

78185

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

*CTENANTHE SP. (MARANTACEAE)* BİTKİSİNİN SICAKLIK VE  
KURAKLIK STRESİNE ADAPTASYON MEKANİZMASININ  
FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL SEVİYEDE ARAŞTIRILMASI

Biyolog Rabiye TURGUT


Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"Yüksek Lisans (Biyoloji)"

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :09.03.1998  
Tezin Savunma Tarihi :06.02.1998

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU 

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU 

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Zihni DEMİRBAĞ 

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Fazlı ARSLAN 

Trabzon 1998

78185

## ÖNSÖZ

"*Ctenanthe sp. (Marantaceae)* Bitkisinin Sıcaklık ve Kuraklık Stresine Adaptasyon Metanizmasının Fizyolojik ve Biyokimyasal Seviyede Araştırılması" adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında " Yüksek Lisans Tezi " olarak hazırlanmıştır.

Bu konunun seçilmesinde, çalışmanın planlanmasında ve değerlendirilmesinde her türlü yardımını gördüğüm sayın hocam Prof. Dr. Asım KADIOĞLU'na, değerli jüri üyeleri hocalarıma, çalışmayı oldukça rahat bir ortamda gerçekleştirmemi sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU'na ve çalışmam sırasında bana yardımcı olan Arş. Gör. Faik Ahmet AYAZ'a ve diğer bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Rabiye TURGUT

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ .....	II
İÇİNDEKİLER .....	III
ÖZET .....	V
SUMMARY .....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	IX
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş .....	2
1.2. Stres ve Stres Çeşitleri .....	3
1.3. Sıcaklık Stresi .....	3
1.4. Kuraklık Stresi .....	4
1.5. Işık Stresi .....	5
1.6. Stres Dayanıklılığı .....	6
1.7. Streste Prolinin Rolü .....	7
1.8. İndirgen Şekerler ve Stres .....	8
1.9. Stresin Proteinler Üzerine Etkisi .....	8
1.10. <i>Marantaceae</i> Familyasının Genel Özellikleri .....	9
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	11
2.1. Materyalin Sağlanması .....	11
2.2. Katlanmayı Sağlayan Çevresel Faktörlerin Uygulanması....	11
2.3. Stomaların Açılma Derecesinin Belirlenmesi .....	12
2.4. Bitki Yapraklarında Biriken Kristallerin Bileşiminin Tayin Edilmesi .....	12
2.4.1. Toplam Karbohidrat Tayini .....	12
2.4.2. Kristallerdeki Şekerlerin Kromatografik Ayırımı .....	13
2.5. Yapraklarda İndirgen Şeker Tayini .....	13
2.6. Prolin Tayini .....	14
2.7. Proteinlerin Analizi .....	15

2.7.1. Protein Özütünün Hazırlanması .....	15
2.7.2. Çözünebilir Protein Tayini .....	15
2.7.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....	16
3. BULGULAR .....	17
3.1. Yaprak Katlanması Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	19
3.2. Yaprak katlanması Üzerine Kuraklığın Etkisi .....	20
3.3. Yaprak Katlanması Üzerine Işığın Etkisi .....	22
3.4. Yaprak Katlanması Üzerine Işık ve Kuraklığın Etkisi .....	22
3.5. Yaprak Katlanması Üzerine Kuraklık ve Sıcaklığın Etkisi .....	23
3.6. Katlanmanın Stomaların Açılıp Kapanması Üzerine Etkisi .....	24
3.7. Yapraklarda Kristal Oluşumunun Stresle İlişkisi .....	26
3.8. Kristallerin Bileşimi .....	27
3.9. İndirgen Şeker Miktarındaki Değişimler .....	28
3.10. Çözünebilir Protein ve Prolin Miktarındaki Değişimler ....	29
3.11. Stresin Protein Profili Üzerine Etkisi .....	30
4. TARTIŞMA .....	32
5. SONUÇLAR .....	36
6. ÖNERİLER .....	37
7. KAYNAKLAR .....	38
8. ÖZGEÇMİŞ .....	44

## ÖZET

Bu çalışmada *Ctenanthe sp.* (*Marantaceae*) bitkisinde sıcaklık, kuraklık ve ışık stresinin yaprak katlanma derecesi üzerine etkisi, katlanma sırasında stomaların açılma derecesi, yapraklarda biriken kristallerin stres ile ilişkisi ve bileşimi, stresin indirgen şeker miktarı üzerine etkisi, katlanmış yapraklardaki prolin ve çözünebilir protein miktarı ile protein bantlarındaki değişim araştırıldı.

Bu amaçla bitkilerin yaprak katlanma derecelerindeki değişim morfolojik, stomaların açılma derecesi anatomik, kristallerin analizi kromatografik, indirgen şeker, prolin ve çözünebilir protein miktarı ise spektrofotometrik olarak incelendi. Ayrıca stresin protein profili üzerine olan etkisi SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlendi.

Aşırı sıcaklık ve kuraklık ile yaprak katlanma derecesinin arttığı, ışık stresinin ancak kuraklık ile birlikte etkili olduğu ve katlanma sırasında stomaların açık kaldığı belirlendi. Yapraklarda su stresi ortadan kalktıktan sonra kristallerin oluştuğu ve bu kristallerin sukroz, glukoz ve fruktozdan oluştuğu kaydedildi. Kontrole göre, katlanmış yapraklarda indirgen şeker ve prolinin miktarı artarken, çözünebilir protein miktarının azaldığı ve protein bantlarının zayıfladığı tespit edildi.

Elde edilen verilere göre, bitkide stres etkisini hafifleten iki mekanizmanın birarada bulunduğu belirlendi. Bunlardan biri, stres sakınma mekanizması olan yaprak katlanması ile diğeri stres tolerans mekanizması olan osmotik ayarlamadır.

**Anahtar Kelimeler :** *Ctenanthe sp.*, Yaprak Katlanması, Stres, Stoma, İndirgen Şeker, Prolin, Protein

## SUMMARY

### **The Investigation of Adaptation Mechanism of Temperature and Drought Stress in Physiological and Biochemical Levels in *Ctenanthe sp.* (Marantaceae)**

In this study, the effects of temperature, drought and irradiation on the degree of leaf rolling, and the degree of stomatal opening during leaf rolling were investigated in *Ctenanthe sp.* (Marantaceae). The relationship between formation of the crystals on the leaves and these stresses was also examined. In addition, the effect of stress on the amounts of reducing sugar, the changes in soluble protein, in the amount of proline and protein profile in the rolled leaves were determined.

For this purpose, the changes in the degrees of rolling and stomatal opening in the stressed leaves were studied respectively morphologically and anatomically. The composition of crystals was chromatographically analysed, and the amounts of reducing sugar, proline and soluble protein were spectrophotometrically determined. Apart from this, the effect of the stress on protein profile was analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The degree of rolling in the leaf was increased together with applications of temperature and drought. It was found that irradiation stress alone was not effective on the leaf rolling, but it had synergistic effect with drought. In addition, it was observed that stomata remained open during leaf rolling. In the result of irrigation after leaf rolling, the crystals occurred on the abaxial surface of the leaves and their composition was determined to have sucrose, glucose and fructose. According to control, the amount of soluble protein decreased and protein level weakened while the amounts of reducing sugar and proline increased in the rolled leaves.

From these results, it can be suggested that there are two mechanisms which relieve the effect of stress in this plant. One of these is leaf rolling, a stress avoidance mechanism, and the other is osmotic adjustment, a stress tolerance mechanism.

**Key Words: *Ctenanthe sp.*, Leaf Rolling, Stress, Stoma, Reducing Sugar, Proline, Protein**

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.	<i>Ctenanthe sp.</i> bitkisinin düz durumdaki (katlanmamış) yaprakları .....	17
Şekil 2.	Beş hafta süreyle kuraklık stresine maruz bırakılan <i>Ctenanthe sp.</i> bitkisinin katlanmış yaprakları .....	18
Şekil 3.	Altı hafta süreyle kuraklık stresine maruz bırakılan <i>Ctenanthe sp.</i> bitkisinin katlanmış yaprakları .....	18
Şekil 4.	Sıcaklık stresiyile yaprak katlanma oranı ve yaprak katlanma derecesindeki (%) değişimler .....	20
Şekil 5.	Kuraklık stresiyile yaprak katlanma oranı ve yaprak katlanma derecesindeki (%) değişimler.....	21
Şekil 6.	Sıcaklık ve kuraklık stresiyile yaprak katlanma oranı ve yaprak katlanma derecesindeki (%) değişimler.....	24
Şekil 7.	Işıktaki düz (katlanmamış) yapraklardaki stomaların açılma derecesi .....	25
Şekil 8.	Işıktaki katlanmış yapraklardaki somaların açılma derecesi.....	25
Şekil 9.	Işıktaki katlanmış-ABA püskürtülmüş yapraklardaki stomaların açılma derecesi.....	26
Şekil 10.	Yaprak alt yüzeyinde oluşan kristallerin binoküler mikroskoptaki şekilleri .....	27
Şekil 11.	Numune ve standart şekerlerin kromatogram üzerindeki lekeleri ve Rf değerleri .....	28
Şekil 12.	Stres etkisi ile bitki yapraklarının indirgen şeker miktarındaki değişimler .....	29
Şekil 13.	Proteinlerdeki değişimin jel elektroforezi ile belirlenmesi.....	31

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1. Başlıca stres tipleri .....	3
Çizelge 2. Katlanma üzerine sıcaklık stresinin etkisi .....	19
Çizelge 3. Katlanma üzerine kuraklık stresinin etkisi .....	21
Çizelge 4. Katlanma üzerine ışık ve kuraklık stresinin birlikte etkisi .....	22
Çizelge 5. Katlanma üzerine kuraklık ve sıcaklık stresinin birlikte etkisi .....	23
Çizelge 6. Stres sırasında çözünebilir protein ve prolin miktarındaki değişimler .....	30





## **SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ**

ABA	: Absisik Asit
BSA	: Bovin Serun Albumin
hsp	: Sıcak Şok Proteini
KF	: Kurve Faktörü
SDS	: Sodyumdodesil Sülfat
TEMED	: N,N,N,N-Tetrametil Etilen Diamin



# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Kuraklık stresini azaltmanın yollarından biri, transpirasyonun kontrol altına alınmasıdır (1). Kuraklık stresi veya su stresi şartları altında transpirasyonu azaltan mekanizmalar yaprakların rulo şeklinde katlanması, kıvrılması veya düşmesidir (2). Yaprak katlanmasının bazı bitkilerde özellikle su kaybına karşı bir cevap olarak meydana geldiği ileri sürülmüştür (3, 4). Turgor kaybı ile yaprak katlanmasının uyarıldığı ve etkili bir şekilde yaprağın yüzey alanının azaldığı tespit edilmiştir (5). Yaprak katlanmasının üst epidermada yer alan bulliform hücrelerinden su kaybı sonucu meydana geldiği, böylece doğal olarak ışığa maruz kalma alanını, yaprak sıcaklığını ve transpirasyonu azalttığı (3, 6) ve kurak alanlar için iyi bir sakınma mekanizması olduğu (7) belirlenmiştir. Katlanmanın hububat ürünlerinde kuraklığa dayanıklılığı artırdığı rapor edilmiştir (8). Ayrıca suyun sınırlı olduğu kırsal habitatlarda katlanma ile orantılı olarak çimlerin hayatta kalma ihtimallerinin arttığı da kaydedilmiştir (3).

Yaprak katlanması sırasında bazı bitkilerde stomaların kapandığı, böylece transpirasyonunun azalmasına katkıda bulunduğu, bazılarında ise açık kaldığı kaydedilmiştir. Örneğin *Andropogon gerardii* ve *Spartina pectinata* 'nın katlanmış yapraklarında üst epidermadaki stomaların kapalı olduğu (3), şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) (9) ve *Sorghum* (10, 11) bitkilerinde açık kaldığı, pirincin katlanmış yapraklarında ise kısmen açık kaldığı (12) belirlenmiştir. Böylece yaprak katlanması esnasında stomaların açık ya da kapalı olması türden türe değişmektedir.

Yaprak katlanmasının yapraktaki su potansiyeli ile ilgili olarak osmotik potansiyeldeki değişimle ilişkili olduğu (5), kuraklık sonucunda suda çözünen maddelerin fazlaca biriktiği böylece turgorun devamlılığının sağlandığı (13) rapor edilmiştir. Özellikle suda çözünen şekerlerdeki artışın, su stresine protoplazmik seviyede toleransı artırdığı (5), şekerlere ilave olarak prolinin de osmotik ayarlama rol oynayarak, enzimleri korudukları ve böylece dokunun canlılığını sürdürmesine yardımcı oldukları belirlenmiştir (5).

Bir çok bitkide yaprak katlanması ile ilgili değişik çalışmalar yapılmıştır. Örneğin pirinçte (*Oryza sativa* L.) (14, 15, 16), buğdayda (*Triticum aestivum* L.) (15), bazı Gramineae türleri (7) ile bir çok kserofitik çimlerde (7, 17) bu konu araştırılmıştır. Bu çalışmalarda yaprak katlanmasının su stresi, ışık ve yaprak sıcaklığı tarafından etkilendiği bulunmuştur.

