

170913

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

CTENANTHE SETOSA'DA YAPRAK KIVRILMA MEKANİZMASININ
ARAŞTIRILMASI

Rabiye (TURGUT) TERZİ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"Doktor"
Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07.02.2005

Tezin Savunma Tarihi : 04.03.2005

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ertuğrul SESLİ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. F. Ahmet AYAZ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Enstitü Müdürü: Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT

Trabzon 2005

ÖNSÖZ

“*Ctenanthe setosa*'da Yaprak Kıvrılma Mekanizmasının Araştırılması” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Bu konunun seçilmesinde, çalışmanın planlanmasında ve değerlendirilmesinde her türlü yardımını gördüğüm sayın hocam Prof. Dr. Asım KADIOĞLU'na, tezin geliştirilmesinde yardımcı olan tez izleme jüri üyelerim sayın Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU ile Doç. Dr. Ertuğrul SESLİ'ye, tezdeki endojenik bitki büyüme hormonlarının analizini gerçekleştiren sayın Yrd. Doç. Dr. Peyami BATTAL'a, çalışmayı oldukça rahat bir ortamda gerçekleştirmemi sağlayan ve tezin geliştirilmesinde katkılarını esirgemeyen Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e, çalışmam sırasında bana yardımcı olan Doç. Dr. Faik Ahmet AYAZ'a, diğer bölüm arkadaşlarıma ve çalışmalarım boyunca benden destek ve yardımlarını esirgemeyen aileme ve eşime teşekkür ederim.

Bu çalışma 21.111.004.5 nolu proje ile K.T.Ü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Bu nedenle K.T.Ü Araştırma Fonu Yönetim Kurulu Başkanı ve üyelerine teşekkür ederim.

Rabiye (TURGUT) TERZİ

Trabzon, 2005

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	X
SEMBOLLER DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Stres ve Stres Çeşitleri	4
1.3. Kuraklık Stresi	6
1.4. Yaprak Kıvrılması	7
1.5. Stres ve Nispi Su İçeriği (NSİ)	8
1.6. Stres ve Kök:Sürgün Oranı	9
1.7. Stres ve Fotosentetik Pigmentler	10
1.8. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	10
1.9. Lipid Peroksidasyonu (LPO)	11
1.10. Antioksidant Enzimler	12
1.10.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	12
1.10.2. Glutasyon Redüktaz (GR)	13
1.10.3. Peroksidaz (POD)	13
1.11. Nitrat Redüktaz (NR)	14
1.12. Kuraklık Stresi ve Büyüme Hormonları	16
1.13. Kuraklık Stresinin mRNA Üzerine Etkisi	17
1.14. Marantaceae Familyasının ve <i>Ctenanthe</i> Cinsinin Genel Özellikleri	18
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	20
2.1. Bitkilerin Büyütülmesi	20
2.2. Yaprak Kıvrılma Derecesinin Ölçülmesi	20

2.3. Nispi Su İçeriği Tayini	20
2.4. Kök:Sürgün Oranının Belirlenmesi	21
2.5. Klorofil ve Karotenoid Tayini	21
2.5.1. Klorofil Kararlılık (Stabilite) İndeksi (KKİ) Tayini	21
2.6. Lipid Peroksidasyonu Tayini	21
2.7. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini	22
2.7.1. Enzim Ekstraktının Hazırlanması	22
2.7.2. Enzim Aktivitesinin Tayini	22
2.8. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi Tayini	23
2.9. Peroksidaz Aktivitesi Tayini	23
2.9.1. Enzim Ekstraktının Hazırlanması	23
2.9.2. Enzim Aktivitesinin Tayini	24
2.9.3. Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Peroksidaz İzoenzimlerinin Belirlenmesi	24
2.10. Nitrat Redüktaz Aktivitesi Tayini	25
2.11. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Yapraklardaki İçsel Hormon Miktarlarının Belirlenmesi	25
2.12. RNA İzolasyonu	26
2.12.1. RNA Miktarı Tayini	26
2.12.2. Agaroz Jel Elektrofrezisi	27
2.13. İstatistik Analizler	27
2.14. Genomik DNA İzolasyonu	27
2.15. PCR Reaksiyonu ile 18S rRNA Bölgesinin ve İp3 Gen Parçasının Çoğaltılması ve pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması	28
3. BULGULAR	30
3.1. Kuraklığın Yaprak Kıvrılma Derecesi, Kök:Sürgün Oranı ve Nispi Su İçeriği Üzerine Etkisi	30
3.2. Yaprak Kıvrılmasının Fotosentetik Pigment Miktarları Üzerine Etkisi	32
3.3. Yaprak Kıvrılmasının Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkisi	34
3.4. Yaprak Kıvrılmasının Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	37
3.5. Yaprak Kıvrılmasının Glutasyon Redüktaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	40
3.6. Yaprak Kıvrılmasının Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	43
3.7. Yaprak Kıvrılmasının Peroksidaz İzoenzimleri Üzerine Etkisi	46
3.8. Yaprak Kıvrılmasının Nitrat Redüktaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	48
3.9. Yaprak Kıvrılmasının Endojenik Giberellik Asit (GA) Miktarı Üzerine Etkisi	51

3.10. Yaprak Kıvrılmasının Endojenik İndol Asetik Asit (IAA) Miktarı Üzerine Etkisi	52
3.11. Yaprak Kıvrılmasının Endojenik Zeatin (Z) Miktarı Üzerine Etkisi	53
3.12. Yaprak Kıvrılmasının Endojenik Absisik Asit (ABA) Miktarı Üzerine Etkisi	54
3.13. Yaprak Kıvrılmasının RNA Miktarı Üzerine Etkisi	55
3.14. Yaprak Kıvrılmasının RNA Profili Üzerine Etkisi	56
3.15. PCR Reaksiyonları ile 18S rRNA ve lp3 Genlerinin Çoğaltılması	57
3.16. 18S rRNA ve lp3 Genleri Esas Alınarak Elde Edilen Baz Dizileri	59
4. TARTIŞMA	62
5. SONUÇLAR	72
6. ÖNERİLER	74
7. KAYNAKLAR	75
8. EKLER	91
ÖZGEÇMİŞ	93

ÖZET

Yaprak kıvrılması bazı bitki türlerinde su stresine karşı meydana gelen morfolojik bir cevaptır. Bu çalışmada, 64 gün kuraklık periyoduna maruz bırakılan *Ctenanthe setosa* (Rosc.) Eichler'de yaprak kıvrılmasının kuraklığın 32. gününde başladığı ve yaprak kıvrılma derecesinin giderek arttığı gözlenmiştir. Yaprak kıvrılma derecesindeki artış boyunca, nispi su içeriğinin azaldığı, kök:sürgün oranının arttığı, toplam klorofil, toplam karotenoid, klorofil a/b oranı ve klorofil kararlılık indeksinin % 36'lık yaprak kıvrılma derecesine kadar azalıp sonraki kıvrılma derecelerinde arttığı bulunmuştur. Lipid peroksidasyonunun ise yaprak ve petiyolde % 36, köklerde ise % 55'lik yaprak kıvrılma derecesine kadar arttığı, sonraki kıvrılmalarda azaldığı belirlenmiştir. Süperoksit dismutaz aktivitesinin yapraklarda önemli ölçüde değişmediği, petiyol ve kökte ise % 19'luk yaprak kıvrılma derecesinde azaldığı, sonra ise arttığı bulunmuştur. Glutasyon redüktaz aktivitesinin de yaprak ve petiyolde kontrole oranla önemli ölçüde değişmediği, kökte ise arttığı görülmüştür. Peroksidaz aktivitesinin yaprak ve petiyolde arttığı, kökte ise azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, nitrat redüktaz aktivitesinin yaprak, petiyol ve köklerde azaldığı belirlenmiştir.

Ayrıca, yapraklarda yapılan analizlerde, yaprak kıvrılma derecesindeki artış boyunca, giberellik asit miktarının % 36'lık kıvrılma derecesine kadar kontrole oranla arttığı, % 55'lik kıvrılmada azaldığı ve daha sonraki kıvrılmalarda yine arttığı kaydedilmiştir. İndol asetik asit miktarının ise % 36'lık kıvrılma derecesine kadar arttığı sonraki kıvrılma derecelerinde azaldığı, zeatin ve absisik asit miktarının ise kıvrılma periyodu boyunca arttığı bulunmuştur. Ayrıca, RNA miktarının kontrole oranla azaldığı fakat RNA profilindeki bazı bantların yoğunluğunun arttığı saptanmıştır. Ayrıca bu bitkide 18S rRNA geni ile karakterize edilemeyen bir baz dizisi tespit edilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre, *Ctenanthe setosa*'nın yaprak kıvrılma cevabının yanı sıra bazı biyokimyasal ve moleküler seviyedeki mekanizmaların uyarılmasıyla kuraklık stresine ortak bir tolerans gösterebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kuraklık, Yaprak Kıvrılması, Antioksidant Enzimler, Lipid Peroksidasyonu, Büyüme Hormonları, RNA

SUMMARY

The Investigation of Leaf Rolling Mechanism in *Ctenanthe setosa*

Leaf rolling is a morphologically response to water deficit stress in some plant species. In this study, it was seen that leaf rolling has begun on the 32nd of drought period and the degree of leaf rolling has gradually increased in *Ctenanthe setosa* (Rosc.) Eichler exposed to 64 days drought period. It was found that the relative water content decreased, root:shoot ratio increased, total chlorophyll, total carotenoid, chlorophyll a/b ratio and chlorophyll stability index decreased up to 36 % degree of leaf rolling and increased at degrees after rolling during increasing of the degree of leaf rolling. It was determined that lipid peroxidation also increased up to 36 % in leaf and petiole and 55 % degree of leaf rolling in roots, it decreased at all degrees after rolling. It was found that superoxide dismutase activity did not significantly change in leaves, decreased at 19 % degree of leaf rolling in petiole and root, and then increased. It was seen that glutathione reductase activity did not significantly change in leaf and petiole compared to the control but increased in root. Peroxidase activity increased in leaf and petiole but decreased in root. In addition, it was found that nitrate reductase activity decreased in leaf, petiole and roots.

Also, it was recorded that amount of gibberellic acid increased up to 36 % degree of leaf rolling compared to the control, decreased at 55 % degree of rolling and increased at all degrees after rolling during increasing of leaf rolling degree. It was determined that the amount of indolacetic acid also increased up to 36 % degree of leaf rolling, decreased at all degrees after rolling, zeatin and abscisic acid amounts also increased during the rolling period. In addition, RNA amount decreased compared to the control but increased the thickness of some bands at RNA profile. In addition, 18S rRNA gene and an uncharacterized sequence were determined in this plant.

According to the present results, it has been concluded that *Ctenanthe setosa* may have a associate tolerance to the drought stress by means of leaf rolling response together with mechanisms which are induced at some biochemical and molecular level.

Key Words: Drought, Leaf Rolling, Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation, Growth Hormones, RNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. NO ₃ indirgenmesinde elektron taşıma şeması (Hasman, 1972).....	15
Şekil 2. Gün aşırı sulanmış <i>Ctenanthe setosa</i> 'nın kontrol bitkisi.....	30
Şekil 3. Kuraklık periyodunun 64. gününde % 79 yaprak kıvrılma derecesine sahip <i>Ctenanthe setosa</i> bitkisi	31
Şekil 4. <i>C. setosa</i> 'da yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca toplam klorofil ve karotenoid miktarlarındaki değişiklikler	32
Şekil 5. <i>C. setosa</i> 'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca MDA içeriğindeki değişiklikler	35
Şekil 6. <i>C. setosa</i> 'nın petiyollerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca MDA içeriğindeki değişiklikler	36
Şekil 7. <i>C. setosa</i> 'nın köklerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca MDA içeriğindeki değişiklikler	37
Şekil 8. <i>C. setosa</i> 'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca SOD aktivitesindeki değişiklikler	38
Şekil 9. <i>C. setosa</i> 'nın petiyollerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca SOD aktivitesindeki değişiklikler	39
Şekil 10. <i>C. setosa</i> 'nın köklerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca SOD aktivitesindeki değişiklikler	40
Şekil 11. <i>C. setosa</i> 'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca glutasyon redüktaz aktivitesindeki değişiklikler.....	41
Şekil 12. <i>C. setosa</i> 'nın petiyollerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca glutasyon redüktaz aktivitesindeki değişiklikler.....	42
Şekil 13. <i>C. setosa</i> 'nın köklerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca glutasyon redüktaz aktivitesindeki değişiklikler.....	43
Şekil 14. <i>C. setosa</i> 'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca POD aktivitesindeki değişiklikler	44
Şekil 15. <i>C. setosa</i> 'nın petiyollerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca POD aktivitesindeki değişiklikler	45
Şekil 16. <i>C. setosa</i> 'nın köklerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca POD aktivitesindeki değişiklikler	46
Şekil 17. <i>C. setosa</i> 'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin peroksidaz izoenzimleri üzerine etkisi	47
Şekil 18. <i>C. setosa</i> 'nın petiyollerinde yaprak kıvrılma derecesinin peroksidaz izoenzimleri üzerine etkisi	48

Şekil 19. <i>C. setosa</i> 'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca nitrat redüktaz aktivitesindeki değişiklikler.....	49
Şekil 20. <i>C. setosa</i> 'nın petiyollerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca nitrat redüktaz aktivitesindeki değişiklikler.....	50
Şekil 21. <i>C. setosa</i> 'nın köklerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca nitrat redüktaz aktivitesindeki değişiklikler.....	51
Şekil 22. <i>C. setosa</i> 'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca GA ₃ miktarındaki değişiklikler.....	52
Şekil 23. <i>C. setosa</i> 'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca IAA miktarındaki değişiklikler	53
Şekil 24. <i>C. setosa</i> 'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca Z miktarındaki değişiklikler	54
Şekil 25. <i>C. setosa</i> 'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca ABA miktarındaki değişiklikler	55
Şekil 26. <i>C. setosa</i> 'dan izole edilen RNA'ların %1.4'lük agaroz jeldeki görüntüsü.....	57
Şekil 27. Pt18SrRNAB1 ve Pt18SrRNAF1 dejenerat primer kombinasyonu ile <i>C. setosa</i> genomik DNA'larından PCR yoluyla çoğaltılan DNA parçaları	58
Şekil 28. RTLP3B1 ve RTLP3F1 dejenerat primer kombinasyonu ile <i>C. setosa</i> genomik DNA'larından PCR yoluyla çoğaltılan DNA parçaları	58
Şekil 29. <i>C. setosa</i> 'da 18S rRNA geni esas alınarak elde edilen baz dizisi.....	59
Şekil 30. <i>C. setosa</i> 'da lp3 geni esas alınarak elde edilen baz dizisi.....	60

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo1. Başlıca Stres Tipleri (Hale ve Orcutt, 1987).....	4
Tablo 2. Kuraklığa maruz bırakılmış <i>C. setosa</i> 'da yaprak kıvrılma derecesi, kök:sürgün oranı ve nispi su içeriği (%) ^a	32
Tablo 3. <i>C. setosa</i> 'da yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca klorofil a/b oranı ve klorofil kararlılık indeksleri (%) ^a	33
Tablo 4. <i>C. setosa</i> 'nın yapraklarını kıvrması esnasındaki RNA miktarları	56
Tablo 5. Elde edilen 18S rRNA baz dizisinin gen bankasında var olan bitkilere ait 18S rRNA baz dizileriyle karşılaştırılması	61
Tablo 6. Lp3 geni esas alınarak elde edilen DNA baz dizisinden oluşması mümkün olan amino asit sıralarının gen bankasında kayıtlı diğer transkriptlerle karşılaştırılması	61

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Kuraklık stresi bitkilerin en fazla karşı karşıya kaldıkları olumsuzluklardan birisidir. Bu stres çeşidine bitkilerin cevabı ise birbirinden farklıdır. Bazı bitkiler yetersiz yağış alan ve düşük su içeriğine sahip olan bölgelerde hayatta kalabilmek için bir takım morfolojik ve fizyolojik modifikasyonlar geliştirmişlerdir (Hopkins, 1995). Bu modifikasyonlardan bazıları kuraklık stresi ya da su stresi şartları altında transpirasyonu azaltan yaprakların rulo şeklinde kıvrılması, katlanması veya düşmesidir (Bidwell, 1974). Yaprak kıvrılmasının bazı bitkilerde özellikle su kaybına karşı bir cevap olarak (Townley-Smith ve Hurd, 1979; Begg, 1980; Blum, 1988) yaprağın üst epidermasında bulunan bulliform hücrelerinin turgor özelliklerini kaybetmeleri sonucu meydana geldiği (O'Toole, 1979) ve etkili bir şekilde yaprak yüzey alanının azaldığı (Clarke, 1986) belirlenmiştir. Kıvrılmanın yapraktaki su potansiyeli veya osmotik potansiyel ile ilişkili olduğu (Hsiao vd., 1984), kurak koşullar altında suda çözünen maddelerin fazlaca biriktiği böylece turgorun devamlılığının sağlandığı (Hensen, 1983) rapor edilmiştir.

Pirinç (*Oryza sativa* L.) (O'Toole ve Moya, 1978; Jones, 1979; Ekanayake vd., 1993), buğday (*Triticum aestivum* L.) (Jones, 1979) ve diğer bazı *Gramineae* türleri (Clarke, 1986) ile bir çok kserofitik çimlerde (Redmann, 1985; Clarke, 1986) yaprak kıvrılması ile ilgili bazı çalışmalar yapılmış ve yaprak kıvrılması ile strese tolerans arasındaki ilişki araştırılmıştır. Örneğin, *Festuca arundinacea* Schreb. türlerinin kuraklığa en toleranslı olanlarının belirlenmesinde yaprak kıvrılma derecelerinin önemli bir özellik olduğu ileri sürülmüştür (White vd., 1992). Benzer şekilde, Dingkuhn vd. (1989), su stresi altındaki pirinçte, yaprak kıvrılmasının su kullanma etkinliğini artırdığını kaydetmişlerdir. Ayrıca kıvrılmanın tahıl bitkilerinde kuraklığa dayanıklılığı artırdığı (Townley-Smith ve Hurd, 1979) ve kıvrılma ile orantılı olarak çimlerin hayatta kalma oranlarının arttığı ileri sürülmüştür (Heckathorn ve Delucia, 1991).

Düşük su potansiyeline maruz kalan bitkilerin su ilişkilerinde de değişimlerin olduğu ileri sürülmüştür. Örneğin buğday çeşitlerinde (Sairam vd., 1997/98) ve *Arabidopsis thaliana*'da (Kubo vd., 1999) su stresi altında nispi su içeriğinde (NSİ) önemli azalmaların

olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca *Festuca arundinacea* L. ve *Poa pratensis* L. türlerinde kuraklık esnasında NSİ'nin azaldığı kaydedilmiştir (Jiang ve Huang, 2001).

