır. ABA bölgeleri 254 nm dalga boyundaki UV

ışığında mor renkte lekeler halinde görülmüştür.

## 2.8. ABA Bölgelerinin Kazınması ve Silikajelden ABA'nın Çözünmesi İşlemleri

UV ışığında belirlenen ABA bölgeleri, standart-Me-ABA bölgesinin altından ve üstünden geçen birer çizgi ile işaretlenmiştir. Cam plakalar üzerindeki işaretli ABA bölgelerini içeren silikajel uygun bir kazıcı yardımıyla kazınarak, temiz bir kağıt üzerine alınmıştır.

Kağıt üzerine alınan silikajel, boğaz kısımlarına cam pamuğu yerleştirilmiş pastör pipetlerine boşaltılmıştır. Pastör pipetlerindeki silikajelden 2.0 ml etil asetat geçirilerek, ABA 10.0 ml'lik cam tüplere alınmıştır.

Daha sonra tüpler içindeki etil asetat bir vantilatör kaşısında uçurularak, metillenmemiş- ya da metillenmiş-ABA saf olarak elde edilmiştir.

İçinde kuru ve saf halde ABA ekstraktı bulunan cam tüpler etiketlenip, alüminyum folyoya sarılarak, UV spektrofotometre aletinde okununcaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklanmıştır.

## 2.9. ABA Miktarının Spektrofotometre Yöntemi ile Tayini

Metillenmemiş- ya da metillenmiş-ABA miktarlarının spektrofotometre yöntemiyle tayini, Milborrow ve Robinson (1973) ve Ünyayar (1990)'a göre yapılmıştır. Metillenmemiş- ve metillenmiş-ABA numunelerinin absorbansları spektrofotometre (Phillips, DU 8625) aletinde sırasıyla 244 nm ve 240 nm dalga boylarında ölçülerek, miktar tayini aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

$A_{244}$  = Absorbans (metillenmemiş-ABA)

$A_{240}$  = Absorbans (metillenmiş-ABA)

$c$  = Yoğunluk (mol/lt)

$\epsilon^{10312}$  = Molar soğurganlık (metillenmemiş-ABA)

$\epsilon^{12061}$  = Molar soğurganlık (metillenmiş-ABA)

$l$  = 1 cm (küvet uzunluğu)

## 2.10. Biyolojik Test (Yulaf Koleoptil Büyüme Testi) İçin ABA Çözeltilerinin Hazırlanması

### 2.10.1. Fungal stok metillenmemiş- ve metillenmiş-ABA çözeltilerinin hazırlanması

Bu çalışmada *P. chrysosporium* ME446 fungusuna ait hücre dışı kültür filtratlarından metillenmemiş-ABA ekstraksiyonu ve saflaştırılması 23 adet numunede, metillenmiş-ABA ekstraksiyonu ve saflaştırılması ise 24 adet numunede yapılmıştır. Her bir metillenmemiş- ve metillenmiş-ABA numunesi 0.1 ml metanolde çözünmüş ve üzerine 4.9 ml distile su ilave edilerek hazırlanmıştır. Daha sonra, bu hazırlanan ABA numunelerinin kör (0.1 ml metanol + 4.9 ml distile su)' e karşılık absorbansları bulunmuştur. Okuma işleminde gerek kör, gerekse ABA numuneleri 5.0'er ml olarak alınmıştır.

Herbir numuneden ABA ekstraksiyonu, saflaştırılması ve miktar tayini sonucunda elde edilen serbest-ve bağlı-ABA değerlerinin toplamı, toplam ABA miktarını ifade etmektedir. Metillenmemiş-ABA için toplam ABA miktarı, 23 adet numune için elde edilen toplam ABA değerleri toplanarak  $2.0239 \times 10^{-3}$  M /115 ml, metillenmiş-ABA için toplam ABA miktarı ise 24 adet numune için elde edilen toplam ABA değerleri toplanarak,  $2.8282 \times 10^{-3}$  M /120 ml olarak

bulunmuştur. Daha sonra, bu stok çözeltilerden biyolojik testte kullanılmak üzere, sulandırma işlemi ile, herbiri için  $10^{-4}M$  / 20.0 ml çözeltiler hazırlanmıştır.

#### 2.10.2. Sentetik stok metillenmemiş- ve metillenmiş-ABA çözeltilerinin hazırlanması

Sentetik stok metillenmemiş- ve metillenmiş-ABA çözeltileri fungal stok metillenmemiş-ve metillenmiş-ABA çözeltilerinin konsantrasyonlarına eşdeğer olarak  $10^{-4}M$  / 10.0 ml hazırlanmıştır.