Literatür alışmalarında *Ctenanthe sp.* bitkisindeki yaprak katlanması üzerinde yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada *Ctenanthe* bitkisi seçilmiştir. Diğer taraftan yukarıda belirtildiği gibi yaprak katlanmasının, su stresi ve yaprak sıcaklığındaki değişimlerden etkilenerak meydana geldiği kaydedilmesine rağmen, katlanmanın hangi derecedeki sıcaklık ve ışıktan etkilendiği, interaksiyonlarının ne olduğu bilinmemektedir.

Kısaca bu çalışmanın amacı, *Ctenanthe sp.* 'nin yaprak katlanması üzerine sıcaklık, kuraklık ve ışık etkileri arasındaki interaksiyonları ortaya koymak ve katlanma sırasında bazı biyokimyasal değişimleri belirlemektir.

## 1.2. Stres ve Stres Çeşitleri

Stres, çevresel ve biyolojik faktörlerin ayrı ayrı ya da birlikte fizyolojik proseslerde belirgin değişimler meydana getirmesidir. Stres terimi hasar meydana getirme potansiyelini de ihtiva eder. Hasar bir metabolizma bozukluğunun sonucunda oluşur ve bitkinin büyümesinde ve veriminde azalma meydana getirir (1).

Bitkilerin maruz kaldığı başlıca stres tipleri, fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç kısma ayrılabilir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Başlıca stres tipleri (1).

Fiziksel	Kimyasal	Biyolojik
Kuraklık	Hava kirliliği	Rekabet
Sıcaklık	Allelokimyasallar(Organik)	Allelopati
Radyasyon	Besinler	Simbiyosisin yokluğu
Sel	Pestisidler	İnsan aktiviteleri
Mekanik	Toksinler	Hastalıklar
Elektriksel	Tuzlar	Böcekler
Rüzgar	Toprak solusyonunun pH'sı	

Bu stres tiplerinin etkileri birbiri ile ilişkilidir. Örneğin yüksek sıcaklığa dayanıklılık, genellikle onunla birlikte meydana gelen kuraklık şartlarına dayanıklılığa bağlıdır. Diğer taraftan donmaya dayanıklılık, dokunun dehidrasyona dayanıklılığı ile önemli derecede bağlantılıdır (1).

## 1.3. Sıcaklık Stresi

Bitkilerin sıcaklığa karşı tolerans derecesi türden türe değişir. Çoğu bitkide, sıcaklığa dayanıklılık sağlayan iç özellikler mevcut olduğu için yüksek sıcaklıklarda hayatta kalabilirler. Örneğin kuraklıktan sakınma mekanizmasına sahip olan *Cactus* genusunun üyeleri 60°C 'de, kuraklığa tolerans özelliği olan *Atripleks* türleri ise 50°C 'de canlı kalabilirler (2).

Yüksek sıcaklığın bitkiler üzerindeki etkisi, proteinlerin denatüre ve koagüle edilmesi ile yerine getirilir. Yüksek sıcaklık aynı zamanda su

kaybı oranını da artırır. Böylece bir çok sıcaklık dayanıklılık mekanizması, kuraklığa dayanıklılık mekanizmasına benzerdir. Ameriken fizyolog Levitt (18), sıcaklığa toleransı açıklayan genel bir teorinin, kuraklığa toleransı da izah edeceğini kaydetmiştir.

Farklı proteinler farklı derecede sıcaklık kararlılığına sahip oldukları için, sıcaklık toleransına sahip hücrelerde, sıcaklığa daha dayanıklı enzimlerin varlığı söz konusudur. Ayrıca mevcut enzimler bazı sekonder mekanizmalarla daha kararlı hale getirilebilirler (2).

#### 1.4. Kuraklık Stresi

Genelde kuraklık stresi, su eksikliği stresi ile eş anlamda kullanılan bir olaydır. Bu nedenle burada kuraklık stresi ile su stresi terimleri iç içe kullanılmıştır.

Kuraklık, bitkilerin dayanmak zorunda olduğu en yaygın streslerden biridir. Kuraklık durumunda bitkide su alınımı önemli bir problem olup, bitkide su eksikliği ortaya çıkar. Su eksikliği hasarına maruz kalan bitkiler, stresin zararlı etkilerini hafifleten bazı mekanizmalara müracaat ederler. Kramer'e (19) göre bu mekanizmalar, kuraklıktan sakınma ve kuraklık toleransı olmak üzere iki genel katagoride incelenebilir (20). Birçok bitkide değişik kuraklık sakınma mekanizmaları gelişmiştir. Örneğin çöl bitkileri, bir yağmur periyodunu takiben kısa bir peryot boyunca tüm hayatsal olaylarını aktif bir şekilde yerine getirirler, kurak periyotta ise bu olaylar nispeten yavaş seyredir. Ayrıca çoğu bitki suyu etkili bir şekilde absorbe etmek veya tutmak için kutikula, stoma modifikasyonları ve bunun gibi özel yollar geliştirmiştir. Bitkisel organlar içerisinde stresten en çok etkilenen organlardan biri yapraklar olup, özel çevre şartlarına çeşitli yollarla adapte olurlar. Örneğin kserofitik bitkilerde su kaybını azaltan yüzey tüyleri, alt durumlu stoma, yaprak katlanması ve bunun gibi mekanizmalar bulunur. Bu özellikler bitkiden bitkiye değişebilir. Bu tip bitkiler kuraklıkta canlı kalabilir, çünkü bu mekanizmalar iç dokuların çok yüksek bir strese maruz kalmasını önlerler (2).

Kuraklığa toleranslı bitkiler dehidrasyonu erteleyenler ve dehidrasyona tolerans gösterenler olmak üzere iki gruba ayrılabilirler (19). Dehidrasyon ertelenmesi transpirasyonu azaltan veya su absorpsiyonunu artıran mekanizmalarla yapılır. Böylece bitkinin zarar

verici derecede düşük su potansiyeline ulaşması önlenir. Dehidrasyon toleransı, hücreler su hasarına ve düşük su potansiyeline maruz bırakıldıktan sonra bitkinin canlılığını devam ettiren veya büyüten mekanizmaları içerir. Su hasarı artarsa bitki hücreleri turgor durumunu kaybederler ve hücre büyümesini sınırlayan noktaya düşerler. Hücreler içsel osmotik potansiyellerini ayarlayarak hücre büyüme ve gelişmesi için gerekli turgor potansiyellerini muhafaza ederler (20).

Osmotik ayarlama, bir çeşit kuraklık stres tolerans mekanizmasıdır (19). Çeşitli sakınma mekanizmalarının yokluğunda, kuraklık sonucu turgor kaybeden bitki hücrelerinin büyüme için devam ettirmek için, osmotik ayarlama ile turgoru yeniden kazandıkları bilinir (21). Osmotik ayarlama bazı inorganik ve organik eriyikler aracılığıyla eder. Hücrelerin aktif osmotik ayarlamasına en önemli katkıyı indirgen şekerler yapar (20). İndirgen şekerlere ilave olarak  $K^+$  iyonları da osmotik potansiyeli azaltmada önemli bir rol oynar (21). Ayrıca prolin de osmotik ayarlamayı sağlamak için bitkiler tarafından sentezlenir (22).

### 1.5. Işık Stresi

Bitkiler yaprakları üzerine düşen güneş ışığını ya yansıtırlar, ya absorbe ederler veya geçirirler. Bu üç reaksiyonunun derecesi radyasyonun dalga boyu, yaprak yapısı ve yaprak orientasyonuna göre değişir. Bitkinin görünür ışığı yansıtma kapasitesi büyük ölçüde yaprak yüzeyinin morfolojik özelliklerine bağlıdır. Örneğin tüyler, güneş ışığının yansıtmasını artırır. Yapraklarda suberin, mum, kutikula ve hücre duvarı metabolitlerinin artışı, yansıyan ışık miktarında artışa neden olabilir. Yapraklar infrared radyasyonun %70'ini, görünür radyasyonun %6 ile 12 'sini fakat ultraviyole ışınlarının yalnızca %3'ünü yansıtabilir. Gelen ışına göre yaprak ayası konumunun değişimi de ışık stresine dayanıklılığı artırır (1).

Gölge bitkileri yüksek ışık yoğunluğunu ayarlama sınırlı bir kapasiteye sahiptir ve genellikle hasar görür veya ölürler. Diğer taraftan güneş bitkileri yüksek ışıkta, karbon metabolizması enzimlerinin seviyesini, fotosentetik elektron taşıma zinciri taşıyıcılarının sentezini ve  $CO_2$  taşınmasını hızlandırarak fotosentez kapasitesini artırır (1).

## 1.6. Stres Dayanıklılığı

Arazide büyüyen bitkiler, alışıldığı üzere kuraklık ve donma gibi çok sayıda çevresel stresle karşı karşıya kalırlar. Bu tip streslere dayanabilme, genellikle bitkinin büyümesi, canlı kalması ve coğrafik dağılımı için sınırlayıcıdır. Stres altındaki bitkilerde meydana gelen tepkilerin mekanizmasını araştırmak bilimsel olarak çok ilginçtir. Çünkü tarımsal verim, olumsuz dış faktörlerle çok sıkı bir ilişki içindedir (23).

Tüm bitkiler stres hasarına karşı koyma ve canlı kalabilme özelliğindedir. Bir bitkinin bazı kısımları (tohumlar, tomurcuklar ve dormant hücreler) strese dayanıklı iken, diğer kısımları (meristemler, sukkulent organlar ve fideler) duyarlı olabilir. Bitkiler yaşamak zorunda olduğu çevreye adapte olabilme veya tam olarak uyabilme yeteneğindedir (1).

Stres altındaki bitkiler üzerinde çalışma yapılmasının iki önemli nedeni vardır. Birincisi bitkilerin strese karşı reaksiyon mekanizmasının öğrenilmesidir. İkincisi ise tarımsal alanlarda stres altında bulunan bitkilerin, söz konusu streslere dayanma yeteneklerinin ölçülmesi ve dolayısıyla daha verimli ürün elde edilmesidir. Bilindiği gibi dünya topraklarının %10'nundan daha azı tarıma elverişlidir. Bu nedenle aşırı olumsuz şartlardan kaynaklanan streslere dayanabilen veya bu stresleri tolere edebilen bitkiler yetiştirmeye gerçekten ihtiyaç vardır. Daha dayanıklı ve toleranslı türler yetiştirmek için strese dayanıklılık ve tolerans mekanizmalarını iyice bilmek gerekir (2).

Strese dayanıklılık basit bir olay değildir ve strese dayanıklılıkta yalnızca tek bir mekanizma yoktur. Levitt (18), strese dayanıklılığı sakınma ve tolerans olmak üzere ikiye ayırmıştır. Stres sakınması bitkide dıştan uygulanan olumsuz bir faktörün etkisini, stres oluşturmadan önleme yeteneğidir (23). Örneğin bir bitki yaprağı, transpirasyonla yüksek sıcaklıktan korunur böylece iç sıcaklığını muhafaza ederek sıcaklıktan sakınmış olur. Ayrıca kaktüs bitkisi de hücre içindeki su miktarını koruyarak kuraklıktan sakınır (2). Stres toleransı ise dıştan uygulanan bir strese dayanabilme yeteneğidir (23). Örneğin bir çok organizmanın öldüğü sıcaklıklarda hayatlarını devam ettirebilen yosun, alg ve bakteriler sıcaklık toleransına sahiptirler. Her iki tip dayanıklılık bir çok stres durumunda gelişir ve aynı bitkide bulunabilir (2).



## 1.7. Streste Prolinin Rolü

Bitkilerde serbest prolin birikiminin strese karşı genel bir cevap olduğu görülür (24). Kuraklık stresi sırasında prolin seviyesindeki artış, aynı dokudaki diğer serbest amino asitlere göre daha fazladır (21, 25). Stres altında büyüyen bitkilerin dokularında serbest prolin birikiminin olduğu bir çok çalışmada ortaya konmuştur (26). Çeşitli araştırmacılar bitkilerin strese tolerans ve duyarlılığını ölçmek için prolin birikimini kullanmışlardır (26). Handa ve ark. (21), kültür edilmiş bitki hücrelerinin düşük su ihtiva eden bir ortama adapte olurken toplam serbest amino asit ve prolin konsantrasyonunun arttığını belirlemişlerdir.

Bazı bitki türlerinin dokularında serbest prolin birikimi farklı orjinli streslere genel bir cevap olarak kabul edilir (27). Böylece, serbest prolin tuz ve soğuk stresi altında olduğu kadar (28, 29) su ve osmotik stres altında da artar (30-34). Prolinin ayrıca kuraklık ve tuzluluk şartları altında osmoregülasyon (35), proteinlerin stabilizasyonu (26), enzimlerin sıcaklıkla denatürasyonunun engellenmesi (36) ve aşırı stres sırasında azot ve enerjinin korunması (31) gibi etkileri de bilinir.

Su stresli yapraklarda serbest prolin birikmesinin olası üç nedeni vardır. Birincisi, ABA konsantrasyonuna bağlı olduğu tespit edilen glutamik asitten prolin sentezinin uyarılması (37). Bu yolun su stresinin uyardığı prolin birikimine asıl katkıyı sağladığı düşünülür (27). İkincisi, diğer çözünebilir bileşiklere prolin oksidasyonunun inhibisyonu (38) ve üçüncüsü ise prolin sentezinin inhibisyonudur (39). Prolin su stresi ortadan kalktığında hızla metabolize edilir (33). Stres kalktığında prolin oksidasyonunun inhibisyonu ortadan kalkar ve prolin, glutamik asit ve diğer çözünebilir bileşiklere dönüştürülür (27).