Bazı otsu bitki türlerinin su eksikliğine maruz kaldıkları zaman stresi telafi etmek için koruyucu mekanizmalarının kapasitesini artırmaya ihtiyaç duydukları ve bu nedenle strese cevap olarak antioksidant sistemlerini harekete geçirdikleri rapor edilmiştir (Smirnoff, 1993). Kuraklık stresi esnasında antioksidant enzim sistemleri ve strese dayanıklılık arasındaki ilişki geniş olarak araştırılmıştır. Örneğin kuraklığa dayanıklı mısır bitkisinde su eksikliği durumunda antioksidantlarda artış olurken hassas olan bitkilerde antioksidantların fazlaca değişmediği ve dolayısıyla daha az bir korumanın sağlandığı (Pastori ve Trippi, 1992) ve su stresine toleransın antioksidant sistemlerin aktivitesiyle ilgili olduğu rapor edilmiştir (Pastori ve Trippi, 1993). Yine, glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD) enzim aktivitelerinin su stresi altında önemli derecede arttığı kaydedilmiştir (Sairam vd., 1997/98; Kubo vd., 1999). Kuraklık stresi altındaki ıspanak (Tanaka vd., 1990), bezelye (Moran vd., 1994), süpürge darısı, ayçiçeği (Zhang ve Kirkham, 1996) ve buğday (Sgherri vd., 2000) gibi bazı kültür bitkilerinde antioksidantların reaksiyonları da araştırılmıştır.

Oksidatif hasarın hücre elemanlarına etki ettiğini gösteren tipik belirtilerden biri de membranlardaki lipid peroksidasyonudur (Boo ve Jung, 1999). Kurak ortamdaki bazı bitkilerde lipid peroksidasyonunun meydana geldiği kaydedilmiştir (Jiang ve Huang, 2001). Stres esnasında lipid peroksidasyonu, klorofil ve karotenoid içeriğindeki değişimler de araştırılan diğer bir konudur. Örneğin, Sairam vd. (1997/98), buğdayın su stresine toleranslı olmasında antioksidant sistemlerinin rolünü araştırmışlar ve su stresinin lipid peroksidasyonunu (LPO) artırdığını, klorofil ve karotenoid içeriklerini ise azalttığını rapor etmişlerdir.

Stres esnasında içsel bitki büyüme hormonlarının seviyelerinde de değişimlerin olduğu belirlenmiştir. Örneğin, vejetatif dokularda absisik asit (ABA) seviyesinin kuraklık, tuz ve soğuk gibi streslere karşı cevap olarak arttığı bilinmektedir (Chen vd., 1983; Cellier vd., 1998). Bu araştırmaların bazılarında ABA miktarındaki artışın bitkilerin strese toleransında etkili olduğu (Larque-Saavedra, Wain, 1974; 1976) ileri sürülmüş, bazılarında ise strese dayanıklılık ve ABA miktarı arasında zıt bir ilişkinin olduğu kaydedilmiştir (Beardsell ve Cohen, 1975; Quarrie, Jones, 1979; İlahi ve Dorffling, 1982). Ayrıca sitokininlerin su ve sıcaklık stresine daha toleranslı kloroplast tipi oluşumunu uyardığı

(Lichtenthaler vd., 1981) ve belirli proteinlerin sentezini teşvik ederek su stresinin bitkiler üzerindeki olumsuz etkisini azalttıkları rapor edilmiştir (Chernyadev, 1997).

Bitkilerin su stresine morfolojik ve fizyolojik seviyede olduğu kadar moleküler seviyede de cevap verdiği belirlenmiştir. Çeşitli stresler tarafından uyarılan gen ürünlerinin gen ifadesinin düzenlenmesinde, strese toleransta ve strese cevaptaki işaretin uyarılmasında görev aldıkları ileri sürülmüştür. Ayrıca son yıllarda kuraklığa dayanıklılık mekanizmalarını açıklamak için stresin etkisiyle uyarılan genler üzerindeki çalışmalar da yoğunlaşmıştır (Ingram ve Bartels, 1996; Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Son yıllarda kuraklık çalışmalarında kullanılmak üzere bir süs bitkisi olan *Ctenanthe setosa* (Rosc.) Eicher (Marantaceae)'in çok iyi bir model bitki olduğu ilk defa Kadioğlu vd. (1999), tarafından belirlenmiş ve bu konuda önemli veriler elde edilmiştir. Bu araştırmalarda su eksikliği ve hava sıcaklığının kıvrılmaya neden olan iki önemli faktör olduğu, ışığın ise su eksikliği ile beraber kıvrılmayı artırdığı (Turgut ve Kadioğlu, 1998), kıvrılma sırasında protein miktarının azaldığı, prolin miktarının arttığı (Kadioğlu ve Turgut, 1999), düşük moleküler ağırlıklı karbohidratların biriktiği, bazı fenolik asitlerin arttığı (Ayaz vd., 2000) ve poliaminlerin yaprak kıvrılmasını geciktirdiği (Kadioğlu vd., 2002) belirlenmiştir. Bununla beraber literatür çalışmalarımızda *Ctenanthe setosa*'da yaprak kıvrılması sırasında sadece yapraklarda bazı analizlerin yapıldığı, petiyol ve kökte ise herhangi bir analizin yapılmadığı belirlenmiştir. Ayrıca kıvrılma esnasında nispi su içeriği, kök:sürgün kuru ağırlık oranı, fotosentetik pigmentler, lipid peroksidasyonu, antioksidant sistemlerde ve azot metabolizmasında rol alan bazı enzimler ile içsel büyüme hormonlarının seviyelerindeki değişimleri belirlemeye yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Diğer taraftan kıvrılma sırasında RNA miktarı ve profilindeki değişimler ile 18S rRNA ve su stresi tarafından uyarılan bir gen olan lp3 genlerine ait baz dizileri ile ilgili herhangi bir kayıta rastlanmamıştır.

Bu amaçla çalışmamızda öncelikle bitkiler kuraklık stresine maruz bırakılarak yaprak kıvrılması sağlanacak ve kıvrılma derecesinin artışı boyunca yapılan analizlerde bitkinin su durumunu gösteren nispi su içeriğine bakılacak, daha sonra yaprak, petiyol ve köklerde kıvrılma esnasında bazı fizyolojik parametreler, antioksidant sistemde fonksiyonu olan bazı enzimler ile nitrat redüktaz enziminin aktiviteleri ve diğer bazı biyokimyasal değişimler araştırılacaktır. Ayrıca, yaprak kıvrılması esnasında moleküler seviyede yapılacak bazı çalışmalar sonucunda RNA miktarı ve profilindeki değişimler ile 18S rRNA ve lp3 genlerine ait dejenerat primerler düzenlenip bu genlerin baz dizileri karakterize

edilmeye çalışılacaktır. Bu çalışmada elde edilecek fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler parametrelere ait verilerin, bitkinin stresten sakınmasını sağlayan yaprak kıvrılma mekanizması ile ilişkili olup olmadığı ve bu parametrelerin bitkinin kuraklık stresine dayanıklılığındaki olası rolleri belirlenmeye çalışılacaktır.

1.2. Stres ve Stres Çeşitleri

Çevresel ve biyolojik faktörlerin ayrı ayrı ya da birlikte fizyolojik olaylarda belirgin değişimler meydana getirmesi stres olarak tanımlanmaktadır. Stres terimi aynı zamanda hasar meydana getirme potansiyelini kapsar. Bir metabolizma bozukluğunun sonucunda oluşan bu hasarlar bitkinin büyümesinde ve veriminde azalma meydana getirirler (Hale ve Orcutt, 1987).

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

Tablo 1. Başlıca stres tipleri (Hale ve Orcutt, 1987)

Fiziksel	Kimyasal	Biyolojik
Kuraklık	Hava kirliliği	Rekabet (Yarışma)
Sıcaklık	Allelokimyasallar (organik)	Allelopati
Radyasyon	Besinler (inorganik)	Simbiyosis yokluğu
Sel	Pestisidler	İnsan Tahribatı
Mekanik	Toksinler	Hastalıklar
Elektrik	Tuzlar	Böcekler
Manyetik alan, Rüzgar	Toprak çözeltisinin PH'sı	

Bu stres tiplerinin etkileri birbirleri ile ilişkilidir. Örneğin yüksek sıcaklığa dayanıklılık, genellikle onunla birlikte oluşan kuraklık koşullarına dayanıklılığa bağlıdır. Benzer şekilde donmaya dayanıklılık, dokunun dehidrasyona dayanıklılığı ile önemli derecede bağlantılıdır (Hale ve Orcutt, 1987).

Tüm bitkiler belirli derecelerde stres hasarlarına karşı koyma ve canlı kalabilme özelliğindedirler. Bir bitkinin bazı kısımları (tohumlar, tomurcuklar ve dormant hücreler) strese dayanıklı iken, diğer kısımları (meristemler, sukkulent organlar ve fideler) duyarlı

olabilir. Ayrıca bitkiler yaşamak zorunda oldukları çevreye adapte olabilmek veya tam olarak uyabilme özelliğine sahiptirler (Bidwell, 1974).

Levitt (1972), strese dayanıklılığı sakinme ve tolerans olmak üzere ikiye ayırmıştır. Eğer bir bitki fiziksel ya da metabolik bir engellemeyle oluşan stresi dışarıda bırakabiliyorsa, bu olay stres sakinmesi olarak adlandırılır. Kısaca stres sakinmesi bitkiye dıştan uygulanan olumsuz bir faktörün etkisini, stres oluşturmadan önleme yeteneğidir (Street ve Öpik, 1984). Örneğin bir bitkinin yaprağı, transpirasyon yaparak iç sıcaklığını korur ve böylece sıcaklıktan sakinir (Ayaz, 1999). Benzer şekilde kaktüs bitkisi su stresi esnasında hücre içindeki su miktarını koruyarak kuraklıktan sakinabilir (Bidwell, 1974). Yeni dikilmiş yonca (*Medicago sativa*) bitkileri de kurak ortamlarda suyu alabilmek için yetişkin bitkiler gibi kök sistemlerini derinlere yönlendirerek hayatta kalabilirler. Böylece yonca bitkisi, kökleri daha yüzye olan bitkilerin kuraklığa maruz kaldığı durumda bile yeterli miktarda suyu alabilir. Diğer bazı bitkiler suyu depo eden sukkulent yapraklar, buharlaşmayı azaltmak için kalın kutikula veya yaprak tüyleri veya suyu koruyan ya da su kaybını azaltan diğer modifikasyonlar geliştirirler (Hopkins, 1995). Eğer bir bitki stres sonucu oluşan hasarları azaltabilmek veya hiç hasar oluşturmama özelliğinde ise bu durum stres toleransı olarak isimlendirilir. Diğer bir deyişle stres toleransı dıştan uygulanan bir strese canlının dayanabilme yeteneğidir (Street ve Öpik, 1984). Örneğin kuraklık toleransı, organizmanın protoplazması kurduğunda hasar olmaksızın hayatta kalmasını ve böylece protoplazma yeniden su aldığında büyüme ve gelişmenin devam etmesini sağlar (Hopkins, 1995). Yine, bir çok organizmanın yaşayamadığı sıcaklıklarda hayatlarını devam ettirebilen yosun, alg ve bakteriler sıcaklık toleransına sahiptirler. Yukarıda belirtilen sakinme ve tolerans mekanizmaları bir çok stres durumunda gelişebilir ve her ikisi de aynı bitkide bulunabilir (Bidwell, 1974).

Bitkiler strese birkaç şekilde cevap verebilirler. Daha az stresli periyotta büyümelerini tamamlayarak stresin etkilerinden kaçabilirler veya stres altında eğer stresten sakinamazlarsa hasara maruz kalırlar. Ayrıca bitkinin metabolizmasındaki spesifik değişimler de bitkiyi stresten sakındırabilir veya strese karşı tolerans sağlayabilir (Hopkins, 1995).

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 dayanabilme yeteneklerinin ölçülmesi ve böylece daha verimli ürün elde edilmesidir. Bilindiği gibi

dünya topraklarının %10'undan daha azı tarıma elverişlidir. Bu nedenle aşırı olumsuz şartlardan kaynaklanan streslere dayanabilen ya da bu streslere tolerans gösterebilen bitkiler yetiştirmeye gerçekten ihtiyaç vardır. Bitkilerin stres cevaplarının anlaşılması, kuraklık, tuzluluk ve diğer verimi azaltan koşullara dayanabilen strese dirençli kültürler üretmek açısından önemlidir (Hopkins, 1995). Strese daha dayanıklı ve toleranslı türler yetiştirmek için ise dayanıklılık ve tolerans mekanizmalarının iyi bilinmesi gerekir (Bidwell, 1974).

1.3. Kuraklık Stresi

Genellikle kuraklık stresi, su eksikliği stresi ile eş anlamda kullanılır. Kuraklık, bitkilerin en fazla karşı karşıya kaldıkları ve dayanmak zorunda oldukları en yaygın streslerden biridir (Kramer, 1980). Kuraklık stresinin etkisi düşük nem, yüksek sıcaklık, aşırı rüzgar ve yüksek ışık yoğunluğunda fazlalaşır (URL-1). Kuraklık durumunda bitkideki su alınımı zorlaşır ve bitkide su eksikliği ortaya çıkar. Su eksikliği hasarına maruz kalan bitkiler, stresin olumsuz etkilerini azaltan bazı mekanizmalar geliştirirler. Kramer (1980)'e göre bu mekanizmalar, kuraklıktan sakınma ve kuraklığa tolerans gösterme olmak üzere iki ana başlık altında incelenebilir. Çoğu bitkilerde çeşitli kuraklık sakınma mekanizmaları gelişmiştir. Örneğin çöl bitkileri, bir yağmur periyodundan sonra kısa bir süre içerisinde tüm hayatsal olaylarını aktif bir şekilde yerine getirirler. Kurak periyotta ise bu olaylar nispeten yavaş seyreder. Ayrıca çoğu bitki suyu iyi bir şekilde absorbe etmek için kutikula, stoma modifikasyonları ve buna benzer özel yapılar geliştirirler. Diğer taraftan, bitkisel organlar arasında stresten en çok etkilenen organlardan birisi yapraklar olup, özel çevre koşullarına adapte olmak için bir takım metamorfozlar geçirirler. Örneğin kserofitik bitkilerde su kaybını azaltan yüzey tüyleri, alt durumlu stoma, yaprak kıvrılması ve benzeri mekanizmalar bulunur. Bu özellikler bitkiden bitkiye değişiklik gösterebilir (Bidwell, 1974).

Kuraklığa toleranslı bitkiler dehidrasyonu erteleyenler ve dehidrasyona tolerans gösterenler olmak üzere iki gruba ayrılabilirler (Kramer, 1980). Dehidrasyonun ertelenmesi transpirasyonu azaltan veya su absorpsiyonunu artıran mekanizmalar ile sağlanır. Böylece bitkinin zarar oluşturacak derecede düşük su potansiyeline ulaşması önlenir. Dehidrasyon toleransı ise hücreler su hasarına ve düşük su potansiyeline maruz bırakıldıktan sonra bitkinin canlılığını devam ettiren veya büyüyen mekanizmaları içerir.

Su hasarı artarsa hücreler turgor durumlarını kaybederler ve böylece hücrelerin büyümesi sınırlandırılır. Aynı zamanda, hücreler içsel osmotik potansiyellerini ayarlayarak da hücre büyüme ve gelişmesini düzenlerler (Hasegawa vd., 1984).

Kuraklık stresine karşı tolerans mekanizmalarından biri de osmotik ayarlamadır (Kramer, 1980). Osmotik ayarlama, kuraklık sonucu turgor özelliklerini kaybeden bitki hücrelerinin, sakınma mekanizmalarının yokluğunda turgoru yeniden kazanmaları ve büyüme için devamlı ettirebilmeleri için başvurdukları diğer bir yoldur (Handa vd., 1983). Osmotik ayarlamayı sağlayan bazı inorganik ve organik eriyiklerdir. Hücrelerin aktif osmotik ayarlamasına en önemli katkıyı indirgen şekerler sağlar (Hasegawa vd., 1984). İndirgen şekerlerin yanı sıra K^+ iyonları (Handa vd., 1983) ve prolin de osmotik ayarlama sağlamak için bitkiler tarafından sentezlenirler (Stewart ve Lee, 1974). Osmotik ayarlama, hububat bitkilerinde kuraklığa tolerans sağlamada önemli bir mekanizma olarak gösterilir (Ackerson vd., 1980; Morgan, 1980, 1984; Turner vd., 1986). Ayrıca stomatal açıklığın korunmasına (Turner vd., 1978; Ackerson vd., 1980; Ackerson ve Hebert, 1981; Ludlow vd., 1985), fotosentezin (Ackerson vd., 1980) devam etmesine, yaprak kıvrılması ve yaprak ölümünün gecikmesine katkı sağlar (Hsiao vd., 1984).

1.4. Yaprak Kıvrılması

Kurak ortamda yetişen bitkiler, yapraklarına gelen ışık miktarını azaltmak için yaprağın açısını değiştirirler ve böylece ışık absorpsiyonu için daha az bir yüzey alanı sağlamış olurlar. Bilindiği gibi ışık, yaprağın ısınmasına neden olur ve su kaybını artırabilir. Bu şartlar altında geliştirilen mekanizmalardan birisi yaprağın yüzeyindeki yansıtma özelliğindeki değişimlerdir (Oppenheimer, 1960). Örneğin, kuraklık stresi altında, küçük taneli tahıl bitkileri orta damar boyunca kıvrılmış dik yapraklar sergilerler. Bu olay bitkiler genellikle suyu geceleyin aldıkları için günün ilerleyen saatlerinde gerçekleşir fakat toprak nemi azaldığı zaman, yaprak kıvrılması günün erken saatlerinde de meydana gelebilir (URL-1).

Yaprak kıvrılması bitkilerin stresten sakınma mekanizmalarından birisidir (Clarke, 1986). Bu olay özellikle çimlerin yaprak üst epidermisinde orta damar boyunca yer alan bulliform hücrelerinin turgor özelliğini kaybetmesi sonucu meydana gelir (Oppenheimer, 1960). Hava kabarcığı şeklinde olan bu hücreler, yaprak kıvrılması ve açılmasını kontrol etmek için su ile dolarlar. Kuraklık stresi altında, bulliform hücreleri büzülür ve bunun

sonucunda yapraklar kıvrılmaya başlar (URL-2). Bu şekildeki bir kıvrılma ile yaprak alanının sadece % 68'i ışığa maruz kalır ve transpirasyon da % 46-83 oranında azaltılır (Oppenheimer, 1960).

Yaprak kıvrılması, aşırı güneş ışığında bitkileri ışıktan koruma mekanizması olarak bilinir ve çoğu bitkide bulunabilir (Kao ve Forseth, 1992; Björkman ve Demmig-Adams, 1993; Xu ve Wu, 1996). Örneğin aşırı güneş ışığına maruz kalan *Amomum villosum* Lour. (Zingiberaceae) bitkisinde meydana gelen yaprak kıvrılması bitkiyi ışığın olumsuz etkilerinden koruyan mekanizmalardan biridir ve normal tarla koşullarında bu mekanizma etkili bir şekilde bitkiyi fotohasardan koruyabilir (Feng vd., 2002).

Kurak ortamdaki bir bitki yaprağını kıvrırmak suretiyle kendisine iki şekilde yarar sağlayabilir. Birincisi, yaprak yüzeyine düşen yüksek dozda güneş ışığından kaynaklanan yaprak sıcaklığındaki artışın oluşturacağı hasarlar, güneş ışınlarına maruz kalan yaprak alanı azaltılarak en aza indirilebilir (Begg, 1980). İkincisi, yaprak kıvrılması ile hem transpirasyon azaltılır hem de yaprağın iç yüzeyinde kalan bölgede daha fazla nem ve böylece strese karşı direnç oluşur. Bu sayede yok denecek kadar az olan su, bitki tarafından en etkili bir şekilde kullanılır (Matthews vd., 1990).