Sentetik stok metillenmiş-ABA çözeltilisini hazırlamak için 50.0 ml'lik ekstraksiyon balonu içinde 0.264 mg ABA 0.2 ml metanolde çözülmüş ve üzerine 9.8 ml eterli diazometan ilave edilmiştir. Bu ekstraksiyon balonu 30 dakika çeker ocakta bekletilmiştir. Bu süre sonunda metillenen ABA evaporasyon işlemi ile kurutulmuştur. Metillenmiş ve kurumuş ABA 0.2 ml metanolde tekrar çözülmüş ve üzerine 9.8 ml distile su ilave edilmiştir.

Metillenmemiş-ABA hazırlamak için ise 0.264 mg ABA 0.2 ml metanolde çözülmüş ve üzerine 9.8 ml distile su ilave edilmiştir. Böylece, biyolojik testte kullanılmak üzere sentetik stok çözeltiler hazırlanmıştır.

#### 2.11. Biyolojik Test (Yulaf Koleoptil Büyüme Testi)

ABA'nın kalitatif (nitel) olarak tayininde kullanılan biyolojik test Nitsch ve Nitsch (1956)'in geliştirdiği ve Kaşka (1970)'nin bazı değişiklikler yaparak uyguladığı "yulaf koleoptil büyüme testi" tekniğine göre yapılmıştır. Deneylerde Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesinden sağlanan ANKARA 76 PN:801 1990 ürünü yulaf (*Avena sativa*) kullanılmıştır.



### 2.11.1. Yulaf koleoptil büyüme testi için çeşitli uygulama gruplarının hazırlanması

Yulaf koleoptil büyüme testi için çeşitli uygulama grupları aşağıda gösterildiği şekilde hazırlanmıştır. Deneyler üç'er tekrarlı olarak yapılmıştır.

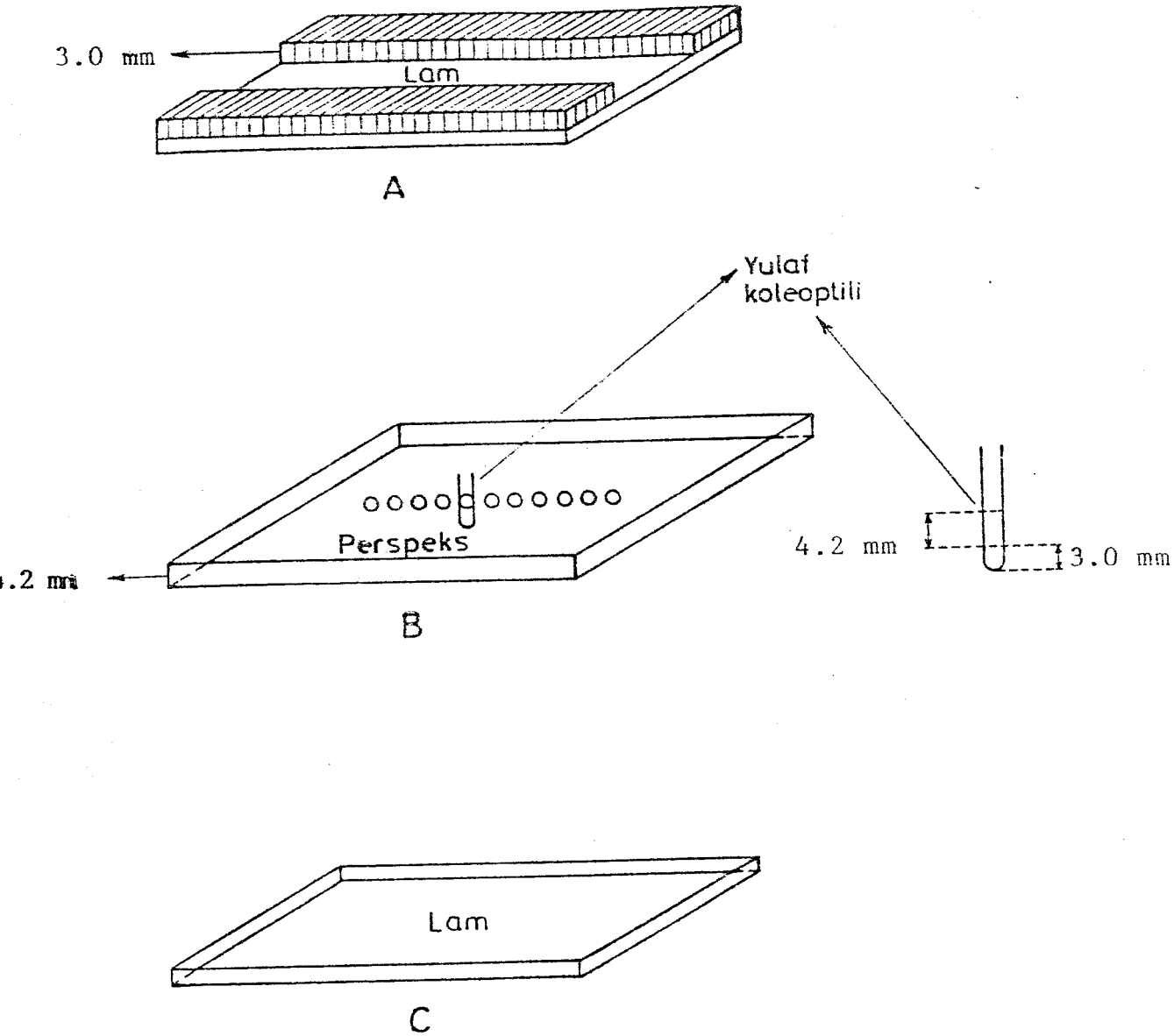
1. Distile su (Kontrol) Grubu
2. Distile su+Metanol (Kontrol) Grubu  
(0.2 ml metanol + 9.8 ml distile su)
3. Sentetik Metillenmemiş-ABA Grubu
4. Sentetik Metillenmiş-ABA Grubu
5. Fungal Metillenmemiş-ABA Grubu
6. Fungal Metillenmiş-ABA Grubu