Bazı tür adaptif cevaplarda prolinin pozitif bir rolü vardır (27). Örneğin, Paleg (36) prolinin bazı enzimleri sıcaklığın inaktive edici etkisine karşı koruduğunu bularak prolinin pozitif etkisi hakkında delil elde etmiştir. Handa ve ark. (40) polinin strese adaptasyona ve osmotik ayarlamaya önemli bir katkı sağladığını ileri sürmüştür. Singh ve ark. (34) ve Blum ve ark. (41) prolinin rolünün stres ortadan kalktıktan sonra bitkinin çabuk iyileşmesini sağladığını bildirmişlerdir. Bununla beraber, bazı araştırmacılar prolin birikimini bir hasar belirtisi olarak düşünmüşlerdir (42). Tal ve ark. (43) tuzluluğa toleranslı domates bitkilerinde daha az prolin biriktiğini açıklamışlardır.



## 1.8. İndirgen Şekerler ve Stres

Fehling ayıracını indirgeyebilen maltoz, laktoz, sellobioz ve gentiboz indirgen disakkaritlerdir. Maltoz iki glukoz biriminden oluşan bir disakkarittir. Başlıca kaynağı nişasta olup, amilaz enzimi ile nişastanın kısmi hidrolizinden elde edilir. Maltozda bir monomer karbon atomu serbest yarı asetal şeklinde bulunduğu için kolayca indirgenir. Sellobioz, selulozun asitler veya selulaz enzimi ile kısmi hidrolizinden oluşur ve yapısı maltoza benzer. Gentiboz (amigdaloz), iki glukozun  $\beta$ -glükozid tarzında bağlanması ile oluşur (44).

Stres sırasında indirgen şekerlerdeki artış bir çok çalışmada rapor edildi. Handa ve ark. (21), kültür edilmiş bitki hücrelerinde su stresi ile indirgen şeker konsantrasyonunun arttığını açıkladılar. Hücrelerdeki sukroz seviyesini, indirgen şeker seviyesinden 3-8 kat daha az olarak tespit ettiler. Binzel ve ark. (45), kültür edilmiş glikofitik hücrelerde NaCl'e adaptasyon sırasında yaklaşık iki kat indirgen şeker birikimi tespit ettiler. Tütün hücrelerinde yaptıkları başka bir çalışmada çözünebilir şekerlerin hücreler arası konsantrasyonunu araştırdılar ve indirgen şeker seviyesinde 3 katlık, sukroz seviyesinde de 10 katlık bir artış olduğunu belirlediler (46). Hasegawa ve ark. (20) su stresi sırasında indirgen şeker birikiminin aktif osmotik ayarlamaya katkısı olduğunu açıkladılar. Polietilen glikol ortamında büyüttükleri hücrelerde sukroz seviyesinde de önemli bir birikim buldular fakat sukrozun hücreler arası konsantrasyonunun indirgen şekerlerden 3-8 kat daha düşük olduğunu kaydettiler (20).

## 1.9. Stresin Proteinler Üzerine Etkisi

Strese adaptasyon sırasında belirli proteinlerin sentezlendiği ve protein seviyesinin değişim gösterdiği bulunmuştur. Örneğin kuraklık stresi altında belirli proteinlerin ortaya çıktığı ve bunların denaturasyona dayanıklı bir konfigürasyona sahip oldukları ileri sürülmüştür (2). Sıcak şoku ve anaerobik şartlar altında da yeni proteinlerin sentezlendiği kaydedilmiştir. Bitkiler 40°C gibi yüksek sıcaklıklara maruz kaldıklarında sıcak şok proteinlerini (hsp) sentezleyerek, sıcaklığa alıştıkları bilinmektedir. Örneğin mısır fideleri bu sıcaklığa maruz kaldıklarında ilk 20 dakikada 68-104 kDa, 52-62 dakikada ise 20-23 kDa

ağırlığında hsp proteinleri sentezlerler. Ayrıca yüksek metal konsantrasyonlarında, kuraklıkta ve ultraviyole ışıktaki bitkilerin çeşitli stres proteinleri sentezledikleri bilinir (1).

Stres proteinleri üzerine yapılan çalışmalarda çeşitli sonuçlar elde edilmiştir. Öktem ve ark. (47) sıcaklık, metal ve soğuk stresi etkisiyle haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkilerinde bazı stres proteinlerinin sentezlendiğini belirlemişlerdir. Diğer taraftan Handa ve ark. (21) kültür edilmiş bitki hücrelerinde su stresine adaptasyon sırasında çözünebilir protein seviyesinde azalmalar kaydetmişlerdir. Ayrıca stres sırasında poliribozomların, protein sentezinde inaktif oldukları bilinen monoribozomlara dönüştükleri belirlenmiştir (1).

### 1.10. *Marantaceae* Familyasının Genel Özellikleri

Tropik bölge ormanlarında 30 cins ve yaklaşık 350 kadar türü bulunan, ota benzer çok yıllık rizumlu bitkilerdir. Esas olarak tropiklerde ve Amerika'da yayılış gösterir. Çoğu sera ve süs bitkisidir. Saplı ve asimetrik yapraklar distik dizilişlidir ve petiollerin tabanında dar veya geniş olabilen kın mevcuttur. Pinnat damarlar orta damardan paralel olarak uzanır (48). Yapraklarında bazı baklagillerde olduğu gibi akordiyon dokulu pulvinus adı verilen hareket sağlayıcı yastıkçıkların bulunuşu ilginçtir (49).

Asimetrik çiçekler yalancı (iğit) durumlarda toplanmıştır. *Andrekeum*'da yalnız yarım anter (bir teka) verimli kalmış diğerleri petaloid olmuştur (staminodium). İç dairenin staminodium'u miğfer şeklini almış ve stilus'un etrafını sarmıştır. Bir böceğin çiçeği ziyaretinde, miğfer içinde sarılı stilus dışarı fırlayarak böcek üzerine dokunur ve diğer çiçeklerin polenlerini alır (49).

Meyvaları kapsül, bakka ve nuks tipinde olabilir. Üç bileşik karpelli ovaryum, alt durumludur ve 1 veya 3 lokulus'a sahiptir (48). Tohumlarda arillus ve perisperm vardır (49).

*Marantaceae*, *Musaceae*, *Zingiberaceae*, *Cannaceae* ve *Strelitziaceae* familyaları ile yakın olarak ilişkilidir. Bu familyalar aynı takımda (Zingiberales) yer alan önemli vejetatif ve floral karakterleri paylaşır. *Marantaceae*, hem stamen hem de karpellerindeki aşırı indirgenme özelliği ile bu grubun çok fazla görülen bir familyasıdır (48).

Önemli türlerinden *Maranta arundinacea* Batı Hindistan Adaları'nda yetişir. Rizomlarından *Amylum Marantae* (Batı Hindistan Arowroot'u) elde edilir. *Maranta bicolor* ise vatanı Brezilya olan bir süs bitkisidir (49).

Çalışmada kullanılan *Ctenanthe*, herdem yeşil taksonları olan bir cins olup, çalimsı çok yıllık bitkilerdir. Dekoratif yaprakları için yetiştirilir. Ayrıca soğuğa hassastır ve minimum 15°C ' de yaşayabilir. Nemli ortamları ve yarı gölgeli alanları tercih eder. Nemli fakat iyi drenajlı topraklarda daha iyi büyür. Üretilmesi ise ilkbaharda bölünerek yapılır (50). *Ctenanthe pilosa*, *Ctenanthe setosa*, *Ctenanthe amabilis* gibi bazı türlerinde nektar sekresyonu görülür (51).



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyalin Sağlanması

*Ctenanthe sp. (Marantaceae)* fideleri eşit büyüklükteki saksılara dikilerek vejetatif olarak çoğaltıldı. Fidelerin yaprakları olumsuz şartlarda rulo şeklinde katlandığı için (stresli bitki) optimum koşullar (25°C, %70 nem) sağlanarak kontrol bitkileri elde edildi. Daha sonra bu bitkilere sıcaklık, ışık ve kuraklık stresleri uygulanarak stresli ve stressiz bitkiler üzerinde fizyolojik ve biyokimyasal analizler yapıldı.

### 2.2. Katlanmayı Sağlayan Çevresel Faktörlerin Uygulanması

Sıcaklığın etkisini belirlemek için bitkiler 25, 30, 34, 36, 38, 40 ve 42°C'ye ayarlı iklim dolabında (Fitotron) normal ışık yoğunluğunda (12 saat ışık/12 saat karanlık periyodunda) ve %70 nisbi nemde iki gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Bu sırada bitkilerde su eksikliği olmaması için her gün sulandı.

Kuraklığın etkisini belirlemek için ise, bitkiler laboratuvar şartlarında, direkt güneş ışığı almayan bir yerde, 56 gün süreyle susuz bırakıldı.

Diğer bir çevresel faktör olan ışığın etkisini araştırmak amacıyla, bitkiler 25°C'de, %70 nisbi nemde 50, 100, 150, 200, 250, 300  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'e ayarlı iklim dolabında 2-12 saat bekletildi.

Daha sonra bu çevresel faktörlerin birlikte olan etkisi araştırıldı. Bu amaçla ilk olarak 4, 6, 8, 10 ve 12 gün süre ile sulanmamış bitkiler 25°C'de, %70 nisbi neme ayarlı iklim dolabında 100, 150, 200, 250 ve 300  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluklarına 2 saat maruz bırakıldı ve böylece ışık ve kuraklığın birlikte olan etkisi kaydedildi. Son olarak kuraklık ve sıcaklığın birlikte olan etkisine bakıldı. Bunun için 2, 6, 10 ve 12 gün boyunca sulanmamış bitkiler %70 nem, 250  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu ve 25, 30, 34 ve 36°C sıcaklıklardaki iklim dolabında 2'şer saat tutuldular.

Bütün bu denemeler sonunda yaprak katlanma oranı (%) hesaplandı ve yaprak katlanma derecesi (%) Premachandra ve ark. (52)'a göre

ölçüldü.

### **2.3. Stomaların Açılma Derecesinin Belirlenmesi**

Stomaların açılma derecesi yapraklardan alınan yüzeysel kesitlerden yararlanılarak belirlendi. Bu amaçla ışıktaki düz (katlanmamış), ışıktaki katlanmış ve ışıktaki katlanmış-ABA püskürtülmüş yapraklar FAA (formalin:asetik asit:alkol)'da fikse edildikten sonra %70'lik etil alkol içerisinde alındı. Bu yapraklardan elle alınan yüzeysel kesitler, safranin-anilin mavisi çift boyama yöntemine göre boyandı (53). Boyanan kesitler alkol serilerinden geçirildikten sonra entellenle kapatılarak daimi preparat haline getirildi. Daha sonra preparatların fotoğrafları çekildi.

### **2.4. Bitki Yapraklarında Biriken Kristallerin Bileşiminin Tayin Edilmesi**

Bitki yapraklarının alt yüzeyinde oluşan kristallerin stresle olan ilişkisini araştırmak amacıyla, bitkiler 5 hafta süreyle laboratuvar şartlarında susuz bırakıldı, diğer bir grup ise aynı periyot süresince susuz bırakıldıktan sonra ikişer hafta aralıklarla sulandı. Daha sonra bu iki grup bitkilerdeki kristaller sayılarak aralarındaki değişim belirlendi ve binoküler mikroskop (Prior James Swift) altında fotoğrafları çekildi. Bu kristallerin yapısını aydınlatmak için toplam karbohidrat ve kromatografi ile şeker tayini yapıldı.

#### **2.4.1. Toplam Karbohidrat Tayini**

Bitki yapraklarının alt yüzeyinde oluşan kristallerdeki karbohidrat miktarı Fenol-Sülfirik metoduna göre tayin edildi (54). Bunun için önce standart bir grafik çizildi. Bu amaçla içerisinde 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg saf glukoz ihtiva eden 1 ml'lik seri çözeltiler hazırlandı. Bütün tüplere 0,3 ml, %5'lik fenol çözeltisinden katılarak karıştırıldı. Daha sonra aynı tüplere hızlı akıtan bir pipetten 2 ml derişik sülfirik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) konularak vorteksle karıştırıldı. Hazırlanan tüpler, 15-20 dak. bekletildikten sonra, pentozlar için 480 nm'de, heksozlar için 488 nm'de spektrofotometre (Shimadzu UV 120-01) yardımıyla ölçümler yapıldı. Birinci tüp kör olarak kullanıldı. Grafiğin yatay eksenine glukoz

miktarları ( $\mu\text{g}$ ), dikey eksenine ise, A480 ve A488 değerleri yazılarak standart grafik elde edildi.

Kristallerin toplam karbohidrat miktarının tayini için, yaprak alt yüzeyinde biriken kristallerden 0,01 g alınıp, 100 ml saf su içinde çözüldü. Bu çözültiden 0,3 ml alınarak, saf su ile 1 ml'ye tamamlandı. Yukarıda standart grafik için anlatılan aynı işlemlerden geçirildikten sonra 480 ve 488 nm'de okunan absorbands değerleri standart grafik üzerinden  $\mu\text{g}$  glukoz miktarı olarak belirlendi ve iki değer toplanarak toplam karbohidrat miktarı hesaplandı.