Yaprak kıvrılması bitkinin su kaybını azaltarak senesensin gecikmesine etki etmesi bakımından da önemlidir (Richards vd., 2002). Su stresi sırasında yaprak senesensi yerine yaprak kıvrılmasının başlaması bitkinin fotosentezi iyileştirmesine veya azami olarak artırmasına da olanak sağlar (Knap, 1985). Örneğin, *Andropogon gerardii*, stres esnasında su kaybı oranını yavaşlatmak için yapraklarını kıvrarak fotosentezi aktif olarak devam ettirir ve böylece kısa süreli kuraklığa dayanabilir (Richards vd., 2002). Bununla beraber, yaprak kıvrılmasının fotosentez üzerine etkisi kesin olarak açık değildir (URL-1). Diğer taraftan, yaprak kıvrılmasının diğer bir önemi yaprak sıcaklığının oluşturduğu hasarı azaltarak bitkinin solunumdaki kayıplarını azaltmasıdır (Richards vd., 2002).

1.5. Stres ve Nispi Su İçeriği (NSİ)

Nispi su içeriği (İngilizce kaynaklarda yaygın olarak RWC=relative water content olarak kısaltılır), bitkinin su durumunun genel bir ifadesidir (Sivaramakrishnan vd., 1988). Diğer bir deyişle yaprağın su durumunu ve dokunun metabolik aktivitesini yansıtan bitkinin su durumunun alternatif bir ölçümüdür (Flower ve Ludlow, 1986). Su potansiyeline benzer olarak nispi su içeriği de bir çok çevresel parametreden etkilenen

transpirasyon ve topraktan su alınımı arasındaki dengenin sağlanmasına karşı oldukça duyarlıdır (Sivaramakrishnan vd., 1988). Stres çalışmalarında NSİ'nin belirlenmesi oldukça önemlidir. Buğday kültürvarları (Sairam vd., 2001) ve ayçiçeğinde (Sgherri ve Navari-Izzo, 1995) NSİ su stresinin artmasıyla azalır. Stres esnasında dayanıklı ırkların nispi su içeriğindeki azalışın hassas olanlara nazaran daha az olduğu bilinmektedir. Örneğin, Pastori ve Trippi (1992), NSİ'nin iki mısır ırkında kuraklık periyodu esnasında azaldığını ve bu azalışın hassas olan ırkta dayanıklı olana göre önemli derecede fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Buğday bitkisinde yapılan diğer bir çalışmada da toleranslı olan kültürvarın hassas olanla karşılaştırıldığında, stres periyodu esnasında daha fazla NSİ'ye sahip olduğu görülmüştür (Sgherri vd., 2000). Soğan bitkisinde yapılan başka bir çalışmada ise NSİ'nin kontrol ile karşılaştırıldığında % 25 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Egert ve Tevini, 2002).

1.6. Stres ve Kök : Sürgün Oranı

Su stresinin öncül etkilerinden biri vejetatif büyümedeki azalmadır. Sürgün büyümesi ve özellikle yaprakların büyümesi su stresine genellikle kök büyümesinden daha duyarlıdır. Köklerdeki osmotik ayarlama, su alınımını sürdürür ve yapraklarda mümkün olandan çok daha düşük su potansiyelinde büyümeyi sağlar. Derin köklü bitkiler aşırı bir kuraklık durumunda ve kuraklığın toprağın derinliklerine ulaşmasına kadar su absorpsiyonuna devam edebilirler (Hopkins, 1995). Kök tarafından su alınımının azalması, bitkinin büyüme oranının azalmasına neden olur (Larsson, 1992).

Köklerin büyüme hızı stres toleransını etkileyebilir. Bilindiği gibi kök daha fazla büyürse kök:sürgün oranı değişir. Kök büyümesinin artması daha az gövde büyümesinin meydana gelmesine neden olur (Turner vd., 1986).

Bitkinin kök ve sürgünlerindeki kuru madde oranı, o bitkinin belirli çevre şartlarına adaptasyon derecesini belirleyen kriterlerden biridir (Arora ve Mohan, 2001). Suyun kullanılabilirliği sınırlı olduğu zaman, yaygın bir cevap olarak bitkilerin kök:sürgün oranında artış meydana gelebilir (Hopkins, 1995; Huang ve Fry, 1998; Wu ve Cosgrove, 2000). Bu artış bitkinin strese direncinin bir göstergesi olabilir. Örneğin pirinçte kök:sürgün kuru ağırlık oranı ve kuraklığa dayanıklılık arasında pozitif bir korelasyon vardır (Champoux vd., 1995). Ayrıca kök:sürgün oranındaki artış, köklerin toprakta azalan suyu araştırarak daha fazla su alınımı kapasitesini de geliştirir (Hopkins, 1995).

1.7. Stres ve Fotosentetik Pigmentler

Bütün bitki seviyesinde stresin etkilerinden birisi de genellikle fotosentetik pigmentlerin içeriğindeki azalmadır. Şiddetli su stresinin (-1,9 Mpa) klorofil, β -karoten, neoksanin ve lutein seviyesini önemli derecede azalttığı rapor edilmiştir (Yordanov vd., 2000). Bazı çim (Fu ve Huang, 2001) ve buğdaylarda (Sairam vd., 1997/98) klorofil a ve klorofil b içeriği su stresi esnasında kontrol bitkilerine göre önemli derecede azalmıştır. Ayrıca bazı buğday genotiplerinde su ve sıcaklık stresinin klorofil içeriğini, klorofil a/b oranını ve klorofil kararlılık indeksini de azalttığı kaydedilmiştir (Sairam vd., 1997; Herbinger vd., 2002). Bununla beraber bazı bitkilerde stres esnasında fotosentetik pigmentlerde artış meydana gelebilir. Örneğin, *Digitalis lanata*'da su stresi, β -karoten içeriğinde fotokoruma veya singlet oksijen temizlenmesinin artmasından kaynaklanan artışa neden olur (Smirnoff, 1993). Yine, *Poa pratensis* L.'de kuraklık periyodunun 6. gününde *Festuca arundinacea* L.'de ise 12. gününde klorofil içeriği kontrole göre artış göstermiştir (Jiang ve Huang, 2001).

Fotosentetik pigmentler fotosentez olayındaki rollerine ilave olarak ışık tarafından uyarılan aşırı reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek fotodinamik hasarlara karşı bir koruma sağlarlar (Herbinger vd., 2002). Bu pigmentlerden en önemlisi karotenoidler de singlet oksijenin temizlenmesinde görev alırlar. Bu nedenle bir genotipteki karotenoid seviyesi aynı zamanda o genotipin strese toleransını da belirler (Sairam vd., 1997/98). Tolerant genotipler, yüksek karotenoid içeriğinin yanı sıra aynı zamanda yüksek klorofil içeriğine de sahiptirler (Pastori ve Trippi, 1992). Örneğin, toleranslı buğday ve mısır genotiplerinde stres şartları altında klorofil içeriği azalmakla beraber toleranslı olan genotiplerde hassas olanlara nazaran nispeten yüksek klorofil içeriği bulunur (Kraus vd., 1995; Chandrasekar vd., 2000; Lascano vd., 2001).

1.8. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Su stresine maruz kalma, aşırı reaktif oksijen bileşiklerinin (ROS) oluşumuna neden olan oksidatif stres gibi sekonder stresler meydana getirir. ROS hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve süperoksit anyonlarını içine alır. ROS'lar genellikle fotorespirasyon ve yağ asitlerinin β -oksidasyonu gibi normal hücrel aktiviteler tarafından üretilir fakat bitkiler

biyotik veya abiyotik stres şartlarına maruz kaldıklarında, seviyeleri artar. ROS'lar fotosentetik pigmentleri, membran lipidlerini, proteinleri ve nukleik asitleri oksitleyerek (Smirnoff, 1993; Alscher vd., 1997; Yordanov vd., 2000) pigment kaybı, lipid peroksidasyonu, enzim inaktivasyonu gibi bitkide hasar oluşturan olaylara neden olurlar (Sairam vd., 1997/98). Hasar hücrel ve ürün seviyesinde olabileceği gibi DNA seviyesinde de olabilir. ROS'ların temizlenebilmesi, protein ve DNA gibi makromoleküller üzerine zararlı etkilerinin azaltılabilmesi stres tolerans özelliğinin önemli bir göstergesidir. ROS'lar askorbik asit, glutatyon, tioredoksin ve karotenoidler gibi antioksidant bileşikler ve superoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, peroksidaz ve katalaz gibi ROS temizleyen enzimler tarafından ortadan kaldırılabirler (Sairam vd., 2001).

1.9. Lipid Peroksidasyonu (LPO)

Stres etkisiyle oluşan serbest radikaller bitkilerde lipid peroksidasyonunu (LPO) başlatabilir (Thompson vd., 1987). Lipid peroksidasyonu oksidatif stres sonucunda oluşan malondialdehit (MDA) içeriğine bakılarak belirlenir (Irigoyen vd., 1992) ve yaprak senesensi esnasında önemli bir değişim olarak düşünülür (Dhindsa vd., 1981/82; Thompson vd., 1987). Stres altında lipidlerin oksidasyonu iki veya üç kat artabilir. Örneğin çeltik sürgünlerinde (Yordanov vd., 2000), buğday genotiplerinde (Sairam vd., 2001) ve şeker kamışı yapraklarındaki (Smirnoff, 1993) su stresi lipid peroksidasyonunu artırır. Ayrıca, yoncada de kuraklık stresi lipid peroksidasyonunu uyarabilir (Irigoyen vd., 1992). Diğer taraftan bazı çim bitkilerinde kuraklık esnasında MDA içeriğinin etkilenmediği de bilinir. Lipid peroksidasyonunun düşük seviyede olması özellikle SOD ve peroksidaz gibi bazı antioksidant enzimlerin aktivitesinin yüksek seviyede tutulmasının bir sonucu olabilir (Fu ve Huang, 2001). Ayrıca, lipid peroksidasyonunun bitkilerin strese toleransı ile ilişkili olduğu bilinir. Örneğin, su stresine maruz bırakılmış buğday ve mısır çeşitlerinde su stresi şartları altında MDA içeriği artarken hassas genotiple karşılaştırıldığında strese toleranslı genotiplerde düşük oranda lipid peroksidasyonu (LPO) meydana gelir (Pastori ve Trippi, 1992; Sairam vd., 1998).

1.10. Antioksidant Enzimler

Antioksidant enzimler ve bazı metabolitler çeşitli hububat bitkilerinde stres toleransı ile ilişkilidir (Liebler vd., 1986; Elstner, 1987; Larson, 1988). Su ve sıcaklık stresi altında bazı antioksidant enzimlerin aktivitelerinin arttığı bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Matters ve Scandalios, 1986; Baisak vd., 1994; Tanaka, 1994). Başlıca antioksidant enzimler süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz ve glutatyon redüktaz'dır. Bitkinin su durumuna bağlı olarak, strese karşı korunma, bu enzimlerin aktivitelerinin artışıyla yerine getirilir. Yukarıda da değinildiği gibi antioksidantların yükseltilmesi temizleme aktivitesinin yükseltilmesi bitkilerin kuraklığa toleransının artması ile ilişkilidir (Bowler vd., 1992).

1.10.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1), süperoksit serbest radikallerinin temizlenmesi için bu bileşiklerinin hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (Fridovich, 1986; Elstner, 1987). Canlı organizmalar SOD ile süperoksiti uzaklaştırır ve böylece hidroksil radikalının oluşum riskini azaltırlar. Bu enzim, süperoksit anyonlarını uzaklaştırmasına rağmen, toksik bir oksijen türevini (O_2^-) diğerine (H_2O_2) dönüştürür (Mehlhorn, 1990). Bu reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 , fotosentezin güçlü bir inhibitörüdür ve kloroplastın fonksiyonları için önemli bir risktir. İkinci aşamada, bu toksik ürün peroksidazlar tarafından ortadan kaldırılarak, kloroplastlardaki bazı olayların sağlıklı bir şekilde devam etmesi sağlanır (Dahan vd., 1997).

SOD aktivitesinin su stresine cevabı türlere, kuraklık süresine ve kuraklığın şiddetine bağlı olarak değişir (Fu ve Huang, 2001). Örneğin kuraklık stresi esnasında yapılan bir çalışmada SOD aktivitesinin arttığı ortaya konmuştur (Smirnoff, 1993). Buğday bitkisinde ise SOD aktivitesinin kuraklığın erken safhasında arttığı veya değişmediği daha sonraki dönemde ise su stresine beraber arttığı rapor edilmiştir (Fu ve Huang, 2001). Arpada kuraklık stresi esnasında SOD aktivitesinde artış olduğu, ayçiçeğinde ise belirgin bir artışın olmadığı kaydedilmiştir (Smirnoff, 1993). Bunlara ilave olarak, yoncada yapılan bir araştırmada SOD aktivitesinin kuraklık stresi tarafından etkilenmediği tespit edilmiştir (Irigoyen vd., 1992). Benzer olarak, *Sorghum bicolor* L.'da SOD aktivitesinin ılımlı su stresi altında etkilenmediği belirlenmiştir. Ayrıca, pek çok araştırmada, aşırı SOD artışının,

düşük sıcaklık ve su stresi gibi abiyotik streslere karşı bitkilerin toleransının artmasını kontrol ettiği rapor edilmiştir (Bohnert ve Sheveleva 1998).

1.10.2. Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) elektron vericisi olarak NADPH'ı kullanarak oksitlenmiş glutasyonun (GSSG), indirgenmesini (GSH) katalizleyen bir enzimdir (Scruton vd., 1990; Creissen vd., 1994). İndirgenmiş glutasyon (GSH) antioksidatif savunma sisteminin önemli bir elemanıdır. GSH'ın reaktif oksijen bileşiklerini temizleme kapasitesi proteinlerin SH gruplarının koruyucusu olarak önemlidir. Bu işlemde GSH, GSSG ye yükseltgenir ve glutasyon redüktaz aktivitesiyle GSH yeniden üretilir (Noctor ve Foyer, 1998). Ayrıca GSH, kuraklık toleransında, stres esnasında oluşabilecek hücresel hasarların sınırlandırılmasında ve aktifleşmiş O₂ bileşiklerine karşı savunma mekanizmalarının uyarılmasında da anahtar bir rol oynar (Sgherri ve Navari-Izzo, 1995).

Glutasyon redüktaz, GSH/GSSG oranını yüksek seviyede tutar ve böylece bitkideki oksidatif hasarlara karşı kloroplastları korur. Glutasyon redüktaz bitkilerin kuraklık, yüksek oksijen basıncı ve hava kirleticileri tarafından üretilen oksidatif stresin olumsuz etkilerinin düzeltilmesine ve strese karşı direnç sağlanmasına katkıda bulunur (Sairam vd., 1997). Diğer taraftan, GR diğer enzimlerle birlikte hidrojen peroksidin temizlenmesinde de görev alır (Gamble ve Burke, 1984; Gillham ve Dodge, 1987; Bowler vd., 1992). Çeşitli bitkilerde GR aktivitesinde çevresel streslere cevap olarak artış meydana geldiği bulunmuştur (Gamble ve Burke, 1984; Gillham ve Dodge, 1987; Dhindsa, 1991). Ayrıca soya fasülyesi (Pastori ve Trippi, 1992), domates (Walker ve McKersie, 1993), tütün (Rensburg ve Kruger, 1994) ve buğday (Kraus vd., 1995) gibi bazı kültür bitkilerinde GR aktivitesi değişiminin oksidatif strese tolerans ile ilişkili olduğu da rapor edilmiştir (Sairam vd., 1997).

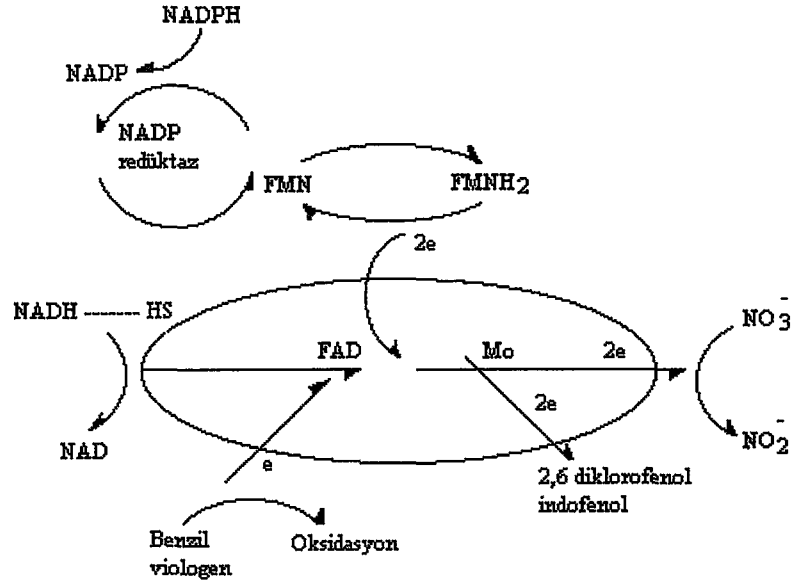
1.10.3. Peroksidaz

Su stresi, H₂O₂ ve oksijen serbest radikalleri gibi indirgenmiş oksijen türevlerinin oluşumunu ve birikimini sağlar (Kenis vd., 1994). Peroksidazların (POD, EC 1.11.1.7) H₂O₂'in parçalanmasını katalizlemesinin yanısıra, toksik indirgeyicilerin oksidasyonunu,

ligninin sentezini ve yıkımını (Grisebach, 1981), yaralanmalara karşı savunma cevabı oluşumunu (Espelie vd., 1986) ve oksin katabolizmasını sağlamak (Hinman ve Lang, 1965) gibi bir çok fizyolojik fonksiyonu kontrol ettiği bilinmektedir. Ayrıca, peroksidazlar, bitkilerde kuraklık gibi çevresel streslerin meydana getirdiği oksidatif değişime cevap olarak uyarılan serbest radikal temizlenmesiyle ilgili enzim gruplarından biridir (Palatnik vd., 1997; Castillo, 1996). Peroksidaz aktivitesi, dış kaynaklı sinyallere ve zor çevre koşullarına cevap olarak hızlı bir şekilde değişebilir. H_2O_2 'in varlığında, *in vitro* hidrojen vericisi olarak çeşitli organik ve inorganik substratları kullanabilirler (Van Assche ve Clijsters, 1980). Peroksidazlardan substrat olarak askorbatı kullanan askorbat peroksidaz, hidrojen peroksitin parçalanmasında oldukça önemlidir (Kirtikara ve Talbot, 1996). Su stresine maruz kalan duyarlı buğday çeşitlerinde askorbat peroksidaz aktivitesinin uyarıldığı, toleranslı buğdayda ise sadece yüksek stres yoğunluğunda arttığı kaydedilmiştir (Sgherri vd., 2000). Bu konuda benzer pek çok araştırma mevcuttur. Örneğin, peroksidazın orta derecedeki bir strese maruz kalan damkoruğu bitkisinde arttığı fakat şiddetli stres sırasında azaldığı rapor edilmiştir (Castillo, 1996). *Arabidopsis* bitkisinde yapılan bir çalışmada 2 gün su eksikliğine maruz kalan bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, Tanaka vd. (1990), su stresi altındaki ıspanak yapraklarında peroksidaz aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir. Bununla beraber kuraklığa cevap olarak POD aktivitesinde artışların yanı sıra azalma veya değişimlerin olmadığı da belirlenmiştir (Fu ve Huang, 2001).