### 2.11.2. Yulaf koleoptillerinin büyütülmesi

Yulaf tohumları, içerisinde distile su bulunan beherlere konularak 12 saat süreyle şişmeye bırakılmıştır. Şişme sırasında tohumlar güçlü bir hava kompresörüne bağlanan havalandırma sistemi ile havalandırılmıştır. Tohumların şişmesi bu şekilde sağlandıktan sonra, önceden hazırlanmış olan ve içinde gürgen talaşı bulunan plastik kaplara tek tek bir pens yardımıyla yerleştirilmiştir. Kaplara akşamları bir miktar çeşme suyu püskürtülerek, üzerleri cam plakalarla kapatılmış ve 25°C'lik karanlık bir odada tutulmuştur. Koleoptillerin büyümesi kontrollü olarak izlenmiş, ikinci günde koleoptil boyları cam plakalara ulaştığında, plakalar kaldırılmış ve koleoptil büyümesi bu şekilde devam etmiştir. Üçüncü gün sonunda koleoptil boyları 2.0-2.5 cm uzunluğuna erişmiştir.

### 2.11.3. Yulaf koleoptillerinin kesilmesi

Yulaf koleoptillerinin testte kullanılan kısmı tepeden itibaren 3.0-7.2 mm'lik kısmına karşılık gelen 4.2 mm'lik silindirik şeklindeki parçalardır. Bu parçaların 10'luk gruplar halinde seri olarak kesilmesini kolaylaştırmak için, Kaşka (1970)'nin kullandığı alet kullanılmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Koleoptillerin kesilmesinde kullanılan alet

Alet üç parçalı olup, önce (b) kısmı (a) kısmının 3.0 mm kalınlıktaki eşikleri üzerine tesbit edilmiş ve (b) kısmındaki deliklerden tepe kısımları (a) kısmının tabanına değinceye kadar sokulan koleoptiller keskin bir jilet ile üstten kesilmiş ve bu kısma (c) kısmı kapatılarak, aletin alt kısmı üste gelecek şekilde çevrilmiş ve (a) kısmı buradan alınmıştır. Bu şekilde (b) kısmının üstünde kalan yulafın 3.0 mm'lik tepe kısımları kesildikten sonra (b) kısmı içinde kalan 4.2 mm'lik on adet yulaf silindiri önceden hazırlanan deney grupları planına göre etiketlenmiş 2.5x7.5 cm boyutlarındaki cam tüplere alınmıştır. Her bir numune tüpüne etiketine uygun olarak 2.0 ml çözelti konulmuş ve tüplerin ağzı parafilm ile kapatılarak, tüpler alüminyum folyo ile sarılmıştır. Numune tüpleri 25°C'deki karanlık odada 24 saat süreyle bekletilmiştir.