#### 2.4.2. Kristallerdeki Şekerlerin Kromatoğrafik Ayırımı

Toplanan kristallerin şeker tayinleri kağıt kromatoğrafisi yöntemi kullanılarak yapıldı (55, 56). Yapraktan toplanan kristallerden 0,05 g alınıp, 300  $\mu\text{l}$ , %80'lik etil alkolde çözüldü. Numune ile beraber standart şeker olarak glukoz, fruktoz, maltoz, dekstroz, ksiloz, sukroz, mannoz ve ramnoz Whatmon no-1 kromatoğrafi kağıdı üzerine 3'er cm aralıklarla mikroenjektörle uygulandı. Hareketli faz olarak n-butanol:asetik asit:su (4:1:5 v/v) kullanıldı. Ayıraç olarak hazırlanan 0,1 N  $\text{AgNO}_3$  ile 5 N amonyağın eşit hacimlerdeki karışımı, kağıt üzerine püskürtüldü. Kağıt, 105°C'lik etüvde 10-15 dak. kurutuldu. Kurutma işleminin tamamlandıktan sonra şekerler, kahverengi lekeler halinde kromatogram üzerinde belirlendi.

#### 2.5. Yapraklarda İndirgen Şeker Tayini

Bu yöntem Ross (57) ve Kaplankıran (58)'a göre yapıldı. İçerisinde 0,0; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; ve 2,0 mg D (+) glukoz bulunan 1 ml'lik seri çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerin herbirine 3'er ml dinitrofenol eriyiği ilave edildikten sonra 65-70°C 'ye ayarlı su banyosunda 6 dak. tutuldu. Daha sonra 3 dak. devamlı akan su altında soğutuldu ve 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Birinci tüp kör olarak kullanıldı. Standart çözeltiler ile onların absorbandsları kullanılarak eğri faktörü ayrı ayrı; aşığıdaki formülü kullanarak hesaplandı.

Eğri Faktörü= Standart konsantrasyonu / Absorbans

Hesaplanan eğri faktörünün de ortalaması alınarak sabit Kurve



Faktörü (KF) değeri elde edildi. Daha sonra bu sabit değer üzerinden numunelerdeki indirgen şeker miktarı

$\% \text{ İndirgen Şeker (g /100 g) = Alet Okuması} \times \text{KF} / 0.04 \times 10$   
formülü kullanılarak hesaplandı.

Yapraklardaki stres etkisi ile indirgen şeker değişimini belirlemek için, hiç stres geçirmemiş (kontrol), katlanmış ve kristal oluşumu başlamamış (4 hafta süreyle sulanmamış), katlanmış ve kristal oluşumu başlamış, katlanmış ve kristal oluşumu devam eden 4 ayrı durumdaki yaprak, kesilerek 60°C'lik etüvde kurutuldu. Bunlardan 1 g alınıp, saf suyla 25 ml 'ye tamamlandı ve 30 dak. çalkalayıcıda çalkalandı. Aktif karbon kullanılarak Whatman-1 ince filtre kağıdı ile süzüldü. Süzüntüden 1'er ml alınıp, yukarıda anlatılan işlemlerden geçirilip, absorbansları okundu ve verilen formüle göre % indirgen şeker miktarları belirlendi.

Çalışmada kullanılan dinitrofenol çözeltisi, A ve B olarak adlandırılan iki farklı çözeltinin karışımı olarak hazırlandı.

A çözeltisi: 7,145 g 2,4- $\alpha$  dinitrofenol hassas terazide tartıldı. %5'lik NaOH hazırlandı (25 g NaOH, 500 ml saf suda çeşme suyu altında soğutularak eritilir). 7,145 g 2,4- $\alpha$  dinitrofenol, bir beher içine konmuş olan 230 ml %5'lik NaOH içine ilave edildi. Beher kaynar su banyosuna konuldu ve karıştırıldı. Bulanıklılık gidinceye kadar ısıtmaya devam edildi. Bulanıklılık tamamen kaybolunca, 2,5 g fenol ilave edildi ve bulanıklılık gidinceye kadar ısıtıldı.

B Çözeltisi: 100 g sodyum potasyum tartarat, 500 ml saf suda çözüldü. A çözeltisi kaynar su banyosundan çıkartılır çıkartılmaz, A çözeltisi ile süratle karıştırıldı ve karışım saf su ile 1 litreye tamamlandı.

## 2.6. Prolin Tayini

Prolin miktarı spektrofotometrik olarak Asit-Ninhidrin metodu ile belirlendi (59). Bu amaçla önce saf prolin kullanılarak standart bir grafik çizildi. Bir ml'sinde 100  $\mu\text{g}$  prolin içeren çözeltiden 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 ml alınarak saf su ile 1 ml'ye tamamlandı. Üzerine 1 ml glasiyal asetik asit ve 1 ml asit-ninhidrin çözeltisi (1,25 g ninhidrin, 30 ml glasiyal asetik asit ve 20 ml 6M fosforik asit içinde hafif ısıtılarak çözüldü) ilave edildi. Numuneler 100°C' ye ayarlı etüvde 1 saat bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için buz banyosunda 10 dak. tutuldu. Her tüpe 3 ml toluen ilave edip, vorteksle karıştırıldıktan sonra 520 nm dalga

boyunda absorbanları ölçüldü. Kör olarak toluen kullanıldı. Grafiğin yatay eksenine prolin ( $\mu\text{g}$ ), dikey eksenine ise absorban değerleri yazılarak standart grafik elde edildi.

Stres etkisi ile prolin değişimini belirlemek için, stres geçirmemiş düz durumdaki yapraklar (kontrol) ile 42 gün boyunca sulanmamış, kurak saksıdan alınan katlanmış yapraklar (stresli)  $60^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlı etüvde kurutuldu. Bunlardan 0,6 g alınarak, 10 ml %3'lük sülfosalisilik asit içinde homojenize edildi ve homojenat Whatman-42 filtre kağıdı ile süzüldü. Süzüntüden 1'er ml alınıp yukarıdaki aynı işlemlerden geçirildi. Elde edilen absorban değerleri standart grafik üzerinden  $\mu\text{g}$  prolin olarak belirlendi ve buradan 1 g kuru ağırlıktaki prolin miktarı hesaplandı.

## **2.7. Proteinlerin Analizi**

### **2.7.1. Protein Özütünün Hazırlanması**

Yapraklardan protein ekstraksiyonu için, Harborne (60) metodu kısmen değiştirilerek kullanıldı. Strese maruz kalmış (katlanmış) ve kontrol bitki yapraklarından (katlanmamış) 2 g alınarak soğuk aseton içerisinde ( $-18^{\circ}\text{C}$ 'de) buzdolabında renkleri açılana kadar tutuldu. Klorofili uzaklaşmış yaprakların asetonu uçurulup, kurutuldu. Yapraklar 6 ml, 0,031 M sitrat-fosfat tamponunda (pH 5,5) buz üzerinde homojenize edildi. Elde edilen homojenat kalın tülbentten süzüldü. Süzüntü 16.000 g de 10 dak. santrifuj edildi. Süpernatant alınarak  $+4^{\circ}\text{C}$  de saklandı.

### **2.7.2. Çözünabilir Protein Tayini**

Yapraklarda çözünabilir protein miktarının tayini için Bradford Metodu kullanıldı (61). Bu yöntem, fosforik asitli ortamda proteinlerin Coomassie Brilliant Blue (CBB G-250) reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm de maksimum absorban göstermesi esasına dayanır. Bu yöntemin diğer protein yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin söz konusu olmaması ve protein boya kompleksinin çözümlerde uzun süre kalmasıdır. Ayrıca proteine boyanın bağlanması, 2 dak. gibi çok kısa sürede gerçekleşir. Bu yöntemin



hassasiyeti 1-100 µg arasındadır. Protein tayini için önce standart bir grafik hazırlandı.

Bunun için 100 ml' sinde 0,01 g protein ihtiva eden standart BSA (Bovin Serum Albumin) çözeltisinden tüplere 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; ml alındı. 0,031 M sitrat-fosfat tamponu (pH 5,5) ile tüm tüplerin hacimleri 2 ml' ye tamamlandı. 1,5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırıldı, 2 dak. sonra 595 nm de köre karşı absorbands değerleri okundu. Kör olarak 2 ml tampon ve 1,5 ml boya çözeltisi içine konmuş olan tüp kullanıldı. 595 nm de okunan absorbandlara karşılık gelen µg protein değerleri belirlendi.

Numunedeki çözünebilir protein miktarını bulmak için, hazırlanan protein özütünden 0,1 ml alınarak üzerine 1,9 ml tampon ilave edildi ve 1,5 ml Coomassie reaktifi konularak, vorteksle karıştırıldı. 2 dak. sonra 595 nm de absorbandları ölçüldü. Ortalama absorbandlara karşılık gelen numunedeki protein miktarları standart grafik yardımıyla hesaplanarak, "mg protein/ g taze ağırlık" olarak ifade edildi.

### 2.7.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

Miktarları belirlenmiş olan, düz ve katlanmış yaprakların protein ekstreleri ile standart protein özütünden uygun miktarda (20 µg) alındı. Bu özütlere iki katı kadar muamele tamponu (0,15 M Tris-HCl pH 6,8, %4 SDS, %20 Gliserol, %6β-merkaptolanol) ilave edildikten sonra, numuneler 90°C de 4 dak. bekletildi ve Laemmli (62) tarafından tanımlanan %12'lik sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi. 0,75 mm kalınlığındaki jel için 15 mA akım uygulanarak ayırma işlemi tamamlandı.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel, dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve Coomassie Brilliant Blue (%0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 4-8 saat boyandı. Boyadan çıkarılan jel Yıkama I (%50 metanol, %10 asetik asit) solusyonunda 1 saat kadar tutuldu ve Yıkama-II (%7 asetik asit, %5 metanol) solusyonuna aktarıldı. Jelin fotoğrafı çekildikten sonra iki sefyan zar arasına alındı ve 80°C' de 2 saat vakumlu jel kurutucuda (Model SE 1160) kurutuldu.

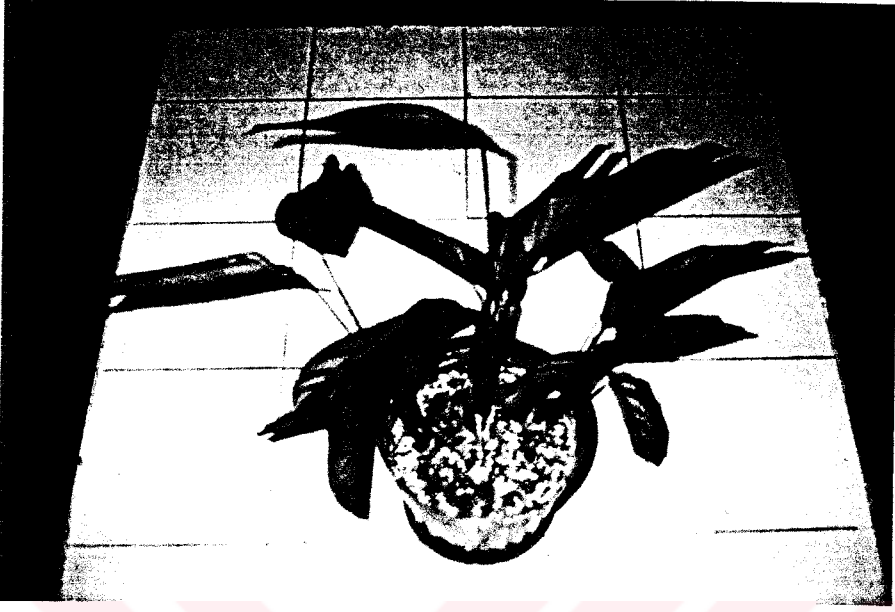
### 3. BULGULAR

Bu çalışmada, *Marantaceae* familyasına ait olan *Ctenanthe sp.* bitkisinde, yaprak katlanmasını etkileyen çevresel faktörler ile katlanma sırasında stomaların açılma dereceleri belirlendi ve yaprakların alt yüzeyinde oluşan kristallerin analizi yapıldı. Ayrıca düz ve katlanmış yapraklardaki çözünebilir protein ve prolin miktarı tespit edildi ve katlanma sürecinde indirgen şeker miktarındaki değişim araştırıldı.

Yapılan gözlemler sonucu, *Ctenanthe sp.* bitkisinde yaprak katlanması üzerine sıcaklık, kuraklık ve aşırı ışığın etkili olduğu kaydedildi. Bu stres şartlarından yalnızca biri mevcut olduğunda katlanma için daha uzun sürenin geçmesi gerektiği belirlendi. Düz ve katlanmış durumdaki yapraklar Şekil 1, 2 ve 3 'de fotoğraflanmıştır.