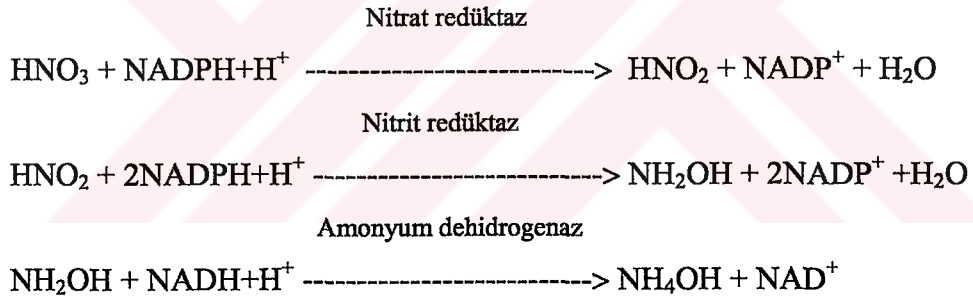
1.11. Nitrat Redüktaz (NR)

Nitrat redüktaz (NR, EC 1.6.6.1) molibden ihtiva eden flavoprotein yapısında bir enzim olup, hücrenin sitoplazmasında bulunur ve azot asimilasyonunda rol alır (Hasman, 1972). Bu enzim azot metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar bir noktada bulunur (Sinha ve Nicholas, 1981). Nitrat redüktaz bitkilerin hem kök hem de yapraklarındaki nitrat asimilasyonundaki nitratın nitrite indirgendiği ilk enzimatik reaksiyonu kataliz eder (Truax vd., 1994; Yaneva vd., 2000). Nitrat daha çok köklerde mevcut olan, yapraklarda çok az miktarda bulunan bir bileşiktir. NO_3 'ün NO_2 'ye indirgenmesi, ışığa ihtiyaç göstermez. Bu indirgenme indirgenmiş piridin nükleotidine ihtiyaç gösterir (Hasman, 1972).



Şekil 1. NO_3^- indirgenmesinde elektron taşıma şeması (Hasman, 1972)

Nitratın indirgenmesi aşağıdaki denklemlerdeki gibi meydana gelir.



Birçok bitki türü, yapraklarındaki nitrat redüktaza, NADH'a elektron vericisi olarak ihtiyaç duyar. Ayrıca nitrat redüktaz kofaktör olarak NADH'ı bulundurur. Nitrat redüktaza FMN veya FAD ilave edildiğinde, elektron vericisi olarak NADH kullanılmasından daha fazla faaliyet gösterir. Işık tarafından indirgenmiş durumdaki riboflavin, oksijensiz şartlar altında, nitrat redüktaz için NADH'tan daha etkilidir. Bu durum piridin nukleotidinin enzime birinci derecede elektron vericisi olmadığını gösterir. İndirgenmiş benzil viologen kısmen nitrat redüktaza elektron vericisi olarak görev alır. Nitrat redüktaz ihtiyaç duyduğu elektronları doğrudan doğruya NADH, FMNH₂, FADH₂ ve benzil violojenden alır fakat NADPH'dan doğrudan doğruya alamaz, ancak NADP redüktaz ve FMN aracılığıyla dolaylı olarak alabilir (Hasman, 1972) (Şekil 2).

Bitkilerde nitrat redüktaz aktivitesi çevresel faktörler tarafından etkilenir. Bunun nedeni, enzimin nitrat tarafından uyarılabilmesi ve *in vivo* ve *in vitro* olarak kısa bir yarılanma ömrüne sahip olmasıdır. Bu yüzden, nitrat alınımını veya protein sentezini etkileyen herhangi bir faktör NR aktivitesini değiştirebilir (Smirnov vd., 1985). NR aktivitesi, kuraklık stresi ve bitki büyümesi ile ilişkilidir (Sivaramakrishnan, 1988) ve su stresi sırasında NR aktivitesi çoğu enzimden çok daha hızlı azalır (Huffaker, 1970; Bardzik vd., 1971). Nitrat asimilasyonu ile ilgili diğer enzimlerden olan nitrit redüktaz ve glutamin sentetaz gibi enzimler nispeten etkilenmezler (Smirnov vd., 1985).

Su stresi esnasındaki NR aktivitesindeki azalış biyokimyasal adaptasyonla ilgilidir (Smirnov vd., 1985). Böyle bir azalış *Zea mays* (Pal vd., 1976; Shaner ve Boyer, 1976), *Hordeum vulgare* (Anikiev ve Kuramagomedov, 1975), *Pisum sativum* (Gupta ve Beevers, 1983) ve *Triticum vulgare* (Heuer vd., 1979) bitkilerinde kaydedilmiştir. NR aktivitesindeki azalma, arazide büyütülen bitkilerde de kuraklık periyodu sırasında ortaya çıkabilir (Smirnov vd., 1985). Bununla beraber NR aktivitesindeki azalış, stresin şiddetine bağlı olarak değişebilir. Ayrıca NR aktivitesi kuraklık toleransı için özellikle önemlidir (Ray ve Sisson, 1986) ve kuraklığa toleranslı olan buğday çeşitlerinde NR aktivitesi nispeten daha az inhibe edilir (Sairam, 1994)

1.12. Kuraklık Stresi ve Büyüme Hormonları

Büyüme hormonları bitkilerin strese cevabını düzenlemede önemli rol oynarlar (Wang vd., 2001). Kuraklık stresi esnasında hücrelerdeki turgorun azalması sonucunda yaprak kıvrılmasının yanı sıra absisik asit (ABA) gibi bazı büyüme hormonlarının seviyesi de değişir (Pierce ve Raschke, 1980; Turner vd., 1986). ABA çiçekli bitkilerde su eksikliğine (kuraklığa) cevap olarak üretilir, kuraklığa ve diğer çevresel streslere toleransla ilgili cevapların başlamasında önemli bir rol oynar. Bitkilerde kuraklık stresi sırasında ABA konsantrasyonunun artması, büyüme, gelişim (Hartung ve Davies, 1991; Bray, 1993; Reddy vd., 2004) ve bazı genlerin ifade edilmesini de (Bray, 1991) kapsayan çok sayıda değişimler meydana getirir (Zeevaart, Creelman, 1988). Örneğin Bray (1988), domates (*Lycopersicon esculentum*) yapraklarında kuraklık stresi sırasında meydana gelen ABA birikiminin, stres esnasında gen ifadesindeki bazı değişimler için gerekli olduğunu ileri sürmüştür.

ABA, kök:sürgün kuru ağırlık oranındaki artış, yaprak alanı gelişiminin inhibisyonu, kök büyümesinin ve dolayısıyla kök derinliğinin artması gibi çeşitli bitki kısımlarının nispi büyüme oranını değiştirir (Sharp vd., 1994). Suyun korunmasında çok önemli bir cevap olan stomaların kapanması ABA tarafından başlatılır (Ward vd., 1995). Ayrıca, ABA hücre turgorunu muhafaza etmek, düşük su potansiyeline ve kuruma ile ilgili hasar oluşturan güçlere dayanabilmek için etkili hücresel değişimlerde rol alır. Örneğin ABA osmotik ayarlamayı uyarır (Ober ve Sharp, 1994) ve koruyucu proteinlerin (LEA ve ilgili proteinler) sentezini harekete geçirir (Bray, 1993; Chandler ve Robertson, 1994).

Çoğu bitkide bitki büyümesini uyarıcı hormonlar ise stres esnasında azalır. Örneğin *Iris hexogana* bitkisinde tuzluluk stresine cevap olarak ABA seviyesi artarken endojenik IAA seviyesi azalmıştır. Bu iki hormonun bitkilerin strese karşı adaptasyon veya cevap vermedeki birinin diğeri üzerine etkisinin birlikteki etkilerinden farklı olabileceği ileri sürülmüştür (Wang vd., 2001). Ayrıca, mısır ve buğday bitkilerinde strese cevap olarak zeatin ve zeatin ribositin biriktiği (Setter vd., 2001) ve su stresi şartları altında kavunda sitokin ve giberellik asit (GA) seviyesinin azaldığı da kaydedilmiştir (Hosoki vd., 1987).

1.13. Kuraklık stresinin mRNA Üzerine Etkisi

Su stresi bitki hücrelerinde transkripsiyonel seviyede bazı değişimlere ve yeni protein ve mRNA'ların sentezine neden olur (Yordanov vd., 2000). Örneğin, çoğu hücrede sıcaklık şokuna karşı oluşan cevap, transkripsiyonel seviyede düzenlenir ve fazla miktarda biriken ve fonksiyonu bilinmeyen bazı RNA'lar sentezlenir ve böylece sıcak şok proteinlerini kodlayan mesajlar 10-1000 kat artar. Yüksek sıcaklıklarda spesifik sıcak şok mRNA'larının birikmesi, soya fasulyesi fidelerinin maruz kaldığı sıcak şokuna karşı koruyucu bir etkiye sahiptir (Schlesinger vd., 1982). Diğer taraftan, düşük sıcaklığın, soğuğa toleranslı bir bitki olan *Arabidopsis thaliana*'da alkol dehidrogenaz mRNA'sının birikimine neden olduğu bulunmuştur (Jarillo vd., 1993). Sıcaklık stresi yanı sıra diğer pek çok stres durumunda da RNA seviyelerinde değişim meydana gelebilir. Örneğin antioksidant enzimlerin genlerine karşılık gelen mRNA'lar kuraklık stresi tarafından uyarılır (Reddy vd., 2004). Ayrıca, kuraklık stresi altındaki bezelye bitkisindeki peroksidaz ve SOD enzimlerine ait mRNA'ların üretimini arttırdığı belirlenmiştir (Yordanov vd., 2000). Kuraklık devam ederken *Arabidopsis thaliana*'nın kuraklık tarafından uyarılan AtDi19 geninin mRNA seviyesi artmıştır (Gosti vd., 1995). Ozonla muamele edilmiş bitkilerde ise

23 ve 18.5 kDa ağırlığındaki polipeptidlerin mRNA'ları azalırken, 38 kDa ağırlığındaki polipeptidlerin mRNA'ları artmıştır (Kirtikara ve Talbot, 1996). Yine, *Raphanus sativus* yapraklarında tuz stresine cevap olarak 22 kDa ağırlığındaki proteinler ve bu proteinlerin mRNA'ları birikmiştir (Lopez vd., 1994). Buğdayda dehidrasyon stresi tarafından farklı bir sekans grubuna sahip LEA (II) mRNA'ları uyarılmıştır (Curry ve Walker-Simmons, 1993). Bununla beraber bazı mRNA seviyelerinde stres esnasında azalmaların olduğu da kaydedilmiştir. Örneğin mısır bitkileri yedi gün kuraklığa maruz bırakıldığında nitrat redüktaz mRNA'sı sulanmış bitkilere nazaran % 80 azalmıştır. Bununla beraber aynı bitkide sakkaroz fosfat sentaz ve fosfoenol pirüvat karboksilaz transkriptleri daha az etkilenmiştir (Foyer vd., 1998).

1.14. Marantaceae Familyasının ve *Ctenanthe* Cinsinin Genel Özellikleri

Marantaceae familyası üyeleri tropik bölgelerde yaklaşık 30 cinsi bulunan otsu, çok yıllık ve rizomlu bitkilerdir. Çoğu tropik Amerika, birkaç türü ise tropik Asya ve Afrika'da yayılış gösterir. Çoğu sera ve süs bitkisidir. Yaprakları 2 sıra halinde dizilmiş olup, petiyolün kaidesinde dar veya geniş olabilen bir kın mevcuttur. Yaprak ayasında orta damardan çıkan damarlar birbirine paraleldir (Heywood, 1978). Petiyolün yaprak ayasıyla birleştiği yerde pulvinus adı verilen hücrelerin yer aldığı şişkin bir kısım bulunur ve bu motor hücreler yaprağın hareketinde rol oynarlar (Zeybek, 1994).

Marantaceae familyasının bir üyesi olan *Ctenanthe*, her dem yeşil taksonları olan bir cins olup, çalimsı ve çok yıllık bitkilerdir. Dekoratif yaprakları için yetiştirilirler (Brickell, 1989). Anavatanı tropikal Brezilya'dır. *Calathea* ve *Maranta* cinsleri ile yakın ilişkisi vardır ve bazen *Phrynium* adıyla da bilinirler (URL-3). Soğuğa hassastırlar ve minimum 15 °C'de yaşayabilirler. Nemli ortamları, yarı gölgeli alanları ve iyi drenajlı toprakları tercih ederler. Üretilmesi ilk baharda rizomlardan bölünerek yapılır (Brickell, 1989). *C. pilosa*, *C. setosa*, *C. amabilis* gibi bazı türlerinde nektar salgısı görülür (Kirchoff ve Kennedy, 1985).

Ctenanthe setosa, tropikal, çok yıllık otçul bitkilerin küçük bir familyasının üyesi olup, sera ve evlerde süs bitkisi olarak kullanılır (Heywood, 1978). Bitkiler yaklaşık bir metre boyunda olabilir ve yeşil yapraklara sahiptirler (URL-3). Bu bitkilerin kuraklığa ve

hava sıcaklığının artmasına cevap olarak yapraklarını rulo şeklinde kıvrırma yeteneğinde oldukları belirlenmiştir (Turgut ve Kadioğlu, 1998).



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitkilerin Büyütülmesi

Ctenanthe setosa (Rosc.) Eichler (Marantaceae) fideleri toprak ve kum içeren (5:1) plastik saksılara (yükseklik 14 cm, üst çapı 16 cm ve alt çapı 11 cm) vejetatif olarak dikildikten sonra yaşlı ve solmuş yapraklar kesildi. Bitkilerin 22-25 °C'de, laboratuvar koşullarında (yaklaşık 250-300 μmol (foton) $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda) büyümeleri sağlandı. Daha sonra kontrol bitkileri gün aşırı sulanırken, yapraklarını kıvrırması amacıyla diğer gruptaki bitkiler 64 gün kuraklık periyoduna maruz bırakıldı. Kontrol bitkileri de dahil olmak üzere kuraklık periyodunun 32, 40, 48, 56 ve 64. günlerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca bitkilerin yaprak, petiyol (yaprak sapı) ve köklerinden örnekler alınarak biyokimyasal analizler yapıldı.

2.2. Yaprak Kıvrılma Derecesinin Ölçülmesi

Yaprak kıvrılma derecesi Premachandra vd. (1993)'ne göre belirlendi. Yaprakların kıvrılmasından önce ve sonra orta kısımlarının eni ölçüldü. Yaprak kıvrılma derecesi, kıvrılma sonucunda yaprak enindeki % azalma olarak ifade edildi.

2.3. Nispi Su İçeriği Tayini

Nispi su içeriği tayini Castillo (1996)'a göre yapıldı. Bitkilerin yaprak ve petiyollerinin taze ağırlıkları ölçüldükten sonra gece boyunca suda bekletilerek turgid ağırlıkları alındı. Daha sonra 80 °C'ye ayarlı fırında bekletilerek kuru ağırlıkları kaydedildi ve aşağıdaki formülde yerine koyularak nispi su içerikleri (NSİ) belirlendi.

$$\text{Nispi Su İçeriği (\%)} = (\text{Taze ağırlık} - \text{Kuru ağırlık} / \text{Turgid ağırlık} - \text{Kuru ağırlık}) \times 100$$

2.4. Kök : Sürgün Oranının Belirlenmesi

Kuraklık periyodu esnasında artan yaprak kıvrılma derecesine paralel olarak kök:sürgün oranı Champoux vd. (1995)'e göre belirlendi. Kökler ve sürgünler kesilerek 80 °C'ye ayarlı etüvde 48 saat tutuldu ve böylece kuru ağırlık değerleri kaydedildi. Köklerin kuru ağırlığının sürgünlerin kuru ağırlığına bölünmesi sonucunda kök:sürgün oranı hesaplandı.

2. 5. Klorofil ve Karotenoid Tayini

Yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca bitki yapraklarından 0,1 g alınarak 5 ml % 80'lik aseton içerisinde homojenize edildi. Homojenat 3000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Elde edilen pigment ekstraktlarının 645, 663 ve 450 nm'lerdeki absorbansları spektrofotometrede okunup absorbans değerleri aşağıdaki formüllerde yerine konarak klorofil a, klorofil b, toplam klorofil Arnon (1949)'a ve toplam karotenoid miktarları Jaspars (1965)'a göre belirlendi. Daha sonra klorofil a/ b oranları hesaplandı.

$$\text{Klorofil a (mg/l)} : 12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}$$

$$\text{Klorofil b (mg/l)} : 22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}$$

$$\text{Toplam klorofil (mg/l)} : 20,2 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}$$

$$\text{Toplam karotenoid (mg/l)} : 4,07 \times A_{450} - (0,0435 \times \text{Kl a} + 0,367 \times \text{Kl b})$$

Elde edilen veriler g taze ağırlık başına mg pigment olarak ifade edildi.

2.5.1. Klorofil Kararlılık (Stabilite) İndeksi (KKİ) Tayini

Klorofil kararlılık indeksi tayini Sairam vd. (1997)'e göre aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{KKİ} = (\text{stres şartlarındaki toplam klorofil/kontrol şartlarındaki toplam klorofil}) \times 100$$

2.6. Lipid Peroksidasyonu Tayini

Kontrol ve kuraklık periyoduna maruz bırakılan bitkilerin yaprak, petiyol ve köklerinden kıvrılma artışı boyunca numuneler alındı. Lipid peroksidasyon seviyesi, lipid

peroksidasyonun bir ürünü olan malondialdehid içeriğine dayanarak Heath ve Packer (1968), metodunu takiben ölçüldü. Her bir numuneden 0,5 g alınarak 10 ml % 0,1 trikloroasetik asit (TCA) içerisinde homojenize edildi. Homojenat 15 000Xg de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatantın 1 ml'sine 4 ml, % 20 TCA içerisinde hazırlanmış % 0,5 tiobarbiturik asit (TBA) ilave edildi. Karışım 95 °C'de 30 dk. ısıtıldı ve sonra hızlı bir şekilde buz banyosunda soğutuldu. 10 000Xg de 10 dk. santrifüjden sonra süpernatantın absorbansı 532 nm de kaydedildi. 600 nm de spesifik olmayan absorpsiyon için okunan değer hesaptan çıkarıldı. Elde edilen sonuç aşağıdaki formülde yerine konularak malondialdehit (MDA) konsantrasyonu hesaplandı.

$$A = E.c.l$$

(A: $A_{532}-A_{600}$, E: Absorpsiyon katsayısı, $155 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, c: MDA konsantrasyonu)

Sonuçlar g taze ağırlık başına nmol olarak verildi.

2.7. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini

2.7.1. Enzim Ekstraktının Hazırlanması

Ctenanthe setosa fidelerinin yaprak, petiyol ve köklerinden yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca 1'er g alınarak sıvı azot içerisinde toz haline getirildi. 5 ml soğuk ekstraksiyon tamponunda (50 mM fosfat tamponu pH 7, 1mM EDTA, % 0,05 Triton, % 2 polivinylpolypyrrolidone ve 1 mM askorbik asit) buz içerisinde homojenize edildi. Homojenat iki katlı tülbent bezinden süzöldükten sonra soğutmalı santrifüjde 20 000X g'de 20 dk. santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant enzim denemeleri için kullanıldı.