#### 2.11.4. Yulaf koleoptil boylarının ölçülmesi

Numune tüplerindeki yulaf koleoptilleri 24 saat sonra alınarak, boyları Nikon SMZ 10 model stereo mikroskop altında milimetrik bir cetvel ile ölçülmüştür. Daha sonra, her bir numune tüpünde bulunan 10 adet yulaf koleoptil uzunluğunun ortalaması alınarak, her bir deney grubunun bir tekrarı için ortalama yulaf koleoptil boyu bulunmuştur. Her bir deney grubu için ortalama yulaf koleoptil boyu ise, üç tekrarın ortalamasıdır.

#### 2.12. İstatistik Analiz

Çalışmamızda, verilerimiz için ortalamalar ve standart hatalar hesaplanmıştır. Metillenmemiş- ve metillenmiş- sentetik-ABA ve fungal-ABA'nın biyolojik aktivitelerinin karşılaştırılması ve metillenmenin hem sentetik-ABA, hem de fungal-ABA'nın biyolojik aktiviteleri üzerine etkisini incelemek amacıyla varyans analizi yapılmıştır (Kutsal ve Muluk 1975).

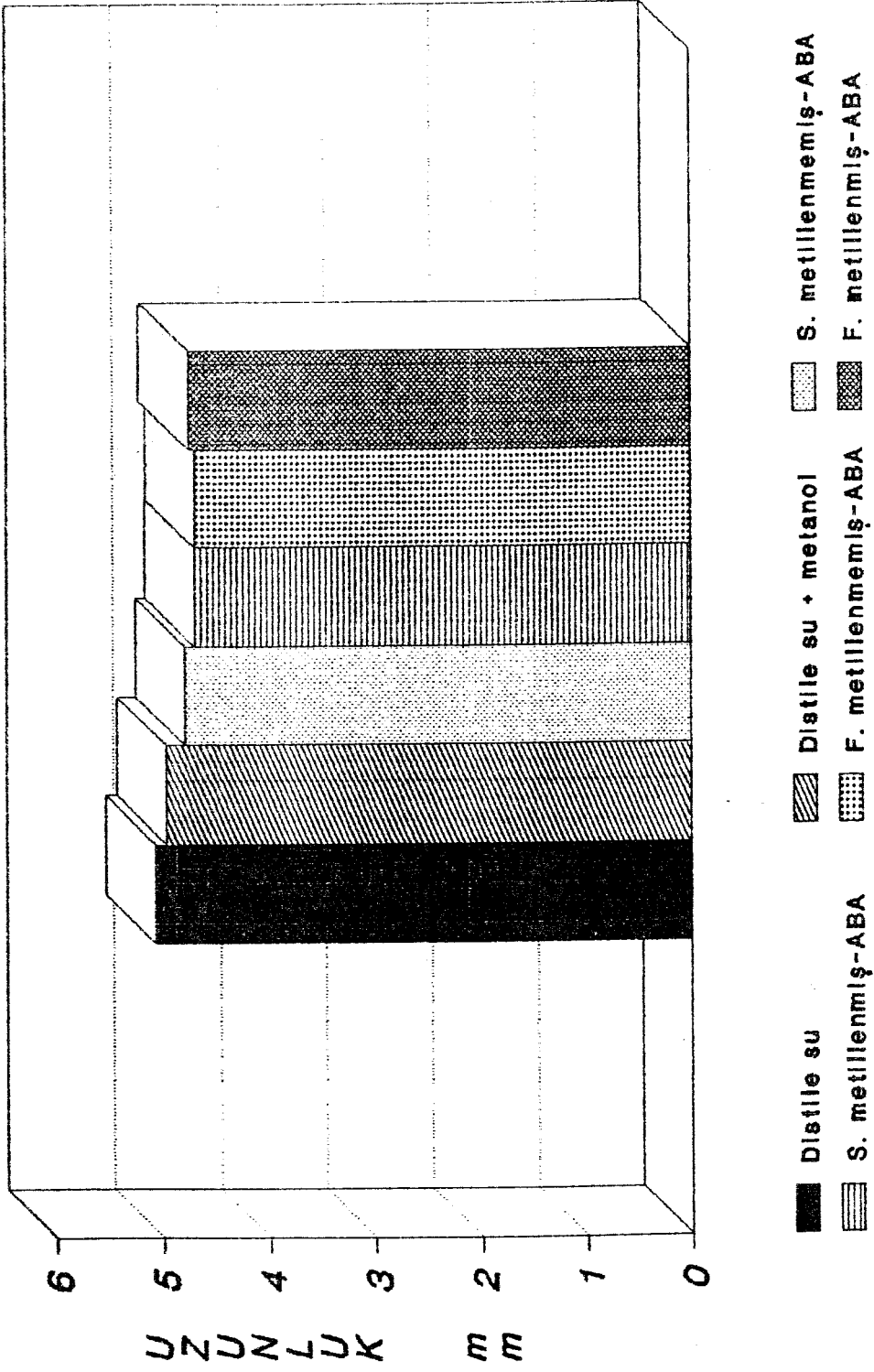
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Çeşitli Uygulama Gruplarının Yulaf Koleoptil Büyümesi Üzerine Etkileri