Şekil 1. *Ctenanthe sp.* bitkisinin düz durumdaki (katlanmamış) yaprakları



Şekil 2. Beş hafta süreyle kuraklık stresine maruz bırakılan *Ctenanthe sp.* bitkisinin katlanmış yaprakları



Şekil 3. Altı hafta süreyle kuraklık stresine maruz bırakılan *Ctenanthe sp.* bitkisinin katlanmış yaprakları

### 3.1. Yaprak Katlanması Üzerine Sıcaklığın Etkisi

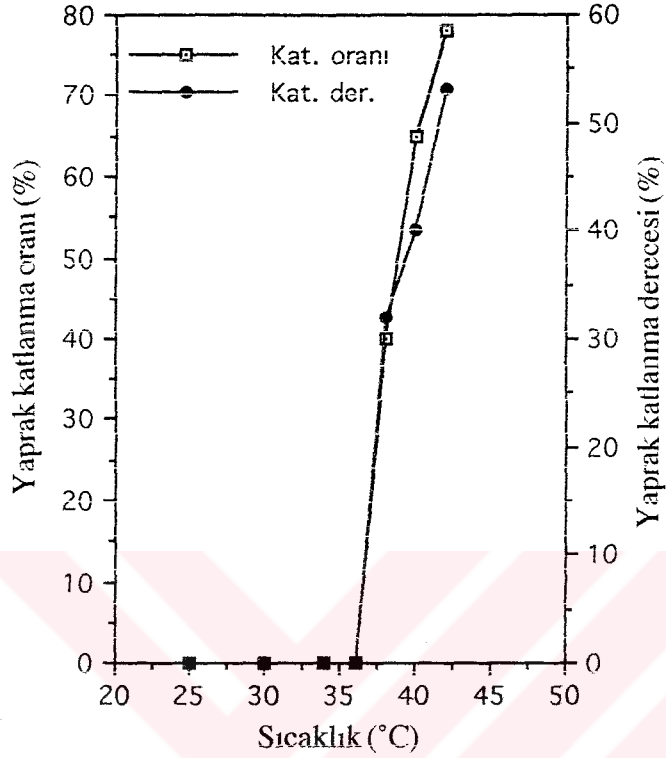
12 saat ışık/12 saat karanlık periyodunda %70 nisbi nemde iki gün süreyle inkübe edilen *Ctenanthe* bitkilerinde yüksek sıcaklıklarda yaprak katlanmasının olduğu tespit edildi. 25°C 'den 36°C 'ye kadar yaprak katlanması görülmezken, 38°C 'de katlanma başladı ve 42°C 'de ortalama katlanan yaprak sayısı %78 'e, yaprak katlanma derecesi de %53 'e ulaştı (Çizelge 2).

**Çizelge 2.** Katlanma üzerine sıcaklık stresinin etkisi  
(Bitki 12 saat ışık/12 saat karanlık periyodunda normal ışık yoğunluğunda, %70 nisbi nemde, 2 gün tutuldu ve her gün sulandı)

Sıcaklık (°C)	Yaprak katlanma oranı (%)	Yaprak katlanma derecesi (%)
25	- *	-
30	-	-
34	-	-
36	-	-
38	40	32
40	65	40
42	78	53

\* Katlanma gözlenmedi

Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen bitkilerde stres sonucu yaprak katlanma oranı ve yaprak katlanma derecesindeki (%) değişimler Şekil 4 ' de gösterildi.



**Şekil 4.** Sıcaklık stresiyle yaprak katlanma oranı ve yaprak katlanma derecesindeki (%) değişimler

### 3.2. Yaprak Katlanması Üzerine Kuraklığın Etkisi

Laboratuvar şartlarında, direkt güneş ışığı almayan bir yerde kuraklığa bırakılan bitkilerde yaprak katlanması 28. günden sonra başladı ve yaprakların %75'i 35. günde katlandı. 42. günden sonra ise tüm yaprakların katlandığı belirlendi. Yaprak katlanma derecelerindeki artışın en son ölçümü, 56. günde %85 olarak hesaplandı (Çizelge 3).

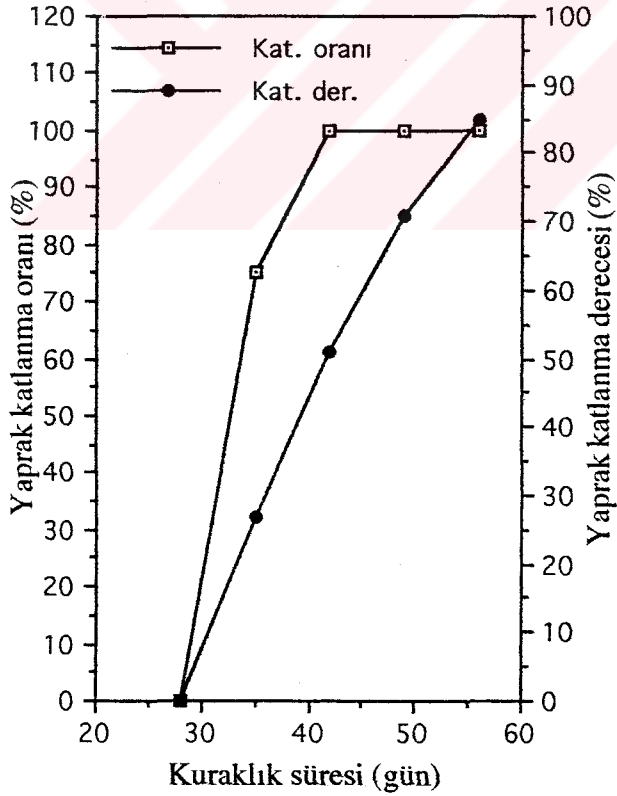
**Çizelge 3.** Katlanma üzerine kuraklık stresinin etkisi

Kuraklık süresi (gün)	Yaprak katlanma oranı (%)	Yaprak katlanma derecesi (%)
28	-	-
35	75 *	27
42	100 **	51
49	100 **	71
56	100 **	85

\* Gündüz katlanma olurken gece olmadı

\*\* Gece ve gündüz katlanma oldu

Susuz bırakılan bitkilerde yaprak katlanma oranı ve yaprak katlanma derecesindeki (%) değişimler Şekil 5' de gösterildi.



**Şekil 5.** Kuraklık stresine bağlı olarak yaprak katlanma oranı ve yaprak katlanma derecesindeki (%) değişimler

### 3.3. Yaprak Katlanması Üzerine Işığın Etkisi

Yaprak katlanması üzerine ışığın yalnız başına bir etkisinin olmadığı, ancak ikinci bir faktörle beraber etkili olduğu belirlendi. İyice sulanmış saksıların düşük ışık yoğunluğundan başlamak üzere  $300 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğuna ayarlı iklim dolabında 2 ile 12 saat inkübasyonu sonucunda, yapraklarda katlanma gözlenmedi.

### 3.4. Yaprak katlanması Üzerine Işık ve Kuraklığın Etkisi

Yaprak katlanması üzerine ışık ve kuraklığın birlikte etkisi ile ilgili sonuçlar Çizelge 4' de gösterildi.

**Çizelge 4.** Katlanma üzerine ışık ve kuraklık stresinin birlikte etkisi (4 ve 6. günde katlanma olmadı)

Kuraklık Süresi (Gün)	8			10			12		
	200	250	300	200	250	300	200	250	300
Işık yoğunluğu ( $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	200	250	300	200	250	300	200	250	300
Yaprak katlanma oranı (%)	-	16	20	25	37	50	37	50	62
Yaprak katlanma derecesi (%)	-	23	28	26	36	47	27	44	52

Çizelgeden de görüldüğü gibi aşırı ışık yoğunluklarında, yaprak katlanması 8. günde başladı ve  $200 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda katlanma gözlenmedi. 10. günde ise  $200 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda yaprakların %25' i katlandı ve yaprak katlanma derecesi %26 olarak hesaplandı. Aynı ışık yoğunluklarında bu değerler 12. günde artarak sırasıyla %37 ve %27' ye çıktı. Işık yoğunluğu  $250 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  e çıkarıldığında ise, 8. günde de yaprakların %16' sı katlandı ve yaprak katlanma derecesi %23 olarak ölçüldü. Bu değer 10 ve 12. günde artarak sırasıyla %36 ve %44 olarak kaydedildi.  $300 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu bitkiler için aşırı ışık yoğunluğu olup, bitkilerde en fazla katlanma bu yoğunlukta gözlendi ve



8. günde %28 olan yaprak katlanma derecesi kuraklık süresinin artmasıyla hızlanarak, 10 ve 12. günde sırasıyla %47 ve %52 olarak belirlendi. 200  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'den daha düşük ışık yoğunlukları uygulandığında ise 12. güne kadar katlanma gözlenmedi.

### 3.5. Yaprak Katlanması Üzerine Kuraklık ve Sıcaklığın Etkisi

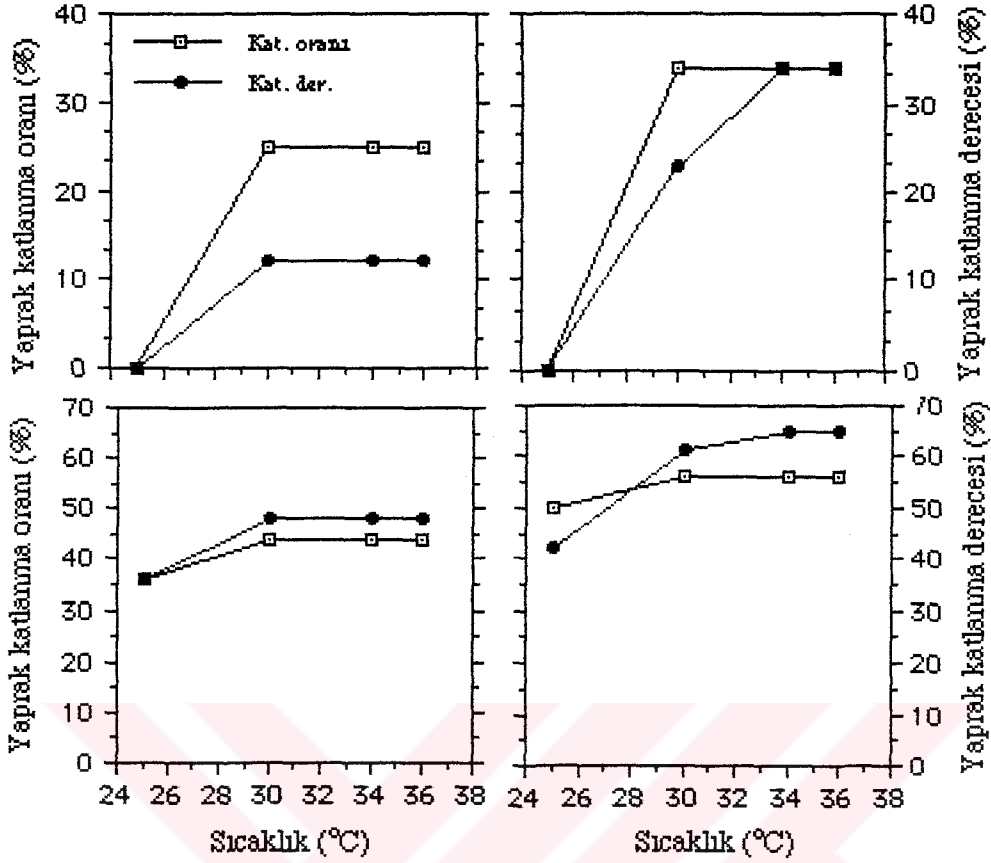
Çizelge 5' ten de görüldüğü gibi ışık, kuraklık ve sıcaklığın üçü bir arada uygulandığında, 2. günde yaprakların %25' i katlandı. Bununla beraber 30-36°C arasında yaprak katlanma oranı değişmedi ve yaprak katlanma derecesi %12 olarak kaldı. Diğer uygulamalarda 6. günde katlanma görülmezken, 30-34°C arasındaki sıcaklıklarda 250  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda yaprakların ortalama olarak %34' ü katlandı. Yaprak katlanma derecesi ise 2. güne oranla artarak, 30°C' de %23, 34 ve 36°C'de de %34 olarak belirlendi. 10. ve 12. günlerde ise 250  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda sıcaklığın artmasıyla bitkilerin yaprak katlanma oranlarında %8 ile %6' lık bir artış tespit edildi. Bu bitkilerin yaprak katlanma derecelerinde de sırasıyla %12 ile %19' luk artış kaydedildi (Çizelge 5).

**Çizelge 5.** Katlanma üzerine kuraklık ve sıcaklık stresinin etkisi (Işık yoğunluğu 250  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  olarak uygulanmıştır)

(Gün)	Kuraklık süresi															
	2				6				10				12			
Sıcaklık (°C)	25	30	34	36	25	30	34	36	25	30	34	36	25	30	34	36
Yaprak katlanma oranı	-	25	25	25	-	34	34	34	36	44	44	44	50	56	56	56
Yaprak katlanma derecesi (%)	-	12	12	12	-	23	34	34	36	48	48	48	42	61	65	65

Farklı sıcaklık ve kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerde yaprak katlanma oranı ve yaprak katlanma derecesindeki (%) değişimler Şekil 6' da gösterildi.