2.7.2. Enzim Aktivitesinin Tayini

SOD aktivitesi Beauchamp ve Fridovich (1971) metodunun Dhindsa ve Matowe (1981) tarafından geliştirilen yöntemi ile belirlendi. Bu metotta aktivite, indikatör molekül olarak kullanılan nitro blue tetrazolium (NBT)' un süperoksit radikalleri ile mavi renkli bir formazona indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin ölçülmesiyle tayin edildi. Bu reaksiyonun % 50'sinin inhibisyonuna uygun süpernatant hacmi 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi.

Aktivite tayini için 50 mM fosfat tamponu (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 13 mM metionin, 75 µM NBT ve 2 µM ribofilavin içeren karışıma 70 µl enzim ekstraktı ilave edildi. Ribofilavin en son koyuldu ve tüplerin floresans lamba altına yerleştirilmesiyle reaksiyon başlatıldı. Işık kaynağının 10 dk. sonra uzaklaştırılmasıyla reaksiyon sonlandırıldı ve oluşan reaksiyon ürünü 560 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. SOD aktivitesi, g taze ağırlık başına ünite enzim olarak ifade edildi.

2.8. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi Tayini

Glutasyon redüktaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Foyer ve Halliwell (1976)'e göre SOD enzimi için hazırlanan ekstraktın kullanılmasıyla tayin edildi. Substrat olarak 0,25 mM NADPH ve 1 mM oksitlenmiş glutasyon (GSSG) kullanıldı.

Oksitlenmiş glutasyonun enzim tarafından indirgenmesi için, indirgeyici faktör olarak NADPH kullanıldı. Aktivite tayini için 200 µl 0,5 mM EDTA içerisinde hazırlanmış 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 250 µl GSSG ve 500 µl NADPH ihtiva eden karışıma 50 µl enzim ekstraktı ilave edildi. NADPH'in oksidasyonu 340 nm'de 5 dakika boyunca azalmanın ölçülmesiyle belirlendi. GR aktivitesi mU/ml olarak ifade edildi.

2. 9. Peroksidaz Aktivitesi Tayini

2. 9. 1. Enzim Ekstraktının Hazırlanması

Yaprak, petiyol ve kökten kıvrılma boyunca alınan numuneler g yaprak dokusu başına 10 ml olacak şekilde 0,2 M soğuk sodyum fosfat tamponunda (pH 7) buz üzerinde homojenize edildi. +4 °C'de 20 000Xg'de 20 dk. santrifüj edildi. Süpernatantın bir kısmı çözünebilir protein miktarının belirlenmesi için alındı. Geri kalan kısmı ise enzim aktivitesinin tayini için kullanıldı.

2. 9. 2. Enzim Aktivitesinin Tayini

Peroksidaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Rodriguez ve Sanchez (1982)'in tanımladığı gibi Van Lelyveld ve Pretorius (1973)'un metodunun biraz değiştirilmesiyle ölçüldü. Substrat olarak 40 mM guaiacol ve 26 mM H₂O₂ çözeltileri kullanıldı.

İçerisine 1 ml guaiacol, 0,5 ml H₂O₂ ve 1,4 ml 0,05 M fosfat-sitrat tamponu (pH 4,6) koyulan tüp 25 °C'ye ayarlı su banyosunda 15 dk. bekletildi. Tüp içerisindeki karışım spektrofotometre küvetine dökülerek üzerine 50 µl enzim numunesinden ilave edildi. Daha sonra 420 nm dalga boyunda meydana gelen absorbans değişimi 2 dk. boyunca okundu. Enzim aktivitesi $A_{420}/dk./g$ kuru ağırlık cinsinden ifade edildi.

2.9.3. Poliakrilamid Jel Elektrofrez ile Peroksidaz İzoenzimlerinin Belirlenmesi

Liu (1973) tarafından tanımlanan poliakrilamid jel elektrofrez ile peroksidaz izoenzimleri belirlendi. Elektrofrez çalışmalarında enzim kaynağı olarak -20 °C'de dondurularak saklanan kontrol ve % 19, 36, 55 ve 72 kıvrılma derecelerine ait bitkilerin peroksidaz enzim ekstraktları kullanıldı. Yığıma jeli için % 5'lik, ayırma jeli için % 8'lik akrilamid hazırlandı. Yığıma jelinin hazırlanması için 3,4 ml saf su, 0,83 ml % 30'luk akrilamid, 0,63 ml 1 M Tris HCl (pH 6,8), 0,05 ml taze hazırlanmış % 10'luk amonyum persülfat ve 0,005 ml TEMED (N,N,N,N-tetrametil etilen diamin) ilave edilerek karıştırıldı. Ayırma jeli için ise 9,3 ml saf su, 5,3 ml % 30'luk akrilamid, 5 ml 1,5 M Tris HCl (pH 8,8), 0,2 ml taze hazırlanmış % 10'luk amonyum persülfat ve 0,012 ml TEMED kullanıldı. Numuneler % 50 gliserol ve % 0,1'lik bromofenol boyası ve 1 M Tris (pH 6,8) içerisinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı ve Hamilton marka bir enjektörle jele uygulandı. Yürütme tamponu (14,4 g glisin ve 3 g Tris, 1 litre, pH 8.3) kullanılarak +4 °C'de 20 mA akımda 4-6 saat yürütüldü. Elektrofrez sonucu dikkatli bir şekilde çıkarılan jel, benzidin (0,1 g benzidin/100 ml 0,2 M sodyum asetat tamponu, pH 5) ve H₂O₂ substratları ile hazırlanan çözelti (2,5 ml % 3'lük H₂O₂/100 ml benzidin çözeltisi) içerisinde, 35 °C'de 1 saat bekletildikten sonra % 30'luk etil alkolde muhafaza edildi. Daha sonra bilgisayarda jelin görüntüsü çıkarılıp izoenzim bantlarının yerleri ölçüldü ve Rf değerleri hesaplandı.

2.10. Nitrat Redüktaz Aktivitesi Tayini

Nitrat redüktaz (NR) aktivitesi Yandow ve Klein (1986) tarafından tanımlanan metoda göre ölçüldü. Standart hazırlamak için KNO_2 kullanıldı. Bunun için içerisinde 0, 10, 20, 40, 60, ve 100 μM KNO_2 bulunan çözeltilerden 1 ml alınarak üzerine 1 ml 2N HCl içinde hazırlanmış % 1'lik sülfanilik asit ve 1 ml % 0.02'lik n-Naftiletilediamin hidroklorid (NED) ilave edildi. 20 dk. sonra 540 nm'de absorbans değerleri okundu ve bu absorbanslara karşılık gelen $\mu\text{mol NO}_2$ değerleri spektrofotometreye bağlı bilgisayar ünitesine girilerek standart bir grafik oluşturuldu.

Yaprak, petiyol ve kök kısımlarından artan yaprak kıvrılma derecesine göre numuneler alınarak nitrat redüktaz aktiviteleri ölçüldü. Numunelerden 0,1-0,2 g alınarak 1x1 mm olacak şekilde kesildi. 20 ml'lik şırınga içine koyularak üzerine 5 ml NR aktivitesi inkübasyon tamponundan (0,1 M KH_2PO_4 tamponu pH 7,6, 0,1 M KNO_3 , % 1 propanol) ilave edildi ve piston aşağı yukarı hareket ettirilerek numunelerin havası alındı. Bitki materyalleri dibe çöktükten sonra 1 saat karanlıkta bekletildi. Her bir numuneden 1 ml alınarak üzerine 1 ml % 1'lik sülfanilik asit ve 1 ml % 0.02'lik NED ilave edildi. Tüpler 20 dk. bekletildikten sonra 540 nm dalga boyunda standart grafikten okunan NO_2 miktarları alındı. Elde edilen veriler saat ve kuru ağırlık başına $\mu\text{mol NO}_2^-$ olarak ifade edildi.

2.11. Yüksek performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Yapraklardaki İçsel Hormon Miktarlarının Belirlenmesi

HPLC için bitki hormonlarının ekstraksiyonu ve saflaştırılması Kuraishi vd. (1991)'nin tanımladığı metodun biraz değiştirilmesi ile yapıldı. Kuraklık periyodu esnasında yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca yaprak numunelerinden 2 g alınarak sıvı azotta toz haline getirildi ve üzerine -40 °C'de bekletilen % 80'lik metanol ilave edilerek 10 dk. ultra doku parçalayıcıda (Ultrasonic Processor, Jenway LTD) homojenize edildi. Homojenat karanlıkta $+4$ °C'de 24 saat bekletildikten sonra Whatman no. 1 filtre kağıdından süzüldü. Daha sonra süzüntü kısmı alındı ve kalan parçalar tekrar aynı işleme tabi tutuldu. Elde edilen süzüntüler birleştirilerek 0,45 μm 'lik PTFE filtrelerinden geçirildi (Cutting, 1991). Daha sonra evaporatörde 35 °C'de kurutuldu. Kurutulmuş ekstraktlar 100 ML^{-1} KH_2PO_4 tamponunda (pH 8) tekrar çözüldü ve $+4$ °C'de $10.000 \times \text{g}$ 'de 1 saat santrifüj edildi. Süpernatant alınarak üzerine 1 g polivinilpolipirrolidon (PVPP) ilave edildikten

sonra iyice karıştırıldı ve Sep-Pak C₁₈ (Waters) kartuşlarından geçirildi (Machackova vd., 1993). Kartuşlarda kalan hormonlar % 80'lik metanolde çözülerek küçük şişelere koyuldu ve analiz işlemleri için HPLC (Shimadzu, LC-10 AD)'ye enjekte edildi. HPLC analiz işlemlerinde mobil faz olarak % 11,5'lik asetonitril (pH 5,5) ve 40 mM'lık trietil amonyum asetat (TEAA) tamponu kullanıldı. Akış hızı, basınç ve dalga boyu sırasıyla 2 ml. Dak.⁻¹, 2000 psi ve 265 nm olarak seçildi ve ultraviyole dedektör kullanıldı (Horgan ve Kramers, 1979; Taylor vd., 1984).

2. 12. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu EZ-RNA (Biol. Indust.) Toplam RNA İzolasyon kiti kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. Kontrol bitkileri ile % 55 (orta stresli) ve 79 (şiddetli stresli) kıvrılma derecesine sahip olan bitkilerin yapraklarından 0.1g numune alınarak sıvı azot içerisinde önceden DEPC'li saf suda 30 dk. bekletilmiş olan havan içerisinde öğütülerek toz haline getirildi. Üzerine 0,5 ml Denatürasyon solüsyonu (solüsyon A) ilave edilerek homojenize edildi. 5 dak. oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonra 0,5 ml Ekstraksiyon solüsyonu (solüsyon B) ilave edildi. 15 saniye elle güçlü bir şekilde sallayarak karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edildi. 12.000Xg de +4 °C'de 15 dk. santrifüj edildi. Sıvı, renksiz (üst) faz temiz bir tüpe alındı. Üzerine 0,5 ml soğuk izopropanol ile ilave edilip nazikçe karıştırarak sulu fazdan RNA dibe çöktürüldü. 25-30 dk. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12.000Xg de +4 °C'de 8 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak RNA pelleti 1 ml % 75'lik etanol ile yıkandı. Sonra 7500Xg de +4 °C'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet 5-10 dk. hava ile kurutuldu ve 70 µl nükleaz içermeyen suda çözüldü.

2.12. 1. RNA Miktarı Tayini

İzole edilen RNA'ların miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi. RNA numunelerinden 10 µl alınarak üzerine 990 µl steril DEPC'li saf su ilave edilerek 100 kat sulandırıldı. Absorbanslar 260 ve 280 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Agilent 8453 E) okunduktan sonra aşağıdaki formülde yerine konularak RNA miktarı hesaplandı.

$$\text{RNA miktarı } (\mu\text{g}/1000 \mu\text{l}) = A_{260} \times 50 \times 100$$

Buradan elde edilen değerler “ $\mu\text{g RNA/mg doku}$ ” olarak ifade edildi.

2.12. 2. Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen RNA'lar diethyl pyrocarbonate (DEPC)'lı saf su kullanılarak hazırlanmış 1X Tris - Asetik asit - Ethylenediamine tetra asetik asit (TAE) tamponu içinde, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ etidyum bromür ihtiva eden % 1,4'lük agaroz jelde yürütüldükten sonra BioDocAnalyze sistemiyle görüntüledi.

2.13. İstatistik Analizler

Üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilen ekstraksiyon ve analizlerin sonucunda elde edilen verilerin varyans analizi Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows 9.0) paket programı içerisinde yer alan Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre belirlendi.

2.14. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu Genomik DNA İzolasyon Kiti (Fermantas) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. Yapraklardan uygun miktarda alınarak sıvı azot içerisinde toz haline getirildi. Üzerine 400 μl lizis çözeltisi ilave edilerek 65 °C'de 10 dak tutuldu. Üzerine 600 μl kloroform ilave edildikten sonra birkaç kez nazikçe karıştırıldı ve 10.000X rpm'de 2 dak. santrifüj edildi. DNA içeren üst faz yeni bir tüpe alındı ve üzerine 800 μl çöktürme çözeltisi ilave edildi. Oda sıcaklığında 1-2 dak. karıştırıldıktan sonra 10.000X rpm'de 2 dak. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra DNA pelleti 100 μl 1,2 M NaCl içerisinde çözüldü. Üzerine 300 μl soğuk etanol ilave edildi ve 10 dak. – 20 °C'de çöktürüldükten sonra 10.000X rpm'de 3-4 dak. santrifüj edildi. Etanol döküldü ve pellet % 70 soğuk etanol ile yıkandı. DNA 100 μl steril saf suda çözüldü. DNA'lar % 0,7'lik 0,5 $\mu\text{g/ml}$ etidyum bromür içeren agaroz jelde yürütüldü ve BioDocAnalyze sistemi kullanılarak görüntüledi.

2.15. PCR Reaksiyonu ile 18S rRNA Bölgesinin ve Ip3 Gen Parçasının Çoğaltılması ve pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

Genomik DNA kalıp olarak kullanılarak PCR gerçekleştirildi. *Pinus taeda* L.'da belirlenmiş (Padmanabhan vd., 1997) 18S rRNA ile Ip3 genleri esas alınarak 2 çift dejenerat primer kombinasyonları dizayn edildi. Bu primerlerin sıraları aşağıdaki gösterildiği gibidir:

Pt18SrRNAB1 primeri : 5'-ACC AgA CAA ATC gCT CCA CC-3'

Pt18SrRNAF1 primeri : 5'-ggT gAC ggA gAA TTA ggg TTC-3'

RTL3B1 primeri : 5' ggT ggT gAT gCT TTT TgC CC-3'

RTL3F1 primeri : 5' CAC CAC CAC AAg gAA gAT g-3'

PCR reaksiyonu, 200 µl ince duvarlı PCR tüpleri içerisinde 25 µl'lik son hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı 1X PCR tamponu, 200 µM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, her primerden 5 pmol, 10-40 ng kalıp genomik DNA ve 1 U *Taq* DNA polimeraz içerecek şekilde hazırlandı. Reaksiyon Biometra Personal Cycler PCR cihazı kullanılarak 95 °C'de 2 dak.'lık ilk denatürasyon basamağından sonra 40 döngü 94 °C'de 1,5 dak. denatürasyon, 50 °C'de 1,5 dak. bağlanma ve 72 °C'de 2 dak. uzamadan sonra son olarak 72 °C'de 5 dak. olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidiyum bromür ihtiva eden % 1,4'lük agaroz jelde yürütülerek BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

PCR reaksiyonu ile çoğaltılan parçalar, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı. Elde edilen PCR ürününden 3 µl alınarak 5 µl 2X bağlanma tamponu, 1 µl pGEM-T Easy klonlama vektörü, ve 1 µl T4 DNA ligaz enzimi son hacim 10 µl olacak şekilde hazırlandı. Karışım 16 °C'de 1 gece inkübe edildi.

Elde edilen bağlanma karışımından 3 µl alınarak 200 µl JM101 *E. coli* hücreleri ile karıştırıldı. 30 dak. buz üzerinde bekletildi. 45 °C'lik su banyosunda 2 dak. tutularak hücrelere şok uygulandı. Üzerine 200 µl Luria Bertani (LB) besiyerisi koyuldu ve 2 saat 37 °C'lik etüvde bekletildi. LB agar besiyerisinden ılıkken 30 ml alınarak 60 µl ampisilin ilave edildi ve petri kaplarına döküldü. Besiyeri donduktan sonra petriye 20 µl IPTG ve 20 µl X-gal yayma ekim yöntemiyle aktarıldı. Etüvden alınan dibe çökmüş hücrelerin üst fazı alınarak atıldı. Altta kalan hücreler petriye aktarılarak yayma ekim yapıp, kurutuldu. Daha sonra hücreler, 37 °C'lik etüvde 1 gece bekletilerek büyütüldü. Ertesi gün besiyeri

üzerinde oluşan beyaz kolonilerden içerisinde 3 ml ampisilinli LB besiyerisi bulunan 10 ml'lik kültür tüplerine alınarak gece kültürü yapıldı.

PCR reaksiyonu ile çoğaltılan parçaların pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlanıp klonlanmadığını tespit etmek için elde edilen beyaz kolonilerin plazmit DNA'ları izole edildi ve *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Doğruluğu teyit edilen klonların baz dizin analizi gerçekleştirildi. Elde edilen DNA baz dizileri gen bankasında var olan dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları belirlendi. Lp3 genine ait primerler kullanılarak elde edilen baz sırasının ise olası amino asit sıraları belirlenerek gen bankasında kayıtlı protein ve transkriptlerle karşılaştırılması yapıldı.



3. BULGULAR

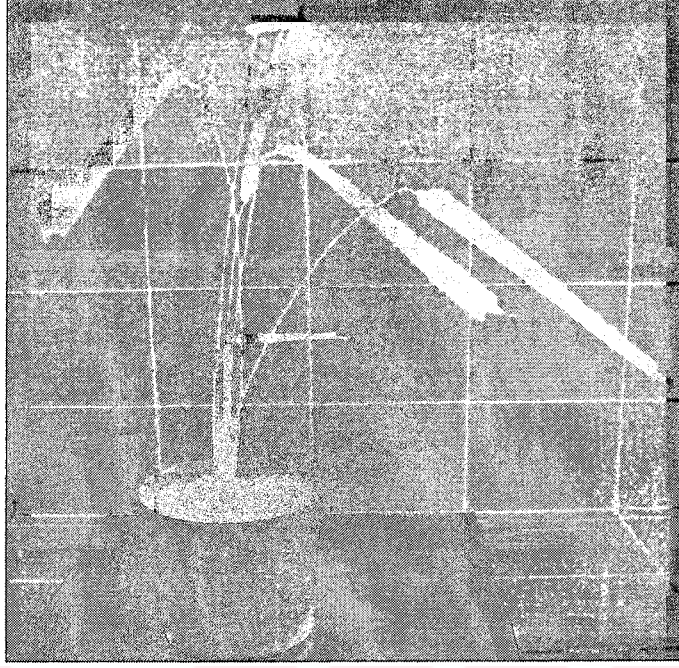
3.1. Kuraklığın Yaprak Kıvrılma Derecesi, Kök:Sürgün Oranı ve Nispi Su İçeriği Üzerine Etkisi

Ctenanthe setosa bitkileri, laboratuvar şartlarında 32, 40, 48, 56 ve 64 gün kuraklık periyoduna maruz bırakıldığında yapraklarını kıvrıdıkları gözlemlendi. Gün aşırı sulanan kontrol bitkilerinin normal görünüşlü (yaprakların yere paralel) olduğu, kuraklık periyoduna maruz bırakılmış bitkilerin (stresli) ise yapraklarını silindir şeklinde kıvrıldığı gözlemlendi.