Yulaf koleoptillerinin büyümesi üzerine kontrol grubu olarak distile suyun etkisi incelendiğinde, ortalama koleoptil boyu 5.11 mm olarak saptanmıştır (Tablo 3.1; Şekil 3.1). Yine diğer bir kontrol grubu olan distile su-metanol'de ise koleoptil boyu 4.97 mm olarak bulunmuştur (Tablo 3.1; Şekil 3.1).

Tablo 3.1. Çeşitli uygulama gruplarında yulaf koleoptil büyüme testi ile elde edilen ortalama koleoptil boyları

Uygulama Grupları	Ortalama Koleoptil Boyu (mm) ± Standart Hata
Distile su	5.11 ± 0.058
Distile su + Metanol	4.97 ± 0.040
Sentetik Metillenmemiş-ABA	4.79 ± 0.044
Sentetik Metillenmiş-ABA	4.70 ± 0.026
Fungal Metillenmemiş-ABA	4.69 ± 0.041
Fungal Metillenmiş-ABA	4.75 ± 0.045



Şekil 3.1. Yulaf koleoptil büyüme testi ile kontrol grupları, sentetik-ABA, *P. chrysosporium* ME446'dan elde edilen ABA ve metil esterlerine bağlı olarak koleoptil boylarının değişimi.

$10^{-4}$ M sentetik metillenmemiş-ABA'nın yulaf koleoptili büyümesi üzerine etkisi incelendiğinde, koleoptil boyu 4.79 mm bulunurken, aynı konsantrasyonda sentetik metillenmiş-ABA'ya maruz kalanlarda 4.70 mm olarak saptanmıştır (Tablo 3.1; Şekil 3.1). Diğer taraftan, *P. chrysosporium* ME446' dan elde edilen  $10^{-4}$ M metillenmemiş- ve metillenmiş-ABA ile yapılan yulaf koleoptil büyüme testi sonuçlarına göre ise, koleoptil boyları sırası ile 4.69 mm ve 4.75 mm olarak bulunmuştur (Tablo 3.1; Şekil 3.1).

Bu çalışmanın varyans analizi sonucu Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Bu tablo incelendiğinde, gruplar arası yulaf koleoptil boy uzunlukları arasındaki farklılıkların önemsiz olduğu saptanmıştır ( $P > 0.05$ ).

Tablo 3.2 Çeşitli uygulama gruplarında yulaf koleoptil büyüme testi için varyans analizi sonuçları

Varyansın Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F*
Gruplar Arası (I-VI. grup)	5	0.42407	0.084814	1.4952
Grup İçi (6 x 3)	12	0.068069	0.0567241	
GENEL	17	0.492139	-	

$$0.05^{F_{12}^5} = 3.11$$

\* 0.05 yanılma olasılığında önemsizdir ( $P > 0.05$ )

#### 4. SONUÇ ve TARTIŞMA

Literatür bilgilerimize göre, bitki büyüme ve gelişmesinin düzenlenmesinde büyük önemi olan ABA'nın metillenmesinin biyolojik aktivitesi üzerinde etkisi konusunda yeterli sayıda çalışma bulunmamakta ve bu konudaki bulgular da çelişkili görülmektedir (Koshimizu 1966; Jones ve Mansfield 1971; Kriedemann, vd. 1972). Yine, bugüne kadar yapılan çalışmalarda, sadece ya metillenmemiş-ABA'nın ya da metil esterlerinin fizyolojik etkisi ile ilgili araştırmalar yapılmış olup, karşılaştırmalı olarak yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, metillemenin ABA'nın biyolojik aktivitesi üzerindeki etkisinin açığa çıkarılmasına katkıda bulunmak üzere yapılan bu çalışma gerek  $10^{-4}$ M sentetik metillenmemiş- ve metillenmiş-ABA, gerekse P. chrysosporium ME446' dan elde edilen  $10^{-4}$ M metillenmemiş- ve metillenmiş-ABA'nın yulaf koleoptillerinin büyümesi üzerinde etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda metillemenin ABA'nın biyolojik aktivitesini değiştirmedeği gösterilmiştir (Tablo 3.1; Şekil 3.1; Tablo 3.2).