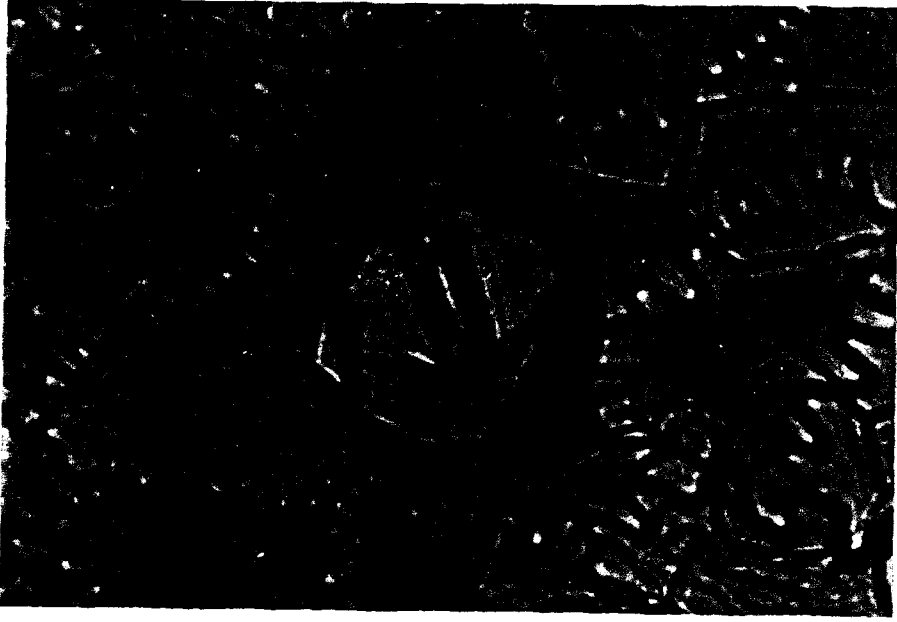




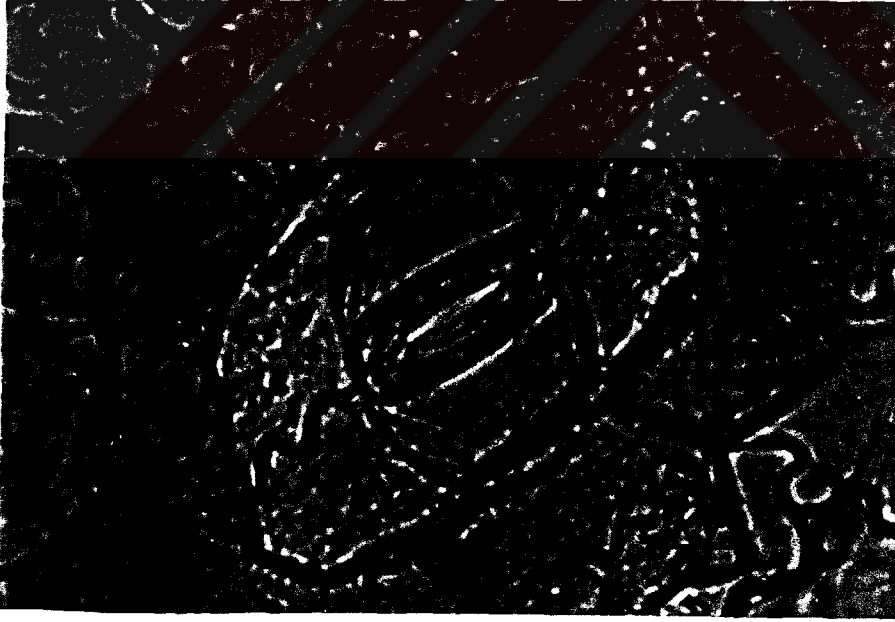
**Şekil 6.** Sıcaklık ve kuraklık stresiyle yaprak katlanma oranı ve yaprak katlanma derecesindeki (%) değişimler (A grafiği 2, B grafiği 6, C grafiği 10 ve D grafiği 12 gün süre ile sulanmamış bitkileri göstermektedir. Işık yoğunluğu  $250 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  olarak uygulanmıştır)

### 3.6. Katlanmanın Stomaların Açılıp Kapanması Üzerine Etkisi

*Ctenanthe sp.* bitkilerinde, ışıkta düz (katlanmamış) ve ışıkta katlanmış yaprakların stomalarına bakıldığında, her ikisinin de açık olduğu tespit edildi. Işıkta katlanmış-ABA püskürtülmüş yapraklardaki stomaların kapanması ile yaprak katlanma derecelerinde azalma gözlemlendi. Stomaların açılma dereceleri Şekil 7, 8 ve 9' de gösterildi.



**Şekil 7.** Işıktaki düz (katlanmamış) yapraklardaki stomaların açılma derecesi



**Şekil 8.** Işıktaki katlanmış yapraklardaki stomaların açılma derecesi



**Şekil 9.** Işıқта katlanmış-ABA püskürtülmüş yapraklardaki stomaların açılma derecesi

### **3.7. Yapraklarda Kristal Oluşumunun Stresle İlişkisi**

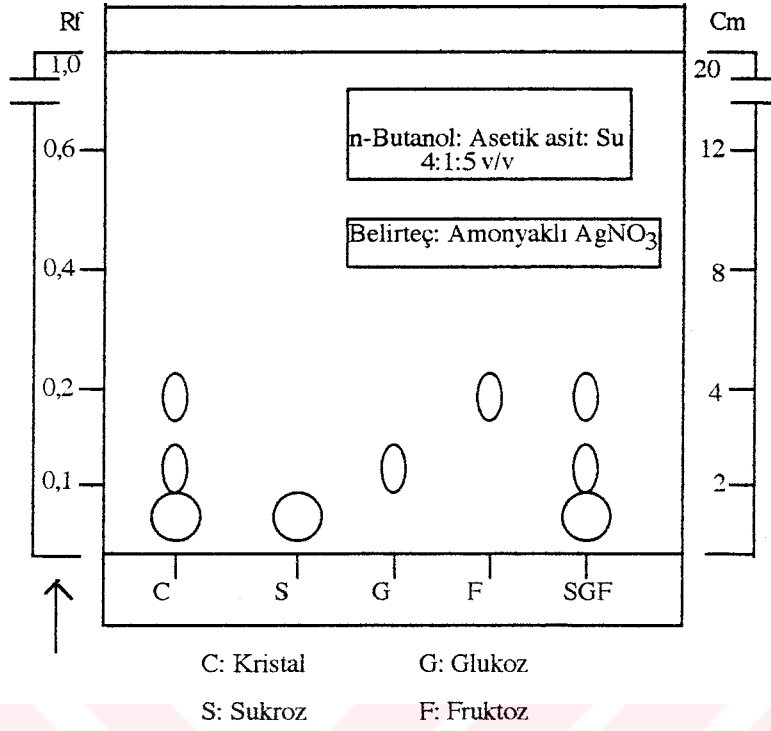
Bu çalışmada yaprakların alt yüzeyinde oluşan kristallerin stres ile ilişkili olduğu belirlendi. 5 hafta süreyle sulanmamış bitki yapraklarının alt yüzeyinde kristal oluşmazken, sulama sonucu 1-3 arasında değişen kristal sayıldı. Bu sayı diğer bir grup bitkide 9-21 arasında değişti ve kristaller ikinci bir kuraklık periyodu sonunda artarak 21-24' e, üçüncü bir kuraklık periyodu sonunda da 24-28' e ulaştı. Bu değerler, kristal oluşumunun bitkinin stres geçirmesine ve oluşan kristallerin sayısının da bitkinin daha önceki stres periyoduna bağlı olduğunu gösterdi. Kristallerin binoküler mikroskopta incelenen şekilleri Şekil 10' da gösterildi.



**Şekil 10.** Yaprak alt yüzeyinde oluşan kristallerin binoküler mikroskoptaki şekilleri

### 3.8. Kristallerin Bileşimi

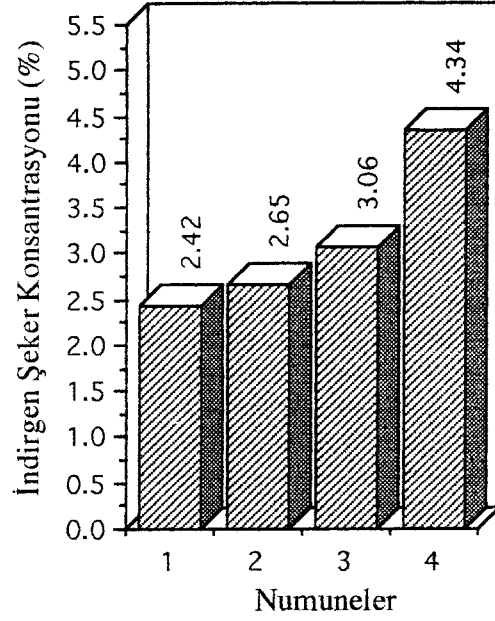
Genel bilgiler kısmında da belirtildiği gibi stres etkisi ile bitkilerde çözünebilir şeker seviyesinde artış olur. Bu nedenle stres sonucunda oluşan kristallerin karbohidrat yapısında olduğu düşünüldü ve oluşan kristallerin toplam karbohidrat miktarına bakıldığında, 97 g/100 g kristal olarak belirlendi. Daha sonra yapılan kağıt kromatografisi sonuçları bu karbohidratların fruktoz, glukoz ve sukroz ile aynı Rf değerine sahip üç farklı şeker olduğunu gösterdi (Şekil 11).



**Şekil 11.** Numune ve standart şekerlerin kromatoğram üzerindeki lekeleri ve Rf değerleri

### 3.9. İndirgen Şeker Miktarındaki Değişimler

Bitkilerin yapraklarında indirgen şeker miktarında, stres esnasında önemli miktarda artış olduğu tespit edildi. Kontrol bitkilerinde 2,42 g/100 g olan indirgen şeker miktarı, katlanmış fakat kristal oluşumu başlamamış yapraklarda 0,23 g artarak 2,65 g/100 g'a çıktı. Stres etkisi ile katlanarak kristal oluşmaya başlamış yapraklarda bu miktar 3,06 g/100 g olarak belirlendi. Kristal oluşumu devam eden yapraklarda ise yaklaşık 1 g artarak 4,34 g/100 g olarak ölçüldü (Şekil 12).



**Şekil 12.** Stres etkisi ile bitki yapraklarının indirgen şeker miktarındaki değişim (1: stressiz (kontrol), 2: katlanmış ve kristal oluşumu başlamamış, 3: katlanmış ve kristal oluşumu başlamış, 4: katlanmış ve kristal oluşumu devam eden yaprakları göstermektedir)

### 3.10. Çözünebilir Protein ve Prolin Miktarındaki Değişimler

Prolin seviyesini tespit etmek için yapılan denemeler sonucunda katlanmış yapraklarda (stresli) kontrol bitkilerine oranla bir artışın olduğu belirlendi. Stres geçirmemiş kontrol grubundaki bitkilerde çizelgeden de görüldüğü gibi 0,42 mg/g olan prolin miktarı stres etkisi ile katlanmış yapraklarda 0,526 mg/g olarak hesaplandı.

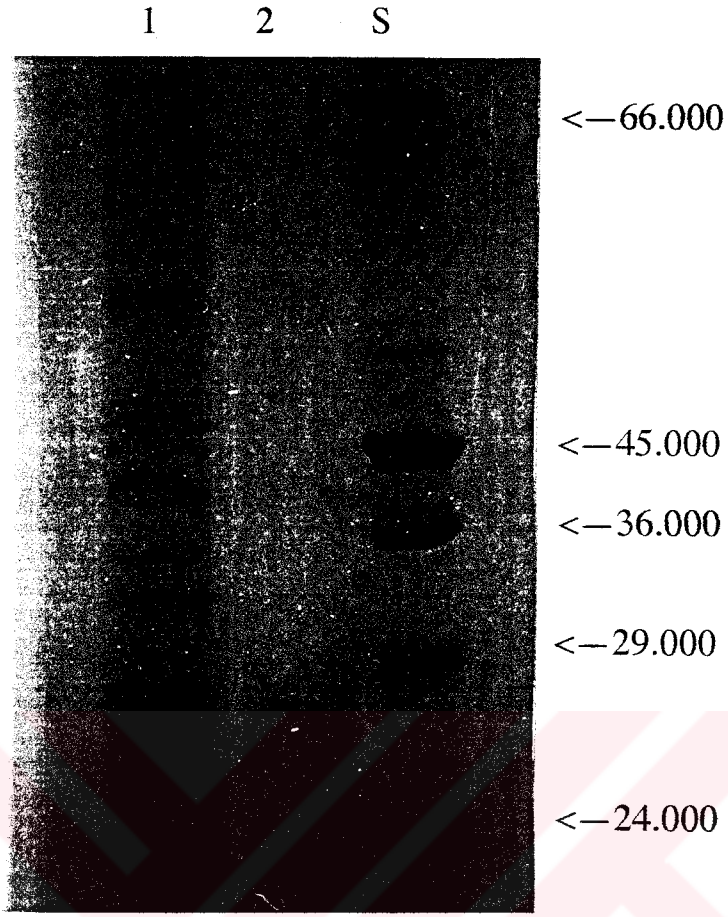
Stresin çözünebilir protein miktarı üzerine etkisine bakıldığında, oldukça önemli bir azalma tespit edildi. Düz durumdaki (katlanmamış) yapraklarda 0,684 mg/g olan protein miktarı, stres etkisiyle katlanmış yapraklarda 0,37 mg/g'a kadar düştü (Çizelge 6).

**Çizelge 6.** Stres sırasında çözünebilir protein ve prolin miktarındaki değişimler

Yapraklar	Prolin miktarı (mg/ g kuru ağırlık)	Çözünebilir protein miktarı (mg/g taze ağırlık)
Katlanmamış (kontrol)	0,420 ± 0,02	0,684 ± 0,01
Katlanmış (stresli)	0,526 ± 0,02	0,370 ± 0,04

### 3.11. Stresin Protein Profili Üzerine Etkisi

*Ctenanthe sp.* bitkisinin katlanma sırasında yeni bir stres proteini sentezleyip sentezlemediğini ve proteinlerdeki değişimi kesin olarak belirlemek için, yapılan elektroforez deneyleri sonucunda yeni bir stres proteinin sentezlenmediği belirlendi. Ayrıca kontrol ile mukayese edildiğinde bazı bantların kaybolduğu, bazı bantların ise zayıfladığı tespit edildi (Şekil13).