Normal görünüşlü ve kıvrılmış durumdaki yapraklar Şekil 2 ve Şekil 3'te görülmektedir.



Şekil 2. Gün aşırı sulanmış *Ctenanthe setosa*'nın kontrol bitkisi



Şekil 3. Kuraklık periyodunun 64. gününde % 79 yaprak kıvrılma derecesine sahip *Ctenanthe setosa* bitkisi

Kuraklığa maruz bırakılan bitkilerde, kuraklık periyodunun artmasına paralel olarak hem yaprak hem de petiyollerin nispi su içeriğinin (NSİ) azaldığı kaydedildi. Kontrol yapraklarında % 94 olan NSİ'nin kuraklık periyodu sonunda % 78, petiyollerde ise yapraklardan daha fazla azalarak % 67 değerine ulaştığı belirlendi. Diğer taraftan kuraklık periyodu esnasında yaprak kıvrılma derecesi ve kök:sürgün oranının istatistiki bakımdan önemli ($P>0,05$) derecede arttığı tespit edildi. Kuraklık periyodunun 64. gününde yaprak kıvrılma derecesinin % 79' a kadar çıktığı, benzer şekilde kontrolde 0,83 olarak tespit edilen kök:sürgün oranının da aynı periyot sonunda 2,67'e ulaştığı görüldü (Tablo 2).

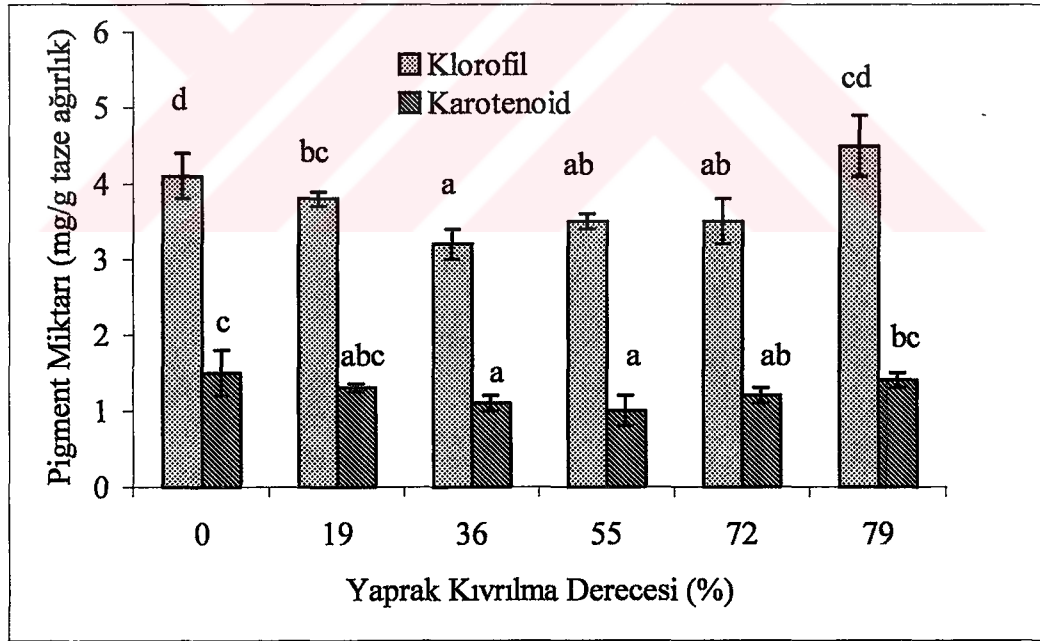
Tablo 2. Kuraklığa maruz bırakılmış *C. setosa*'da yaprak kıvrılma derecesi, kök : sürgün oranı ve nispi su içeriği (%)^a

Kuraklık Periyodu (gün)	Yaprak Kıvrılma Derecesi (%)		Kök: Sürgün Oranı	Nispi su içeriği (%)			
				Yaprak		Petiyol	
0	0	a	0,83 ± 0,03* a	94 ± 2 d		94 ± 2 c	
32	19 ± 8	b	0,78 ± 0,02 a	89 ± 0,5 c		92 ± 2 c	
40	36 ± 4	c	1,16 ± 0,25 b	87 ± 1 c		84 ± 4 b	
48	55 ± 11	d	1,60 ± 0,04 c	83 ± 2 b		72 ± 3 a	
56	72 ± 10	e	1,84 ± 0,11 c	79 ± 1 a		69 ± 3 a	
64	79 ± 12	e	2,67 ± 0,19 d	78 ± 2 a		67 ± 4,5 a	

^aÜç tekerrürün ortalaması. *Üç tekerrürlü ortalamaların standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir (P>0,05), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

3.2. Yaprak Kıvrılmasının Fotosentetik Pigment Miktarları Üzerine Etkisi

C. setosa'nın yaprak kıvrılma derecesinin (%) artmasına paralel olarak klorofil ve karotenoid miktarlarında meydana gelen değişiklikler Şekil 4'te gösterildi.



Şekil 4. *C. setosa*'da yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca toplam klorofil ve karotenoid miktarlarındaki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 (P>0,05) seviyesinde önemsizdir)

Kuraklık periyodunun uzamasına paralel olarak yaprak kıvrılma derecesi artarken klorofil miktarının önce istatistiki bakımdan önemli ($P>0,05$) derecede azaldığı, daha sonra ise arttığı belirlendi. Kontrol bitkilerinde g taze ağırlık başına 4,1 mg olarak tespit edilen klorofil miktarının % 36 yaprak kıvrılma derecesinde 3,2 mg'a kadar düştüğü görüldü. Kıvrılma derecesi % 55'e çıktığında bu değer artarak 3,5 mg'a kadar yükseldiği, % 79 kıvrılma derecesinde ise daha da artarak yaklaşık olarak kontrol ile aynı değere ulaştığı kaydedildi (Şekil 4).

Kıvrılma derecesinin artmasına paralel olarak karotenoid miktarında da önce istatistiki bakımdan önemli bir ($P>0,05$) azalma daha sonra ise artış bulundu. Kontrolde 1,5 mg olarak tespit edilen karotenoid miktarının % 19 oranında kıvrılan yapraklarda ise 1,3 mg'a düştüğü belirlendi. Bununla beraber bu azalışın istatistiki bakımdan önemli olmadığı görüldü. % 36 yaprak kıvrılma derecesinde ise 1,1 mg'a gerileyen karotenoid miktarının istatistiki bakımdan önemli olduğu kaydedildi. Ayrıca, klorofil miktarından farklı olarak karotenoid miktarının % 55 yaprak kıvrılma derecesine kadar azaldığı daha sonra da artarak % 72 kıvrılma derecesinde 1,2 mg, % 79 derecede de kontrole yaklaşarak 1,4 mg'a çıktığı belirlendi (Şekil 4).

Kuraklığa maruz bırakılmış *C. setosa*'da yaprak kıvrılma derecesinin artışına paralel olarak klorofil a/b oranı ile klorofil kararlılık indeksi (KKİ)'nde (Tablo 3) meydana gelen değişiklikler de araştırıldı.

Tablo 3. *C. setosa*'da yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca klorofil a/b oranı ve klorofil kararlılık indeksleri (%)^a

Kıvrılma Derecesi (%)	Klorofil a/b Oranı	Klorofil Kararlılık İndeksi (%)
0	2,4 ± 0,1 * bc	-
19	2,2 ± 0,2 bc	84,72 ± 5,5 bc
36	1,9 ± 0,2 a	71,36 ± 6,4 a
55	2,1 ± 0,1 b	77,27 ± 4,9 ab
72	2,3 ± 0,1 bc	78,49 ± 0,6 ab
79	2,5 ± 0,2 c	91,24 ± 4,1 c

^aÜç tekerrürün ortalaması. *Üç tekerrürlü ortalamaların standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P>0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

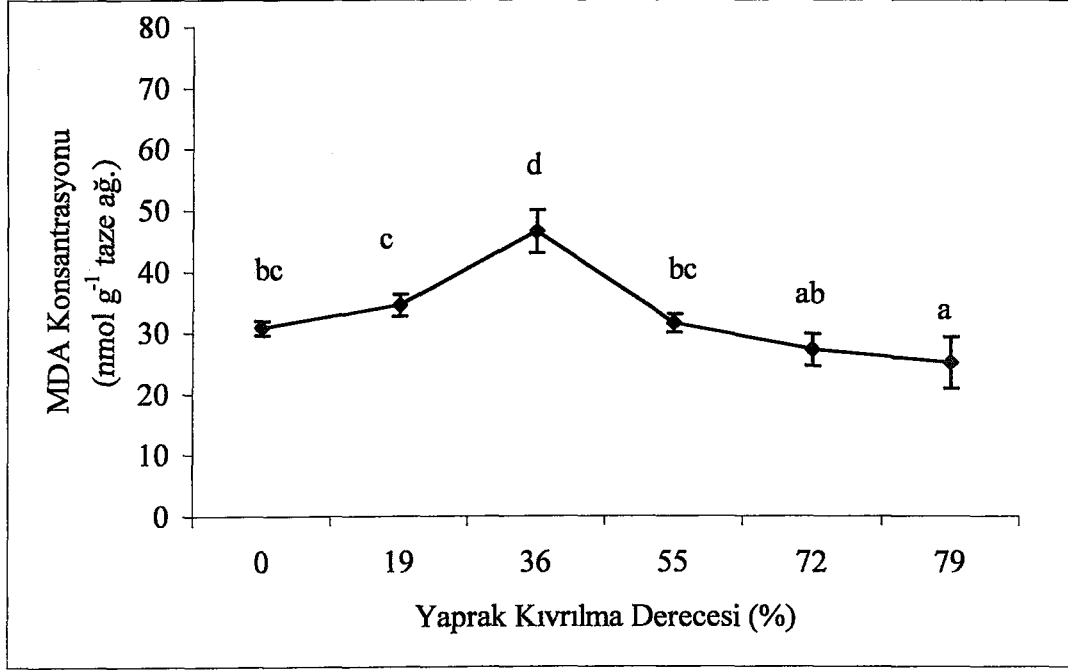
Kontrol bitkilerinde 2,4 olan kl a/b oranı, % 19 yaprak kıvrılma derecesinde 2,2 olarak ölçülmesine rağmen bu azalmanın istatistiki olarak önemli olmadığı görüldü. Bununla beraber kontrole kıyaslandığında, % 36 kıvrılmada gözlenen azalmanın istatistiki

bakımdan önemli ($P>0,05$) olduğu belirlendi. % 55 yaprak kıvrılma derecesinde ise bu oranın klorofil ve karotenoid miktarında olduğu gibi istatistiki bakımdan önemli derecede arttığı bulundu. Daha sonraki yaprak kıvrılma derecelerinde de klorofil a/b oranlarının artmaya devam ettiği ve % 79 kıvrılma derecesinde kontrol ile aynı seviyeye ulaştığı kaydedildi (Tablo 3).

Yaprak kıvrılma derecesinin artışı esnasında bitkilerin strese tolerans yeteneğinin bir işareti olan klorofil kararlılık indeksi (%) de hesaplandı. Kıvrılmanın az olduğu % 19 kıvrılma derecesinde 84,72 olarak tespit edilen KKI değerinin % 36 yaprak kıvrılma derecesine kadar istatistiki bakımdan önemli ($P>0,05$) derecede azaldığı, % 55 ve % 72 kıvrılma derecesinde ise arttığı görüldü. Bununla beraber bu artışın istatistiki bakımdan % 36 kıvrılma derecesine göre istatistiki bakımdan önemli olmadığı belirlendi. Yaprak kıvrılma derecesi % 79'a çıktığında ise 91,24 olarak ölçülen artışın önceki kıvrımlara göre istatistiki bakımdan önemli olduğu kaydedildi (Tablo 3).

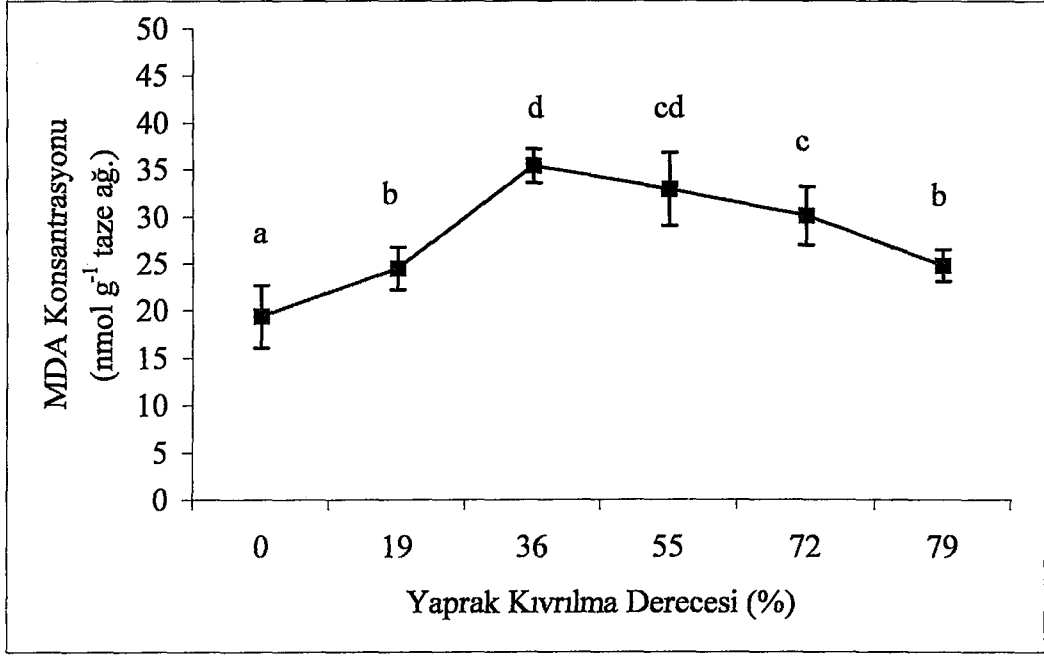
3.3. Yaprak Kıvrılmasının Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkisi

Yaprak kıvrılma derecesinin artışı esnasında klorofil ve karotenoid miktarında önce azalma sonra artış meydana gelmesine karşın, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit içeriğinin önce arttığı sonra ise azaldığı tespit edildi (Şekil 5-7). Yapraklarda yapılan analizlerde kontrol bitkilerinde 30,8 nmol g⁻¹ taze ağırlık olarak hesaplanan MDA içeriğinin % 36 yaprak kıvrılma derecesine kadar artarak 46,5 nmol'e ulaştığı daha sonraki kıvrılma derecesinde ise 31,5 nmol'e düştüğü kaydedildi. MDA içeriğindeki azalmanın sonraki kıvrımlarda da devam ettiği ve maksimum kıvrılmadaki MDA içeriğinin g taze ağırlık başına 25,1 nmol olduğu belirlendi (Şekil 5).



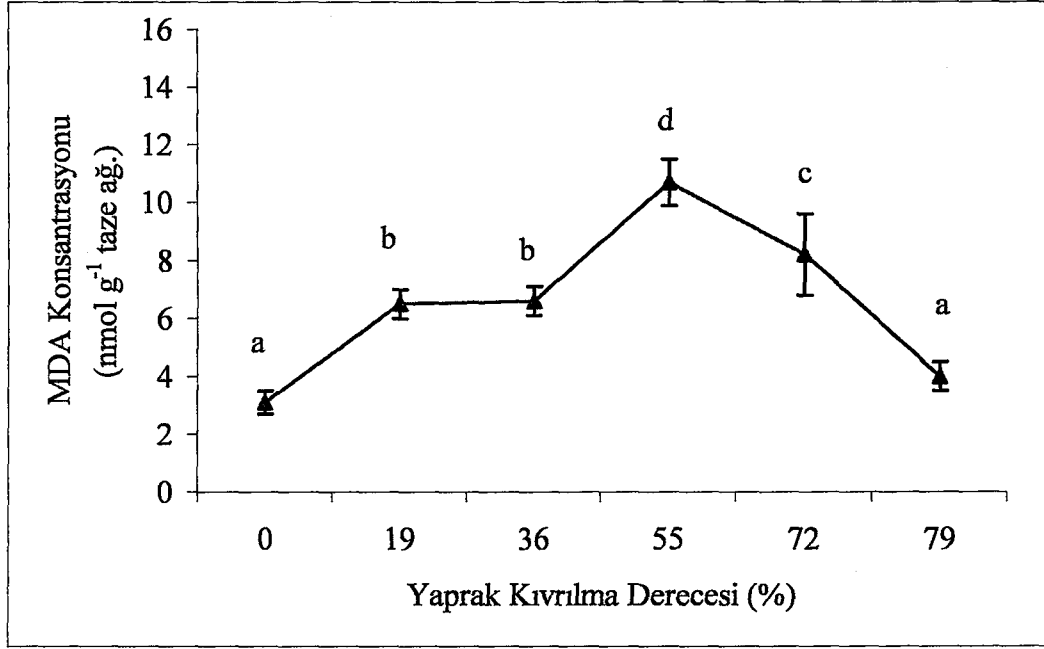
Şekil 5. *C. setosa*'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca MDA içeriğindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

Bitkilerin petiyollerinde yapılan aynı analizlerde yapraklara benzer sonuçlar elde edildi. Kontrolle karşılaştırıldığında MDA içeriğinin % 36 kıvrılma derecesine kadar istatistiki bakımdan önemli derecede arttığı kaydedildi. Daha sonraki yaprak kıvrılma derecelerinde ise MDA içeriğinin azaldığı ve maksimum kıvrılma derecesinde % 19 kıvrılma ile aynı değere düştüğü belirlendi (Şekil 6).