Elde ettiğimiz bu bulgu Koshimizu ve arkadaşlarının (1966) pirinç fideleriyle yaptıkları büyüme inhibisyon testlerinin sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Bu araştırmacılar ABA'nın metil esterinin aktif olduğunu rapor etmişlerdir.

Diğer taraftan, bu konuda Jones ve Mansfield (1971) yaptıkları bir çalışmada, *Xanthium strumarium* bitkisi yapraklarına yaklaşık olarak  $0.1 \mu\text{g}$  ABA'nın metil esteri uygulamasının, stomaların kapanmasına neden olduğunu ve transpirasyonu azalttığını, ancak büyümeyi inhibe etmediğini bulmuşlardır. Bu da bize ABA'nın metil esterinin antitranspirant olarak etkili bir fonksiyona sahip olduğunu, ancak büyüme üzerinde ABA'nın biyolojik aktivitesini değiştirdiğini ifade etmektedir.

Yine başka bir çalışmada da ABA'nın metil esterinin stomaların kapanmasında inaktif olduğu belirtilmiştir (Kriedemann, vd. 1972). Bu araştırmacılar, *Rumex obtusifolius* L. *Beta vulgaris* L. ve *Xanthium pennsylvanicum* Wall. bitkileri ile yaptıkları çalışmada yapraklara uygulanan 50.0  $\mu$ M ABA-metil esterinin stomaların kapanmasını etkilemediğini, ancak sonradan ABA uygulamasının stomaların hızlı bir şekilde kapanmasına neden olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, ABA'nın metil esterinin kısa sürede stomaların kapanması üzerindeki inaktif etkisini, onun serbest-ABA'ya hidrolize oluncaya kadar, aktif olmaması ile yorumlamaktadırlar.

Ayrıca, bu çalışmamızda sentetik-ABA ve *P. dryosporium* ME446'dan elde edilen ABA'nın yulaf koleoptillerinin büyümesi üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Elde edilen bulgular (Tablo 3.1; Şekil 3.1) ve varyans analizi sonuçları (Tablo 3.2), biyolojik aktiviteleri bakımından sentetik-ABA ve fungal-ABA arasında bir farklılığın olmadığını göstermiştir. Yine Tablo 3.1, Şekil 3.1 ve Tablo 3.2 incelendiğinde her iki tip ABA'nın metillenmiş formlarının da biyolojik aktivite bakımından benzer özellik gösterdiği saptanmıştır.

Çalışmamızın sonunda elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, sentetik metillenmemiş- ve metillenmiş-ABA ile fungal metillenmemiş- ve metillenmiş-ABA'nın biyolojik aktivitelerinde bir farklılığın olmadığını, metillenmenin her iki tip ABA'nın büyüme üzerindeki biyolojik aktivitelerini değiştirmediğini söyleyebiliriz.

ABA'nın tarımsal alanda kullanılabilirliği herşeyden önce fizyolojik etkisini göstermesine bağlıdır. ABA uygulamasının fizyolojik olaylar üzerine etkisi öncelikle alınımına, taşınımına ve bitkilerde kararlılığına bağlıdır (Friadlander, vd., 1978). Ancak, dışarıdan ABA uygulaması yapıldığında, bitki tarafından alınımı sırasındaki aşırı sıcaklık, yüksek ışık şiddeti gibi olum-



suz çevre faktörleri ABA'nın molekül yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Bu da uygulama esnasında bitki büyüme ve gelişmesinde etkili olabilecek düzeyde ABA'nın bitki tarafından alınmayabileceğini akla getirmektedir. Metillemenin ABA'nın molekül yapısını dayanıklı hale getirdiği ve biyolojik aktivitesini değiştirmede dikkate alındığında, ABA'nın tarımsal alanlarda kullanılması sırasında, metil esteri halinde uygulanmasının fizyolojik etkisi nedeniyle ekonomiye sağlayacağı katkı bakımından önemli olacağını söyleyebiliriz.

Yine, *P. chrysosporium* ME446'dan elde edilen ABA'nın büyüme üzerindeki biyolojik aktivitesinin sentetik-ABA ile benzer özellik göstermesinden dolayı, bu fungustan elde edilen ABA'nın bitki büyüme ve gelişmesinde kullanılabileceğini de söyleyebiliriz. Ayrıca, başka tür funguslar kullanılarak elde edilecek ABA'nın biyolojik testlerinin yapılmasının bu konuyu daha da aydınlatacağına inanmaktayız.