**Şekil 13.** Proteinlerdeki değişimin jel elektroforezi ile belirlenmesi (1:stressiz, 2: stres etkisi ile katlanmış, S: moleküler ağırlığı bilinen standart proteinler)



#### 4. TARTIŞMA

Yaprak katlanma derecesi bitkilerin strese karşı dayanıklılığını gösterdiği için stresle ilgili yapılan çalışmalarda, bu parametre ölçülerek çevresel faktörlerin katlanmaya olan etkisi tespit edilmiştir (7, 11, 12, 16, 52, 63). Bu çalışmada da *Ctenanthe* bitkisinin yaprak katlanma oranı ve yaprak katlanma derecelerine (%) bakılarak kuraklık, sıcaklık ve ışık gibi çevresel faktörlerin yaprak katlanması üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Ayrıca kuraklık ve sıcaklık etkisiyle yaprak katlanmasının olduğu, ışığın ise ancak kuraklık ile birlikte etkili olabileceği belirlenmiştir.

Bitkilere aşırı sıcaklık uygulandığında; 38°C sıcaklıkta %32, 42°C'de ise %53'e ulaşan yaprak katlanma derecesi tespit edilmiştir. Pirinç kültürleri üzerinde yapılan benzer bir çalışma da bitkilerin sıcaklıktan etkilenerek yapraklarını katladığı belirlenmiştir (64).

Kuraklık uygulamaları sonucunda ise bitki yapraklarının 35. günde katlandığı tespit edilmiştir. Ancak bu süre, 200  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu ile birlikte uygulandığında 10. güne düşmüştür. Bu sonuçlar Premachandra ve arkadaşlarının (52) arazide büyüttükleri mısır fideleri üzerine yaptıkları çalışma ile paralellik göstermektedir. Bu çalışmada yaprak katlanma derecesindeki günlük değişimler, kuraklığın 22. gününden sonra ölçülmüş ve yaprak katlanma derecesinin öğle üzeri arttığı rapor edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise, yağmursuz geçen 10 günün sonunda, pirinç kültürlerinde öğle üzeri yaprak katlanma derecesinin arttığı tespit edilmiştir (63). Ayrıca O' Toole ve arkadaşları (12) iki pirinç kültürü üzerine yaptıkları çalışmada da benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

Kuraklık ve sıcaklık bir arada uygulandığında ise katlanma 2. günde başlamış ve %12 yaprak katlanma derecesi hesaplanmıştır. Yukarıdaki sonuçlarla mukayese edildiğinde kuraklık ve sıcaklığın ikisi birlikte uygulandığı zaman yaprak katlanma süresinin önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda kuraklık stresi esnasında bitkinin yapraklarını katlayarak, maruz kaldıkları ışık miktarını ve yaprak sıcaklıklarını azalttıkları tespit edilmiştir (11). Turner ve arkadaşlarının (63) pirinç yapraklarında yaptıkları çalışmada da yaprak sıcaklığındaki artışın yaprak katlanması ile ilişkili olduğu

kaydedilmiştir.

Bu sonuçlar ışığında, *Ctenanthe sp.* bitkisinde optimum koşullar dışında meydana gelen yaprak katlanmasının bitkinin dayanıklılığını artırdığı söylenebilir. Bu durum, yaprak katlanması ile bitkinin fazla ışıktan kaynaklanan yaprak ısınmasını engelleyerek, aşırı sıcaklığın ve kuraklığın metabolizma üzerindeki olumsuz etkilerini azalttığı şeklinde yorumlanabilir. Nitekim Matthews ve ark. (11) *Sorghum* serileri üzerine yaptıkları çalışmada, yaprak katlanmasının kuraklığa direnci artırdığını kaydetmişlerdir. Başka çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (5, 7, 64).

Kuraklık stresinden korunmak için, bazı bitkilerin stomalarını kapattıkları (10), bazılarının ise yapraklarını katlayarak transpirasyonla su kaybını azalttıkları ileri sürülmüştür (2, 3, 4, 6). Diğer taraftan yaprak katlanması ile birlikte bazı bitkilerde stomaların açık kaldığı (10, 11), bazı bitkilerde ise kapandığı (3) belirlenmiştir. Çalışmamızda, *Ctenanthe* bitkisinin yapraklardaki transpirasyonu azaltmak için katlanma mekanizmasına ilave olarak, stomalarını da kapatıp kapatmadığını belirlemek için, katlanmış yapraklardaki stomaların açılıp kapanma durumlarına bakıldı ve stomaların açık olduğu görüldü. Elde edilen veriler bu bitkinin stomalarını kapatmayıp, sadece yapraklarını katlayarak transpirasyonu azalttığını göstermiştir. Nitekim, stomaları kapatmada etkili bir hormon olduğu bilinen ABA kullanarak yaptığımız çalışmalar, bu fikrimizi desteklemiştir. ABA püskürtülen katlanmış yapraklarda stomaların kapanması sonunda yaprak katlanma derecesinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmaya benzer olarak Matthews ve ark. (11) da *Sorghum* bitkisinde, katlanma sırasında stomaların açık olduğunu ve bitkilerin stomalarını kapatmak yerine, yaprak katlanması ile yaprak sıcaklığını ve dolayısıyla transpirasyonu azalttığını, böylece büyümenin devam ettiğini kaydetmişlerdir.

Stomaların açık kalması suda çözünen madde miktarının artması ile yakından ilişkilidir (13). Nitekim, çalışmamızda su stresi ortadan kalktıktan sonra (bitkiler sulandıktan sonra) yaprakların alt yüzeyinde yer alan stomalardan, önce sıvı halde şeker salgılandığı, sonra bunların kristal haline dönüştüğü tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada *Ctenanthe* bitkilerinde bu şeker salgılarının stomalardan sıvı halde olduğu belirlenmiştir (51). Bu kristallerin sukroz, glukoz ve fruktozdan oluşması, stres esnasında bu şekerlerin biriktiğini göstermektedir.

İndirgen şeker tayini ile ilgili sonuçlarımız bu fikri desteklemektedir. Stres etkisi ile katlanan yapraklarda kontrole göre gittikçe artan bir indirgen şeker birikimi kaydedilmiştir. Stres sırasında sukroz ve indirgen şekerlerde birikim olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından da ortaya konmuştur (5, 20). Örneğin tütün hücrelerinin NaCl'e adaptasyonları sırasında çözünebilir şekerlerde artış tespit edilmiştir (46). Şekerlerdeki bu artış bitki hücrelerinde osmotik ayarlamayı sağlayarak, strese adaptasyonda rol oynadıkları şeklinde izah edilmektedir (21). Osmotik ayarlamaya karışan bu eriyiklerin turgorun devam etmesini ve böylece stomaların açık kalmasını sağladıkları bilinmektedir (5, 10). Su stresi ortadan kalktıktan sonra ise sentezlenen bu şekerlere ihtiyaç olmadığından dışarı atılmaktadır.

Analizler sonucunda yaprak katlanması ile prolin miktarının arttığı tespit edilmiştir. Kontrolde 0,42 mg/g olan prolin miktarı, katlanmış yapraklarda 0,526 mg/g olarak hesaplanmıştır. Yapraklardaki prolin miktarındaki artışın hücrelerin osmotik potansiyellerine ayarlama etkili olduğu bilinmektedir. Bir çok araştırmacı bitkilerin kuraklığa toleranslı varyetelerinde yüksek prolin birikimi olduğunu ileri sürmüşlerdir (34, 25). Sivaramakrishnan ve ark. (25) *Sorghum* 'un dirençli serilerinde yüksek seviyede prolin biriktiğini, fakat hassas serilerde prolin birikimi olmadığını ve prolin birikiminin bitkinin kuraklıktan çabuk kurtulmasına katkıda bulunduğunu rapor etmişlerdir. Bununla beraber bazı araştırmacılar bu konuda zıt sonuçlar bulmuşlardır. Örneğin Hanson ve ark. (65) prolin birikiminin adaptif bir özellik olmadığını, yalnızca stresin bir belirtisi olduğunu ileri sürmüşlerdir. Diğer taraftan prolinin osmotik ayarlamaya ve strese adaptasyona karşı önemli bir katkı sağladığı da ifade edilmektedir (24, 40).

Çalışmamızda stresli yapraklarda indirgen şeker ve prolin miktarının kontrole göre artmasına karşılık çözünebilir protein miktarında azalma olduğu kaydedilmiştir. Bu azalmanın, indirgen şeker ve prolin gibi aminoasit miktarındaki artışın makromoleküllerin sentezini baskılamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Handa ve ark. (21) da kültüre edilmiş bitki hücreleri üzerine yaptıkları çalışmada, hücrelerde indirgen şeker ve prolin seviyesindeki artışın protein sentezini azalttığını kaydetmişlerdir. Nitekim, stres sırasında bitkilerin indirgen şeker ve prolin miktarını artırarak osmotik potansiyellerini ayarladıkları ve turgor durumlarını korudukları bilinmektedir (5, 20, 21). Ayrıca bazı bitkilerin

strese dayanıklılıklarını arttırmak için, stres proteinleri sentezledikleri de ileri sürülmüştür (47). *Ctenanthe* bitkisinin hem yaprak katlanması hem de osmotik ayarlama da etkili olan indirgen şeker ve prolin miktarını arttırmak suretiyle stresin olumsuz etkisini ortadan kaldırdığı ve böylece yeni protein sentezine ihtiyaç duymadığı şeklinde düşünülmektedir. Nitekim elektroforez sonuçlarımız bu fikri desteklemektedir.

Elektroforez deneyleri sonucunda, kontrol ile mukayese edildiğinde katlanmış yapraklarda bazı protein bantlarının kaybolduğu, bazılarının ise zayıfladığı tespit edilmiştir. Bu durum yukarıda da ifade edildiği gibi, bitkinin olumsuz şartlarda stres proteini sentezlemek yerine yaprak katlanması ve osmotik ayarlama ile su kaybını engelleyerek metabolizmalarını düzenlediklerini doğrulamaktadır.



## 5. SONUÇLAR

Yapmış olduğumuz bu çalışma sonucunda :

1) *Ctenanthe sp.* bitkisinde sıcaklık ve kuraklık etkisiyle yaprak katlanmasının olduğu, ışığın ise kuraklık ile birlikte uygulandığında etkili olabileceği belirlenmiştir. Ayrıca bir dayanıklılık kriteri olan yaprak katlanma derecesinin (%) ölçülmesi ile bu bitkinin olumsuz şartlara dayanıklı olduğu sonucuna varılmıştır.

2) Yaprak katlanması sırasında bazı bitkilerde stomalar ışıkta kapanırken, *Ctenanthe* bitkisinde açık kaldığı belirlenmiştir. Stomaların katlanma sırasında ışıkta açık olması bitkiye fotosentez sırasında karbon girişi sağladığından bitkinin büyüme ve gelişmesinin devam ettiği görülmüştür.

3) Stres esnasında sukroz, glukoz ve fruktoz şekerlerinin sentezlendiği, stresin ortadan kalkmasından sonra ise sentezlenen bu maddelere ihtiyaç olmadığından sıvı halde stomalardan dışarı atıldığı, daha sonra bu şekerlerdeki suyun buharlaşarak kristal halinde yaprakların alt yüzeyinde toplandığı anlaşılmıştır.

4) Stres periyodu sırasında, bitkide indirgen şeker ve prolin miktarında önemli derecede bir artışın olduğu belirlenmiştir. Bu artışın hücrelerin osmotik potansiyellerini ayarlayarak turgor durumunu muhafaza etmesi ve su kaybını engellemesi açısından bitki için oldukça yararlı bir mekanizma olduğu görülmektedir.

5) Söz konusu bu bitkide stresin olumsuz etkisini azaltmak için, şeker metabolizmasının devreye sokulduğu ve böylece proteinlerin sentez miktarının azaldığı kaydedilmiştir.

6) Kısaca bu çalışmada, *Ctenanthe* bitkisinde hem yaprak katlanması hem de osmotik ayarlama ile stresin etkisini azaltan iki mekanizmanın birlikte ortaya çıktığı, dolayısıyla stres esnasında yeni stres proteinlerinin sentezine ihtiyaç duymadığı sonucuna varılmıştır.



## 6. ÖNERİLER

Bitkilerin hayat döngüleri boyunca çok çeşitli olumsuz dış faktörlerle karşı karşıya kaldıkları ve bunun sonucunda ilk olarak etkilenen fizyolojik aktivitenin büyüme ve fotosentez olduğu bilinmektedir. Bu nedenle strese dayanıklı türler seçip yetiştirmeye ve metabolizmaları belirli stres tiplerinden etkilenen bitkilerin çalışılmasıyla, stres fizyolojisinin mekanizmasındaki kavramları anlamaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada *Ctenanthe* bitkisinde bir stres sakınma mekanizması olan yaprak katlanmasına etki eden stres tipleri belirlenmiş ve bitkilerin strese dayanıklı genler içerebileceği düşünülmüştür.