Şekil 6. *C. setosa*'nın petiyollerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca MDA içeriğindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

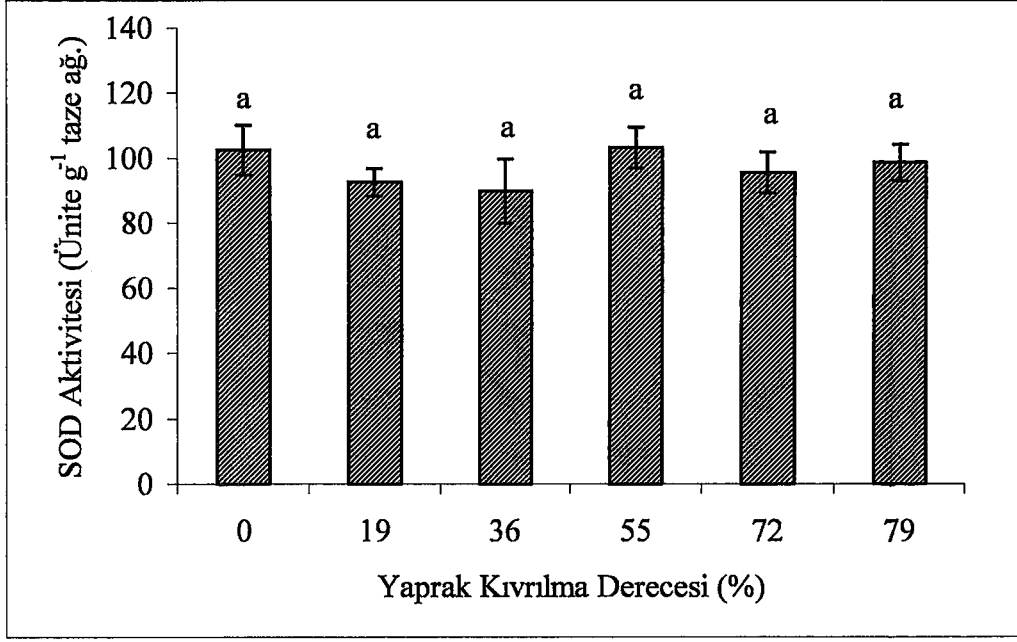
Köklerdeki MDA içeriğinin de kıvrılma derecesi artarken önce arttığı sonra ise kontrol bitkileri ile aynı seviyeye düştüğü tespit edildi. Yaprak ve petiyollerden farklı olarak MDA içeriğinin % 55 yaprak kıvrılma derecesine kadar artış gösterdiği daha sonra ise azaldığı belirlendi. % 19 ve 36 kıvrılma derecelerinde ölçülen MDA içeriğinde ise önemli bir değişimin olmadığı görüldü (Şekil 7).



Şekil 7. *C. setosa*'nın köklerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca MDA içeriğindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

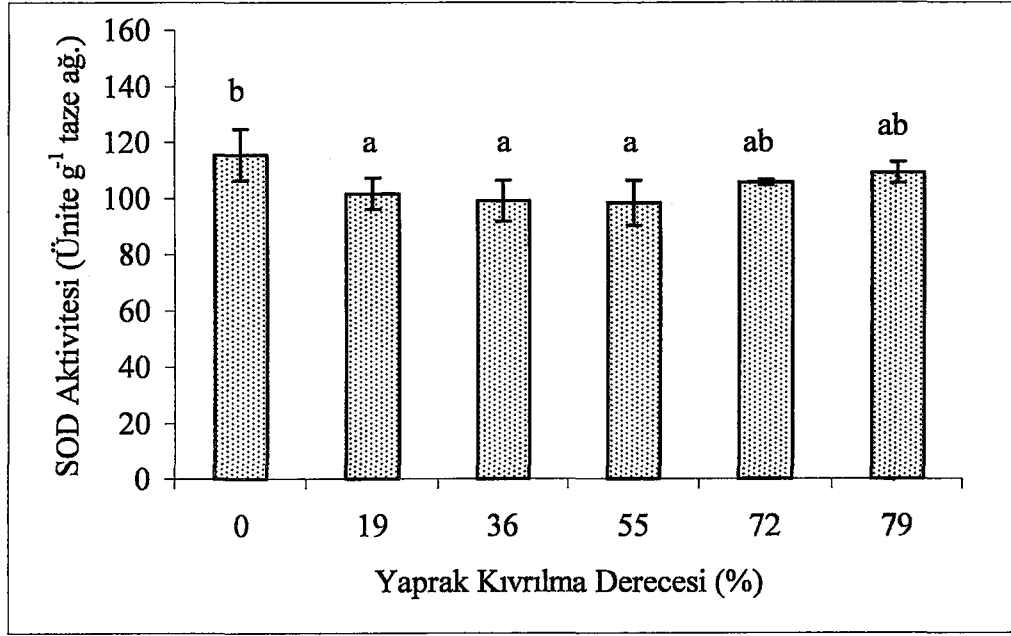
3.4. Yaprak Kıvrılmasının Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerin yapraklarında yapılan analizler sonucunda, kıvrılma derecesinin artmasıyla beraber SOD aktivitesinin istatistiki bakımdan önemli derecede değişmediği görüldü. Kontrol bitkilerin yapraklarında g taze ağırlık başına 102,6 ünite enzim olarak hesaplanan aktivitenin % 19 yaprak kıvrılma derecesinde 92,6 ve % 79 kıvrılma derecesinde 98,7 üniteye kadar azaldığı görüldü. % 55 kıvrılma derecesinde ise aktivitenin önceki kıvrılmalara göre arttığı bulundu. Bununla beraber yaprak kıvrılma derecesi artarken, SOD aktivitesinin azalmaların ve artışın istatistiki ($P>0,05$) bakımdan önemli olmadığı tespit edildi (Şekil 8).



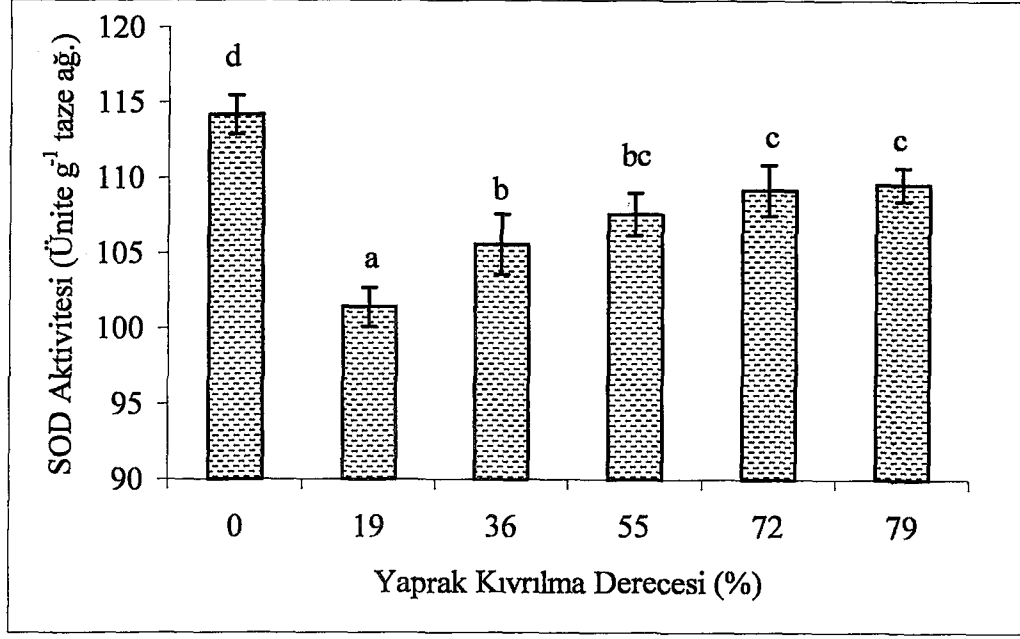
Şekil 8. *C. setosa*'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca SOD aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P > 0,05$) seviyesinde önemsizdir)

Petiyollerde yapılan aynı analizlerin sonucunda ise % 19 yaprak kıvrılma derecesinden başlamak üzere % 36 ve % 55 kıvrılma derecesine kadar aktivitenin istatistiki bakımdan ($P > 0,05$) önemli derecede azaldığı, bununla beraber daha sonraki kıvrımlarda yine artarak yaklaşık olarak kontrol ile aynı seviyeye ulaştığı belirlendi. Kontrolde g taze ağırlık başına 115,5 ünite olarak ölçülen enzim aktivitesinin % 19 yaprak kıvrılma derecesinde % 12 oranında azaldığı belirlendi. Kıvrılma derecesi % 36 ve % 55'e çıktığında ise aktivitenin sırasıyla 98,9 ve 98,4 üniteye düştüğü bulundu. Ayrıca % 19 ve % 55 yaprak kıvrılma dereceleri arasında istatistiki bakımdan önemli ($P > 0,05$) bir değişiklik görülmedi. Bununla beraber aktivitenin sonraki kıvrılma derecelerinde artarak, % 72 kıvrılmada 105,7 ve maksimum kıvrılmada da 109,1 üniteye ulaştığı tespit edildi (Şekil 9).



Şekil 9. *C. setosa*'nın petiyollerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca SOD aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

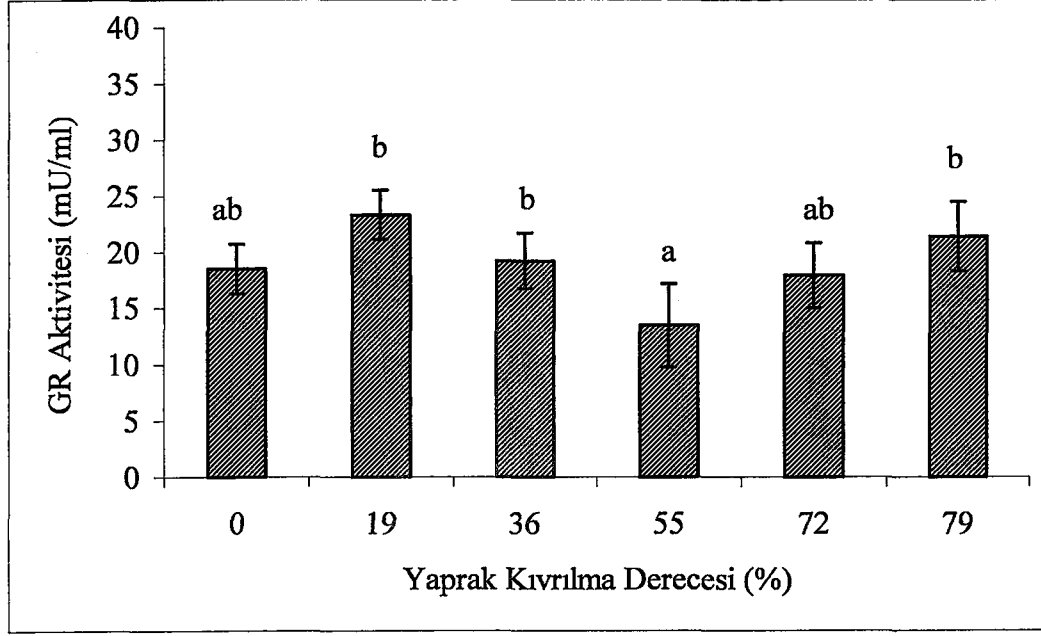
Köklerde yapılan denemelerde ise yine kuraklık stresinin başlangıcında istatistiki ($P>0,05$) açıdan önemli bir azalmanın olduğu ve bu azalmanın ilerleyen periyotlarda artmaya devam ederek kontrole yaklaştığı tespit edildi. Kontrolde 114,2 ünite olarak tespit edilen aktivitenin % 19 kıvrılma derecesinde yaklaşık olarak % 11,5 oranında azaldığı bulundu. Bununla beraber bu azalmanın hemen sonraki % 36 yaprak kıvrılma derecesinde istatistiki bakımdan önemli ($P>0,05$) derecede artarak 105,6, % 55 kıvrılma derecesinde de 107,6 üniteye çıktığı belirlendi. Yüksek kıvrılma derecelerinde ise bu enzimim aktivitesinin daha da artarak % 72 kıvrılmada 109,2 ve maksimum kıvrılmada da 109,6 üniteye ulaştığı tespit edildi (Şekil 10).



Şekil 10. *C. setosa*'nın köklerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca SOD aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

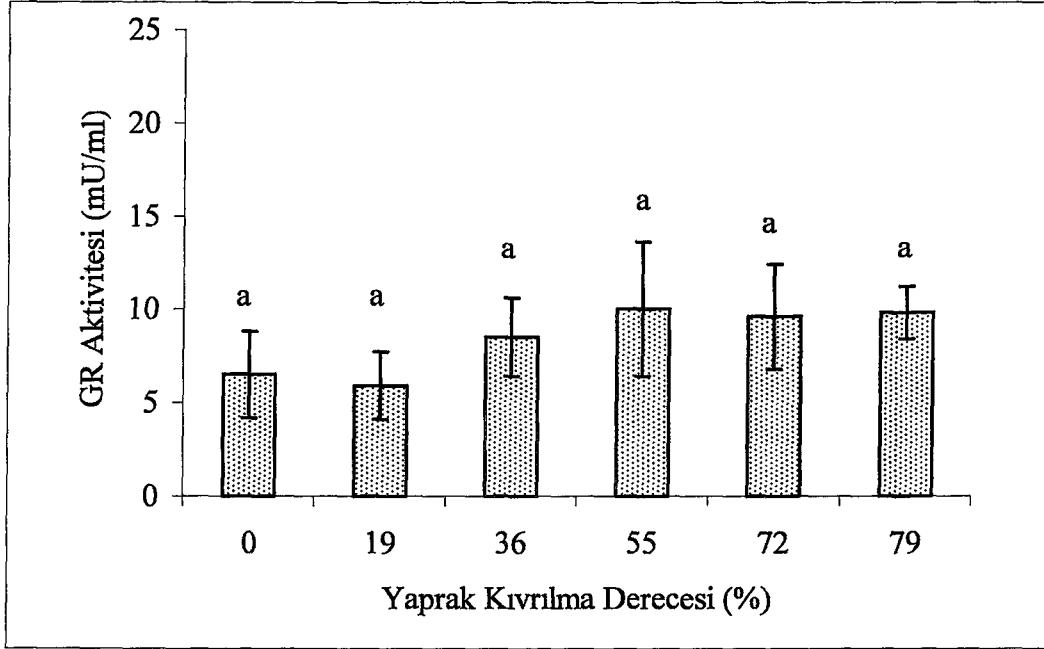
3.5. Yaprak Kıvrılmasının Glutasyon Redüktaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bitkinin yapraklarında yapılan analizler sonucunda glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin yaprak kıvrılma derecesinin artmasıyla beraber kontrole göre önce arttığı sonra azaldığı daha sonra ise yine arttığı kaydedildi. Bununla beraber aktivitedeki bu değişimlerin kontrole oranla istatistiki ($P>0,05$) bakımdan önemli olmadığı belirlendi. % 55 yaprak kıvrılma derecesinde ölçülen azalışın kontrol ile kıyaslandığında önemli olmamakla beraber % 19 ve 36 kıvrılma derecesi ile kıyaslandığında istatistiki bakımdan ($P>0,05$) önemli olduğu tespit edildi. GR aktivitesinin % 72 kıvrılma derecesinde kontrole yaklaştığı görüldü. Ayrıca % 79 kıvrılda aktivitenin istatistiki bakımdan önemli olmamakla beraber kontrole göre yükseldiği kaydedildi (Şekil 11).



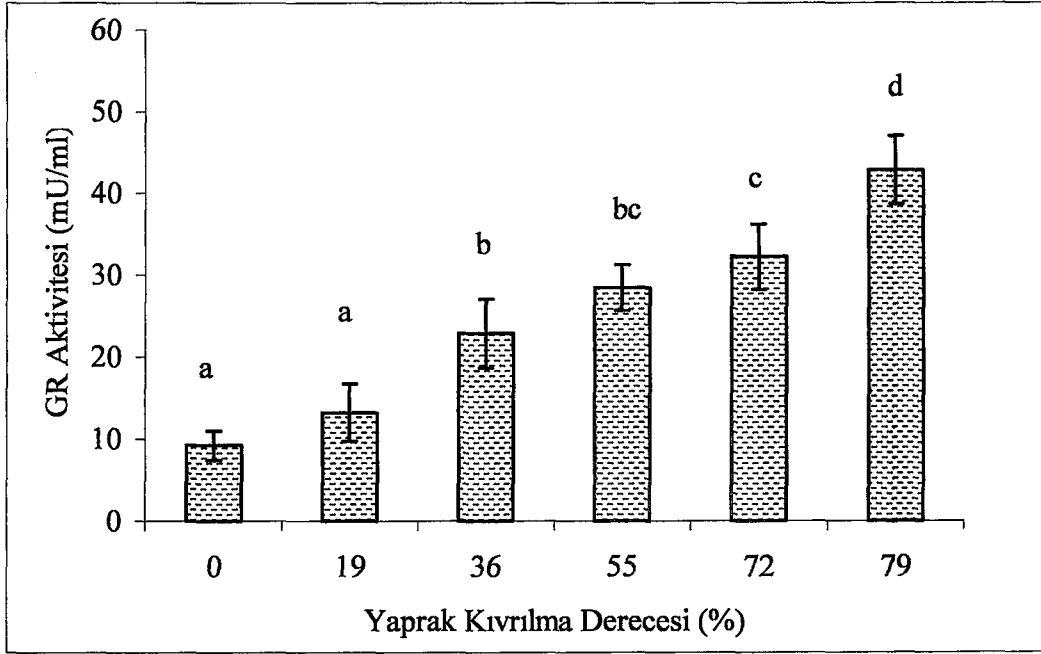
Şekil 11. *C. setosa*'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca glutasyon redüktaz aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

Petiyoollerde yapılan analizler sonucunda, kıvrılma derecesi artarken GR aktivitesinin kontrolle karşılaştırıldığında istatistiki bakımdan ($P>0,05$) önemli bir değişiklik göstermediği belirlendi. Kontrol bitkilerinde 6,5 mU/ml olarak belirlenen aktivitenin % 36 yaprak kıvrılma derecesinde 8,5 mU/ml' ye ve % 79 maksimum kıvrılma derecesinde de 9,8 mU/ml' ye ulaştığı bulundu. Bununla beraber bu artışların istatistiki bakımdan önemli olmadığı görüldü (Şekil 12).



Şekil 12. *C. setosa*'nın petiyollerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca glutasyon redüktaz aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

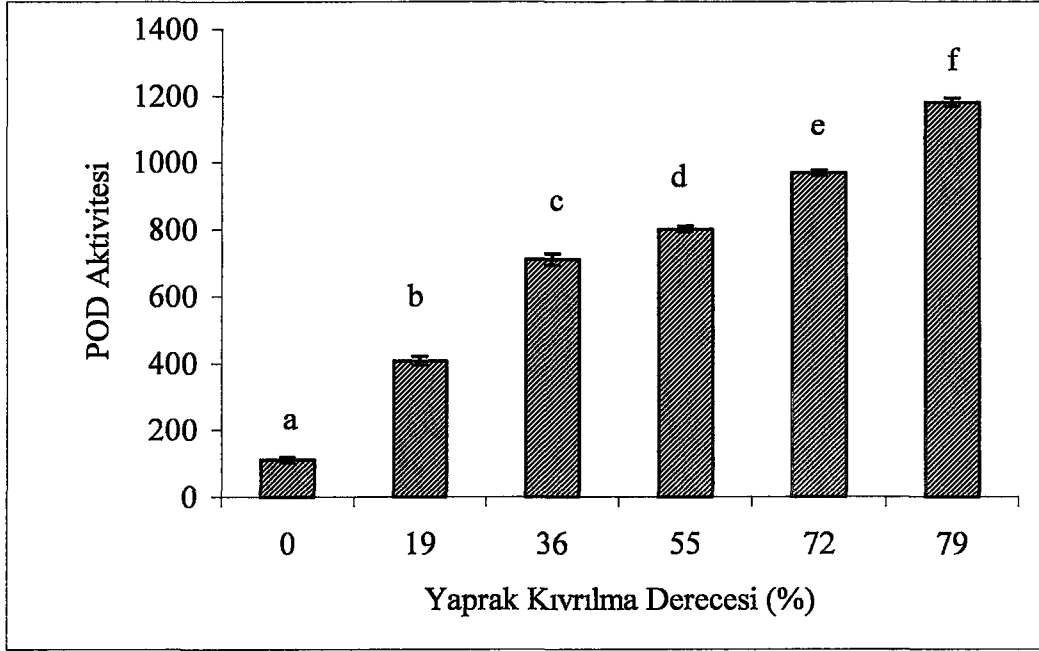
Köklerde yapılan aynı denemelerin sonucunda ise GR aktivitesinin istatistiki bakımdan önemli derecede ($P>0,05$) arttığı tespit edildi. Kontrol bitkilerinde 9,2 mU/ml olan aktivitenin % 19 yaprak kıvrılma derecesinde 13,2 mU/ml' ye ulaştığı fakat bu artışın istatistiki bakımdan önemli olmadığı belirlendi. % 36 kıvrılma derecesinde ise 22,8 mU/ml olan aktivite artışının istatistiki olarak önemli olduğu görüldü. % 55, % 72 ve % 79 kıvrılma derecelerinde de aktivitenin artmaya devam ederek sırasıyla 28,4, 32,2 ve 42,8 mU/ml' ye ulaştığı bulundu (Şekil 13).