## 5. KAYNAKLAR

- Addicot, F.T. & Lyon, J.L., "Physiology of abscisic acid and related substances", *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20, 139-164, (1969).
- Assante, G., Merlini, N. & Nassini, G., "(-)-abscisic acid, a metabolite of the fungus *Cercospora rosicola*", *Experientia*, 33, 1556-1557, (1977).
- Bennett, R.D., Norman, S.M. & Maier, V.P., "Biosynthesis of abscisic acid from farnesol derivatives in *C. rosicola*", *Phytochemistry*, 9, 1913-1915, (1984).
- Bozcuk, S. ve Topçuoğlu, Ş.F., "Değişik stres koşullarında bitkilerde absisik asit (ABA) miktarının değişimi ve strese adaptasyon mekanizması", *Doğa Bilim Derg.*, 6, 3, 157-167, (1982).
- Dörffling, K., "Recent advances in abscisic acid research hormonal regulation in plant growth and development", *Proc. Adv. Study Inst.*, İzmir, 71, Verlag Chemie, Weinheim 281-295, (1972).
- Dörffling, K., Petterson, W., Spiceher, E., Urbasch, I. & Hanssen, H.P., "Abscisic acid in phytopathogenic fungi of the genera *Botrytis*, *Ceratocystis*, *Fusarium* and *Rhizotonia*", *Naturfosch*, 39, 683-684, (1984).
- Friedlander, M., Astmann, D. & Galun, E., "Uptake transport and stability of (2-<sup>14</sup>C) abscisic acid in Cucumber following foliar application", *Plant and Cell Physiol.*, 17, 965-972, (1976).

- Hoad, G.V., "Effect of moisture stress on abscisic acid levels in *Ricinus communis* L. with particular reference to phloem exudate", *Planta*, 113, 367-372, (1973).
- Hoad, G.V., Effect of osmotic stress on abscisic acid levels in xylem sap of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Planta*, (Berl), 124, 25-29, (1975).
- Hoad, G.V., "Effects of water stress on abscisic acid in white lupin (*Lupinus albus* L.) fruit, leaves and phloem exudate" *Planta*, 142, 287-290, (1978).
- Horgan, R., Neill, S.J., Walton, D.C. & Griffin, D., "Biosynthesis abscisic acid", *Biochem. Soc. Trans.*, 11, 553-557, (1983).
- Jones, R.J. & Mansfield, T.A., "Antitransport activity of the methyl and phenil esters of abscisic acid", *Nature*, 231, 331-332, (1971).
- Kaşka, N., "Zerdali ve kütahya vişnesi çekirdeklerinde absisik asit miktarları ve katlanma işlemi süresince bu miktarlarda ortaya çıkan değişiklikler üzerine araştırmalar", *A.Ü. Ziraat Fak. Yay.*, 431, 104, (1970).
- Kaşka, N., "Vişnelerde büyümeyi düzenleyici maddeler üzerine araştırmalar", *A.Ü. Ziraat Fak. Yıllığı*, 20, 580-596, (1971).
- Kettner, J. & Dörffling, K., "Abscisic acid metabolism in *Ceratocystis coerulescens*", *Physiol. Plantarum*, 69, 278-282, (1987).
- Koshimizu, K., Fukui, H., Mitsui, T. & Ogawa, Y., "Identity of lupin inhibitor with abscisin II and its biological activity on growth of rice seedling", *Agr. Bot. Chem.*, 30, 941-943, (1966).

- Kriedemann, P.E., Loveys, B.R., Fuller, G.L. & Leopold, A.C., "Abscisic acid and stomatal regulation", *Plant Physiol.*, 49, 842-847, (1972).
- Kutsal, A. ve Muluk, F.Z., "Uygulamalı Temel İstatistik", H.Ü. Fen Fak. yay., No:8, (1978).
- Loveys, B.R., "The intracellular location of abscisic acid in stressed and nonstressed leaf tissue", *Plant Physiol.*, 40, 6-10, (1977).
- Marumo, S., Katayama, M., Komori, E., Ozaki, Y., Natsuma, M. & Konda, S., "Microbial production of abscisic acid by *Botrytis cinerea*", *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1967-1968, (1982).
- Milborrow, B.V., "The metabolism of abscisic acid", *J. Exp. Bot.*, 21, 17-29, (1970).
- Milborrow, B.V. & Robinson, D.R., "Factors affecting the biosynthesis of abscisic acid", *J. Exp. Bot.*, 24, 80, 537-548, (1973).
- Nitsch, J.P. & Nitsch, C., "Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new sensitive straight growth test for auxins", *Plant Physiol.*, 31, 94-111, (1956).
- Norman, S.M., Poling, S.M., Maier, V.P. & Pond, D.L., "Abscisic acid biosynthesis in *Cercospora rosicola*: Sensitivity to inhibitors of sterol biosynthesis", *Agric. Biol. Chem.*, 52, 5, 1309-1310, (1988).
- Oritani, T. & Yamashita, K., "Biosynthesis of (+)-abscisic acid in *Cercospora cruenta*", *Agric. Biol. Chem.*, 49, 243-249, (1985).