Ayrıca söz konusu bu bitkinin strese maruz kalması sonucunda çözünebilir şeker ve prolin gibi aminoasitlerde bir birikim meydana getirdiği kaydedilmiştir. Bu birikimin osmotik ayarlamayı sağlayarak hücrelerin turgor durumunu muhafaza etmesi ve böylece stomalarını açık tutması ile büyüme ve gelişmenin devam etmesi açısından önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Görüldüğü üzere, *Ctenanthe* bitkisinde hem bir stres sakınma mekanizması olan yaprak katlanması, hem de stres tolerans mekanizmalarından biri olan osmotik ayarlama bir arada bulunmaktadır. Nitekim, bitkinin stres esnasında dayanıklılığını sağlamak için, yeni proteinler sentezlemek yerine bu mekanizmaları devreye soktuğu belirlenmiştir. Bitkinin her iki mekanizmayı da bir arada bulundurması açısından stres çalışmaları için oldukça önemli bir bitki olduğunu söylemek mümkündür. Ayrıca bitkideki bu mekanizmaları harekete geçiren genlerin belirlenip, diğer bitki genomlarına dahil edilmesi açısından yeni çalışmaların temelini oluşturabileceği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Hale, M.G. ve Orcutt, D.M., *The Physiology of under Stress*, John Wiley and Sons, New York, 1987.
2. Bidwell, R.G.S., *Plant Physiology*, Giles, N.H., Torrey, J.G., McMillan Co., New York, 1974.
3. Heckathorn, S.A. ve Delucia, E.H., Effect of Leaf Rolling on Gas Exchange and Leaf Temperature of *Andropogon gerardii* and *Spartina pectinata*, Bot. Gaz., 152 (1991) 263- 268.
4. Blum, A., *Plant Breeding for Stress Environments*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1988
5. Hsiao, T.C., O' Toole, J.C., Yambao, E.B. ve Turner, N.C., Influence of Osmotic Adjustment on Leaf Rolling and Tissue Death in Rice (*Oryza sativa* L.), Plant Physiol., 75 (1984) 338-341.
6. Ehleringer, J. ve Forseth, H., Solar Tracking by Plants, Science., 79 (1980) 1038-1042.
7. Clarke, J.M., Effect of leaf Rolling on Leaf Water Loss in *Triticum* spp., Can. J. Plant Sci., 66 (1986) 885-891.
8. Townley-Smith, T.F. ve Hurd, E.A., *Testing and Selecting for Drought Resistance in Wheat*, *Stress Physiology in Crop Plants*, John Wiley and Sons, New York, 1979.
9. Biscoe, P.V., The Diffusion Resistance and Water Status of Leaves of *Beta vulgaris* L., J. Exp. Bot., 23 (1972) 930-940.
10. Mc Cree, K.J. ve Richardson, S.G., Stomatal Closure vs. Osmotic Adjustment: A Comparison of Stress Responses, Crop Sci., 27 (1987) 539-543.
11. Matthews, R.B., Azam-Ali, S.N. ve Peacock, J.M., Response of Four *Sorghum* Lines to Mid-Season Drought. II. Leaf Characteristics, Field Crops Research, 25 (1990) 297-308.



12. O'Toole, J.C. ve Cruz, R.T., Response of Leaf Water Potential, Stomatal Resistance, and Leaf Rolling to Water Stress, Plant Physiol., 65 (1980) 428-432.
13. Henson, I.E., Abscisic Acid and Water Relations of Rice (*Oryza sativa* L.): Effects of Drought Conditioning on Abscisic Acid Accumulation in the Leaf and Stomatal Response, Annals of Bot., 52 (1983) 247-255.
14. O' Toole, J. ve Moya, T.B., Genotypic Variation in Maintenance of leaf Water Potential in Rice, Crop Sci., 18 (1978) 873-876.
15. Jones, H.G., Visual Estimation of Plant Water Status in Cereals, J. Agric. Science., 92 (1979) 83-89.
16. Ekanayake, I.J., De Datta, S.K. ve Steponkus, P.L., Effect of Water Deficit Stress on Diffusi ve Resistance, Transpiration, and Spikelet Desiccation of Rice (*Oryza sativa* L.), Annals of Bot., 72 (1993) 73-80.
17. Redmann, R.E., Adaptation of Grasses to Water Stress: Leaf Rolling and Stomata Distribution, Ann. Mo. Bot. Gard., 72 (1985) 833-842.
18. Levitt, J., Responses of Plants to Environmental Stresses, Academic Press, New York, 1972.
19. Kramer, P.J., Water Relations in Plants, Academic Press, New York, 1980.
20. Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Handa, S. ve Handa, A.K., Cellular Mechanisms of Tolerance to Water Stress, Hort Science, 19 (1984) 371-377.
21. Handa, S., Bressan, R.A., Handa, A.K., Carpita, N.C. ve Hasegawa P.M., Solutes Contributing to Osmotic Adjustment in Cultured Plant Cells Adapted to Water Stress, Plant Phsiol., 73 (1983) 834-843.
22. Stewart, G.R. ve Lee, J.A., The Role of Proline Accumutation in Halophytes, Planta, 120 (1974) 279-289.

23. Street, H.E. ve Öpik, H., *The Physiology of Flowering Plants: Their Growth and Development*, Third Edition, Willis, A.J., Sleigh M.A, Baltimore, 1984.
24. Gzik, A., Accumulation of Proline and Pattern of  $\alpha$ - Amino Acids in Sugar Beet Plants in Response to Osmotic, Water and Salt Stress, *Environ. and Exper. Bot.*, 36 (1996) 29-38.
25. Sivaramakrishnan, S., Viloo, Z.P., Flower, D.J. ve Peacock J.M., Proline Accumulation and Nitrate Reductase Activity in Contrasting *Sorghum* Lines During Mid-Season Drought Stress, *Physiol. Plant.*, 74 (1988) 418-426.
26. Beny, A. ve Gila R., Proline Accumulation : A Parameter for of Sensitivity of Tomato Varieties to Drought Stress ?, *Physiol. Plant.*, 61 (1984) 231-235.
27. Karamanos, A.J., Drossopoulos, J.B. ve Niavis, C.A., Free Proline Accumulation during Development of Two Wheat Cultivars with Water Stress, *J. Agric. Sci., Camb.*, 100 (1983) 429-439.
28. Chu, T.M., Aspinall, D. ve Paleg, L.G., Stress Metabolism. VI. Temperature Stress and the Accumulation of Proline in Barley and Radish, *Aust. J. Plant Physiol.*, 1 (1974) 87-97.
29. Chu, T.M., Aspinall, D. ve Paleg, L.G., Stress Metabolism. VII. Salinity and Proline Accumulation in Barley, *Aust. J. Plant Physiol.*, 3 (1976) 219-228.
30. Chen, D., Kessler, B. ve Monselise, S.P., Studies on Water Regime and Nitrogen Metabolism of *Citrus* Seedlings Grown under Water Stress, *Plant Physiol.*, 39 (1964) 379-386.
31. Barnett, N. M. ve Naylor, A. W., Amino Acid and Protein Metabolism in Bermuda Grass during Water Stress, *Plant Physiol.*, 41 (1966) 1222-1230.
32. Routley, D.G., Proline Accumulation in Wilted Ladino Clover Leaves, *Crop Sci.*, 6 (1966) 358-361.
33. Singh, T.N., Paleg, L.G. ve Aspinall, D., Stress Metabolism. I. Nitrogen Metabolism and Growth in the Barley Plant during Water Stress, *Aust. J. of Biological Sci.*, 26 (1973) 45-56.

34. Singh, T.N., Paleg, L.G. ve Aspinall, D., Stress Metabolism. III. Variations in Response to Water Deficit in the Barley Plant, Aust. J. of Biological Sci., 26 (1973) 65-76.
35. Wyn Jones, R.G., ve Storey, R., Salt Stress and Comparative Accumulation in Two Salt and Water-Stressed Barley Cultivars, Aust. J. Plant Physiol., 5 (1978) 817-829.
36. Paleg, L.G., Douglas, T.J., Van Dall, A. ve Keech, D.B., Proline, Betaine and Other Organic Solutes Protect Enzymes against Heat Inactivation, Aust. J. Plant Physiol., 8 (1981) 107-114.
37. Stewart, C. R., The Mechanism of ABA-Induced Proline Accumulation in Barley Leaves, Plant Physiol., 66 (1980) 230-233.
38. Stewart, C.R., Boggess, S.F., Aspinall, D. ve Paleg, L.G., Inhibition of Proline Oxidation by Water Stress, Plant Physiol., 59 (1977) 930-932.
39. Stewart, C.R., The Effect of Wilting on Proline Metabolism in Excised Bean Leaves in the Dark, Plant Physiol., 51 (1973) 508-511.
40. Handa, A. K., Hasegawa, P. M. ve Bressan, R.A., Proline Accumulation and the Adaptation of Cultured Plant Cells to Water Stress, Plant Physiol., 80 (1986) 935-945.
41. Blum, A. ve Ebercon, A., Genotypic Responses in *Sorghum* to Drought Stress. I II. Free Proline Accumulation and Drought Resistance, Crop Sci., 16 (1976) 428-431.
42. Hanson, A.D., Nelsen, C.E. ve Everson, E.A., Evaluation of Free Proline Accumulation as an Index of Drought Resistance Using Two Contrasting Barley Cultivars, Crop Sci., 17 (1977) 720-726.
43. Tal, M., Katz, A., Heiken, H. ve Dehan, D., Salt Tolerance in the Wild Relative of the Cultivated Tomato: Proline Accumulation in *Lycopersicon esculentum* Mill., *L. peruvianum* Mill. and *Solanum pennelli* Cor. Treated With NaCl and Polyethylene Glycol, New Phytol., 82 (1979) 349-355.
44. Keskin, H., Besin Kimyası, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 1981.

45. Binzel, M.L., Hess, F.D., Bressan, R.A. ve Hasegawa, P.M., Environmental Stress in Plants, Cherry, J.M., NATO ASI Series, Vol. G 19, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989.
46. Binzel, M.L., Hasegawa, P.M., Rhodes, D., Handa, S., Handa, A.K. ve Bressan, R.A., Solute Accumulation in Tobacco Cells Adapted to NaCl, Plant Physiol., 84 (1987) 108-1415.
47. Öktem, H.A., Özalp, V.C., Nalbant, D., Özkan, F., Nagvi, S.M.S., Memon, A.R. ve Yücel, M., Identification of Stress Induced Proteins in Different Varieties of Poppy (*Papaver somniferum* L.), Doğa-Tr. J. Botany, 16 (1992) 395-403.
48. Heywood, V.H., Flowering Plants of the World, Oxford University Press, Oxford, 1978.
49. Zeybek, N. ve Zeybek, U., Farmasötik Botanik, 2. Baskı, Ege Univ. Eczacılık Fak. Yayınları, Bornova-İzmir, 1994.
50. Brickell, C., The Royal Horticultural Society Gardeners' Encyclopedia, Plants and Flowers., Dorling Kindersley, London, 1994.
51. Kirchoff, B.K. ve Kennedy, H., Foliar, Nonstruktural Nectaries in the Marantaceae, Can. J. Bot., 63 (1985) 1785-1788.
52. Premachandra, G.S., Saneoka, H., Fujita, K. ve Ogata, S., Water Stress and Potassium Fertilization in Field Grown Maize (*Zea mays* L.): Effects on Leaf Water Relations and Leaf Rolling, J. Agronomy and Crop Sci., 170 (1993) 195-201.
53. Vardar, Y., Botanikte Preparasyon Tekniği, Ege Üniv. Matbaası, İzmir, 1992.
54. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. ve Smith, F., Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, Anal. Chem., 28 (1956) 350-356.
55. Sewell, P.A. ve Clarke, B., Chromatographic Separations, Thames Polytechnic, London, 1987.

56. Stahl, E., Thin Layer Chromatography, Second Edition, Heidelberg, New York, 1969.
57. Ross, A.I., Dinitrophenol Method for Reducing Sugars, First Edition, The Avi. Publishing Company, Wesport, 1959.
58. Kaplankıran, M., Özsan, M. ve Tuzcu, Ö., Bazı Turunçgil Anaçlarında Anaç x Kalem Etkileşmesinin İncelenmesinin Karbohidrat Düzeylerine Etkileri, Doğa Bilim Dergisi., 9 (1985) 261-268
59. Bates, L.S., Waldren, R.P. ve Teare, I.D., Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies, Plant and Soil, 39 (1973) 205-207.
60. Harborne, J.B., Phytochemical Methods, Chapman ve Hall, London, 1973.
61. Bradford, M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilising the Principle of Protein Dye Binding, Anal. Biochem., 72 (1976) 248-254.
62. Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins during the Assamby of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227 (1970) 680-685.
63. Turner, N.C., O' Toole, J.C., Cruz, R.T., Namuco, O.S. ve Ahmad, S., Response of Seven Diverse Rice Cultivars to Water deficits I. Stress Development, Canopy Temperature, Leaf Rolling and Growth, Field Crops Research, 13 (1986) 257-271.
64. Omarova, E.I., Bogdanova, E.D. ve Polimbetova, F.A., Regulation of Water Loss by the Leaves of Soft Winter Wheat with Different Organization of Leaf Structure, Russian J. Plant Physiol., 42 (1995) 383-385.
65. Hanson, A.D., Interpreting the Metabolic Responses of Plants to Water Stress, Hortic Sci., 15 (1980) 623-629.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladıktan sonra 1990-1991 öğretim yılında KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 1994 yılında bu bölümden biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve şu anda Biyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