Phillips, I.D.J., "Introduction to the biochemistry and physiology of plant growth hormones", Hill Book Comp., 173, (1973).

Rudnicki, R., "Studies on abscisic acid in apple seeds", *Planta*, (Berl.), 86, 63-68, (1969).

Sakurai, N., Akiyama, M. & Kuraishi, S., "Roles of abscisic acid and indoleacetic acid in the stunted growth of water-stressed, etiolated squash hypocotiles", *Plant and Cell Physiol.*, 26, 1, 15-24, (1985).

Setter, T.L. & Brun, W.A., "Abscisic acid translocation and metabolism in soybeans following depodding and petiole girdling treatments", *Plant Physiol.*, 67, 774-779, (1981).

Topçuoğlu, Ş.F., "Tuz stresi koşulunda büyütülen ayçiçeği (*Helianthus annulus* L.) bitkisinde yaşa bağlı olarak absisik asit seviyelerinin değişimi", Doktora Tezi, H.Ü. Fen Bil. Enst., Ankara, (1987).

Ünyayar, S., "Bazı funguslarda (*Phanerochaete chrysosporium* ME446 ve *Pleurotus florida*) kültür periyoduna bağlı olarak absisik asit üretimi ve büyümeyle ilişkisi", Yüksek Lisans Tezi, İnönü Ün., Fen Bil. Enst., Malatya, (1990).

Ünyayar, A., "Biopulp üretiminde beyaz çürükçül fungusların kullanılması", Yüksek Lisans Tezi, H.Ü. Fen Bil. Enst., Ankara, (1988).

Ünyayar, A. ve Kolankaya, N., "Kağıt hamuru eldesi için biyoteknolojik bir yaklaşım", *Doğa Türk Biol. Derg.*, 14, 1, 51-58, (1990).

Ünyayar, A., Topcuoğlu, Ş.F., Yeşilada, Ö., Ünyayar, S., Fışkın, K. ve Bozcuk, S., Çalkalamalı ve statik inkübasyon ortamlarında üretilen *P. chrysosporium* ME446'da absisik asit üretimi ve enzim sentezi, X. Ulusal Biyoloji Kong., 18-20 Temmuz, 39-50, Erzurum, (1990).

Weaver, R.J., "Plant growth substances in agriculture", W.H. Freeman and Comp., Sanfrancisco, USA, (1972).

Yeşilada, Ö., Ünyayar, A., Fışkın, K., ve Gözükara, M.E., "Statik inkübasyon sırasında beyaz çürükçül fungusların lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri", *Kükem Derg.*, 12, 2, 91-96, (1989).

Yeşilada, Ö., Topcuoğlu, Ş.F., Ünyayar, A., Ünyayar, S., Fışkın, K., Bozcuk, S., Şlempe (vinnase) içeren inkübasyon ortamında bazı beyaz çürükçül funguslarda absisik asit üretimi, X. Ulusal Biyoloji Kong., 18-20 Temmuz, 31-37, Erzurum, (1990).

Yürekli, K., "Tepe tomurcuğunun dekapitasyonundan sonra geçen süreye bağlı olarak Pisum'un ilk internodyumundaki içsel hormon değişimlerine ilişkin bir araştırma", *E.Ü. Fen Fak. Derg.*, Seri B, IV, 4, 191-201, (1980).

Zeevaart, J.A.D., "Sites of abscisic acid synthesis and metabolism in *Ricinus communis* L.", *Plant Physiol*, 59, 788-791, (1977).

## ÖZGEÇMİŞ

4.08.1966 tarihinde Malatya (Yeşilyurt)'da doğdu. İlk ve orta öğreimini Malatya'da tamamladı. 1984 yılında İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne girmeye hak kazandı. 1988 yılında Biyoloji Lisansı ile, Biyolog ünvanı alarak mezun oldu.

1989 yılında aynı üniversiteye bağlı Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Kasım 1990'da M.E.B. tarafından Malatya Lisesine atanarak, Biyoloji Öğretmeni olarak göreve başladı. Halen bu görevi sürmektedir. Evlidir.