Şekil 13. *C. setosa*'nın köklerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca glutatyon redüktaz aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

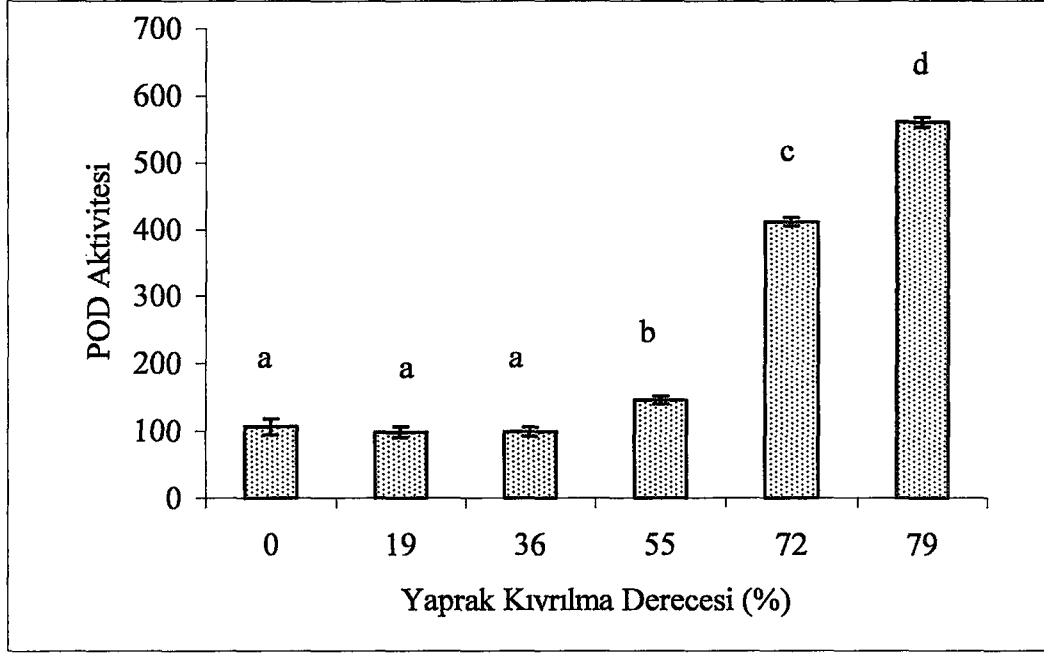
3.6. Yaprak Kıvrılmasının Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

SOD ve GR aktivitesinden farklı olarak, kuraklık periyodu esnasında kıvrılma derecesi artarken, yaprak ve petiyollerdeki peroksidaz aktivitesinin belirgin olarak arttığı ve bu artışın istatistiki bakımdan ($P>0,05$) önemli olduğu belirlendi (Şekil 14). Kontrol bitkileri ile kıyaslandığında g kuru ağırlık başına ölçülen aktivite artışının % 19 yaprak kıvrılma derecesinde 3 kattan fazla olduğu görüldü. Bu artışın daha sonraki günlerde yapılan ölçümlerde daha da bariz olduğu tespit edildi. Maksimum kıvrılma gösteren bitkiler kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında ise aktivite artışının 10 kattan fazla olduğu bulundu (Şekil 14).



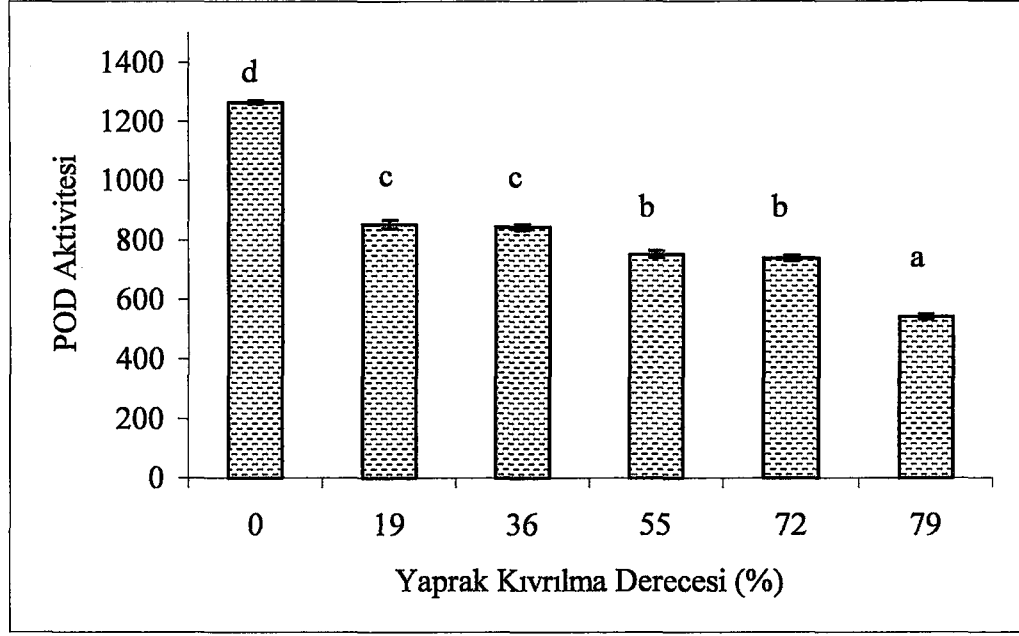
Şekil 14. *C. setosa*'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca POD aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

Petiyoollerde yapılan analizlerde de kıvrılma derecesinin artmasıyla beraber peroksidad aktivitesinin istatistiki olarak ($P>0,05$) önemli derecede arttığı kaydedildi (Şekil 15). Bununla beraber yapraklardan farklı olarak aktivitenin kontrole oranla % 19 ve % 36 kıvrılma derecelerinde çok fazla değişmediği görüldü. Ancak % 55 yaprak kıvrılma derecesinde aktivitenin istatistiki bakımdan önemli derecede arttığı bulundu. Bununla beraber bu artışın yapraklardaki ilk artıştan farklı olarak yaklaşık olarak 1,5 kat olduğu görüldü. Ayrıca yapraklarda % 79 kıvrılma derecesinde kontrole göre 10 kattan fazla artış olmasına rağmen petiyollerde yaklaşık 5 katlık bir artışın olduğu tespit edildi (Şekil 15).



Şekil 15. *C. setosa*'nın petiyollerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca POD aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

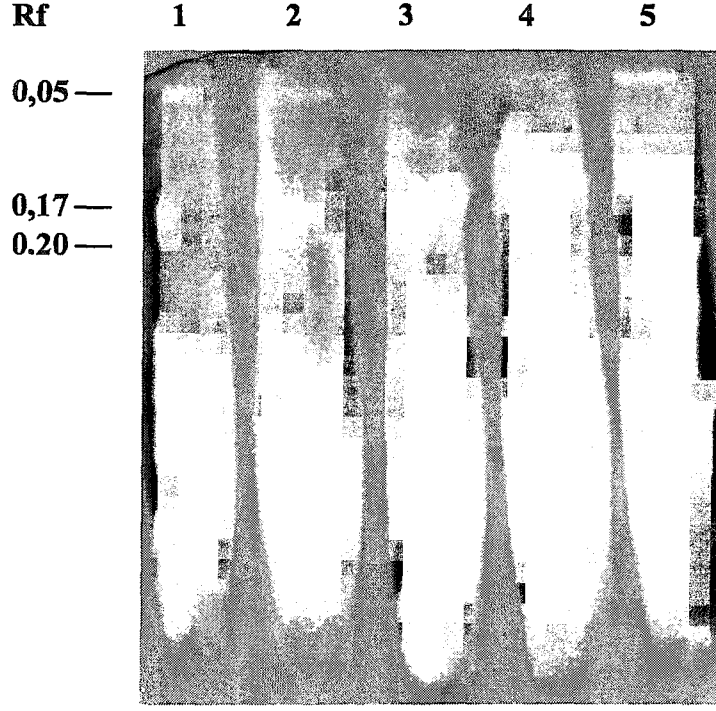
Bitkinin yaprak ve petiyollerinde peroksidaz aktivitesi bariz olarak artarken, köklerde yapılan analizler sonucunda peroksidaz aktivitesinin önemli ($P>0,05$) derecede azaldığı tespit edildi (Şekil 16). Köklerde GR aktivitesinde bariz bir artış tespit edilmesine karşın peroksidaz aktivitesine bakıldığında aktivitenin istatistiki bakımdan önemli derecede azaldığı kaydedildi. Ayrıca % 19 ve 36 yaprak kıvrılma dereceleri ile % 55 ve 72 kıvrılma dereceleri arasında peroksidaz aktivitesinin değişmediği belirlendi.



Şekil 16. *C. setosa*'nın köklerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca POD aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

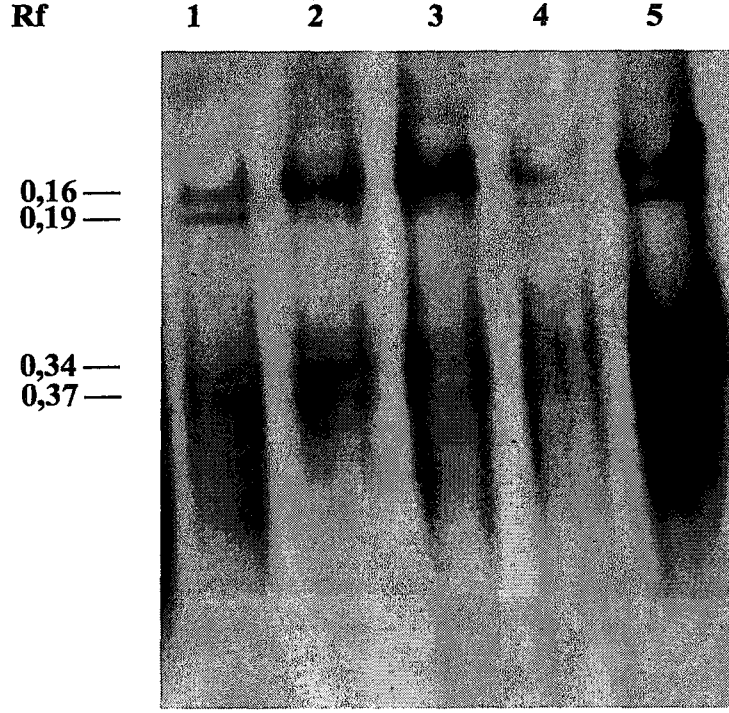
3.7. Yaprak Kıvrılmasının Peroksidaz İzoenzimleri Üzerine Etkisi

Peroksidaz izoenzimleri ile ilgili yapılan elektroforez sonuçlarına göre *C. setosa* yapraklarında Rf değerleri sırasıyla 0,05, 0,17 ve 0,2 olan 3 tane peroksidaz izoenzim bandının olduğu tespit edildi (Şekil 17). Ayrıca kıvrılma derecesi artarken izoenzim sayısı ve aktifliğinin de değiştiği belirlendi. Kontrolde ve yüksek yaprak kıvrılma derecelerinde 0,2 Rf değerine karşılık gelen bir bandın % 19 kıvrılma derecesinde bulunmadığı ve böylece 3 tane olan izoenzim bant sayısının 2 tane olduğu görüldü. Rf değeri 0,05 olan izoenzim bantlarının aktifliğinin kıvrılma artışı boyunca değişmediği belirlendi. Rf değeri 0,17 olan bantların aktifliğinin ise kontrol ve % 19 kıvrılma derecesinde benzer olmasına rağmen diğer kıvrılmalarda koyuluklarının ve kalınlıklarının gittikçe arttığı tespit edildi. Rf değeri 0,2 olarak ölçülen ve % 19 kıvrılmada bulunmayan bandın aktifliğinin % 36 kıvrılma derecesinde oldukça zayıf olduğu sonraki kıvrılmalarda da giderek arttığı kaydedildi (Şekil 17).



Şekil 17. *C. setosa*'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin peroksidaz izoenzimleri üzerine etkisi (1: Kontrol, 2:% 19, 3:% 36, 4:% 55, 5:% 79 kıvrılma derecesi)

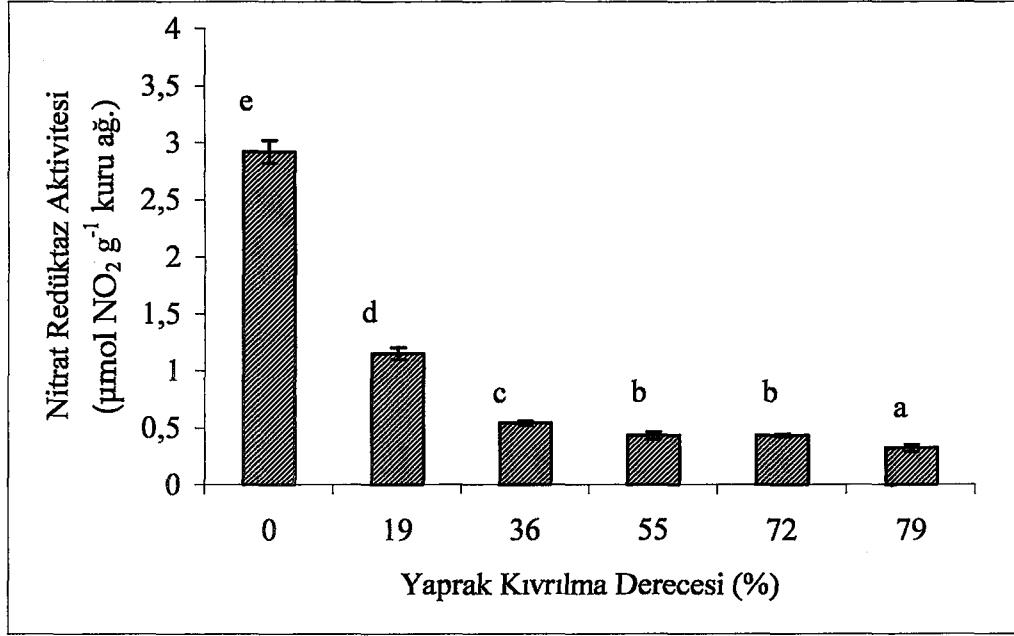
Petiyyollerde ise Rf değerleri 0,16; 0,19; 0,34 ve 0,37 olarak ölçülen 4 adet izoenzim bandında yaprak kıvrılma derecesine (%) bağlı olarak farklılıklar görüldü (Şekil 18). Rf değeri 0,16 olan izoenzim bandının % 19, % 36 ve % 79 yaprak kıvrılma derecelerinde kontrole kıyasla daha aktif olduğu, % 55 kıvrılma derecesinde ise değişmediği belirlendi. Rf değeri 0,19 olan izoenzim bandının % 19 ve % 36 kıvrılma derecesinde kontrole nazaran daha açık, % 79 kıvrılma derecesinde ise daha koyu olduğu gözlemlendi. Ayrıca kontrolde oldukça zayıf olan ve Rf değeri 0,34 ve 0,37 olarak ölçülen iki bandın aktifliğinin yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca giderek arttığı tespit edildi (Şekil 18).



Şekil 18. *C. setosa*'nın petiyollerinde yaprak kıvrılma derecesinin peroksidaz izoenzimleri üzerine etkisi (1:Kontrol, 2:% 19, 3: % 36, 4: % 55, 5: % 79 yaprak kıvrılma derecesi)

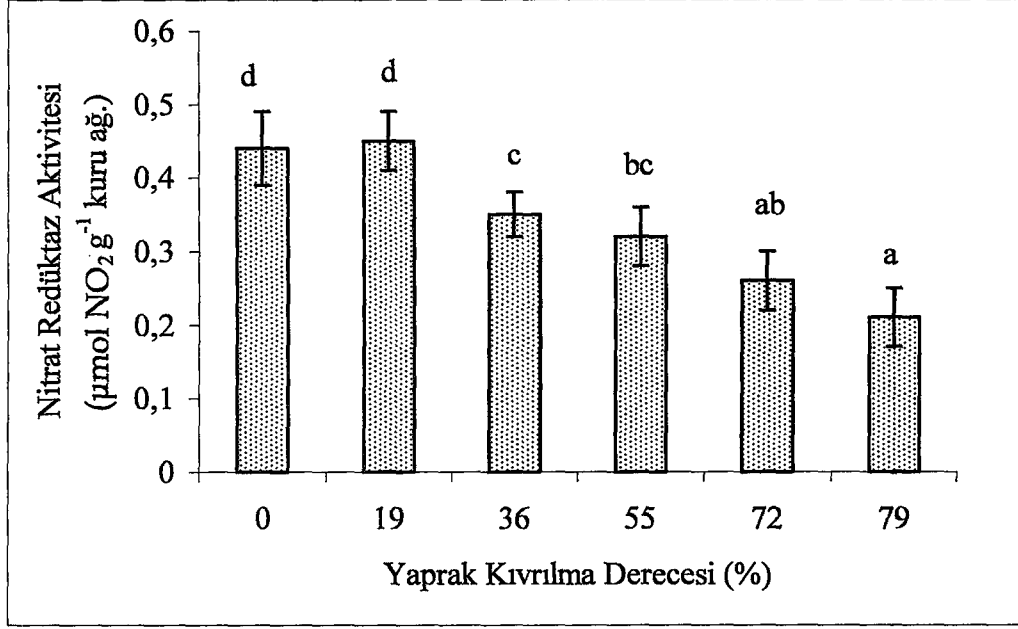
3.8. Yaprak Kıvrılmasının Nitrat Redüktaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bitkinin yapraklarında yapılan analizler sonucunda, yaprak kıvrılmasının nitrat redüktaz aktivitesini kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında istatistiki ($P>0,05$) bakımdan önemli derecede azalttığı kaydedildi (Şekil 19-21). Kontrol bitki grubunda kuru ağırlık başına 2,92 μmol olan aktivite % 19 gibi az bir kıvrılma derecesinde bile hızla azalarak 1,15 μmol 'e, % 79 maksimum kıvrılma derecesinde de % 89 oranında azalarak 0,32 μmol 'e düştüğü belirlendi. Yaprak kıvrılmasının % 55 ve % 72 derecelerinde ise aktivitede herhangi bir değişimin olmadığı tespit edildi (Şekil 19).



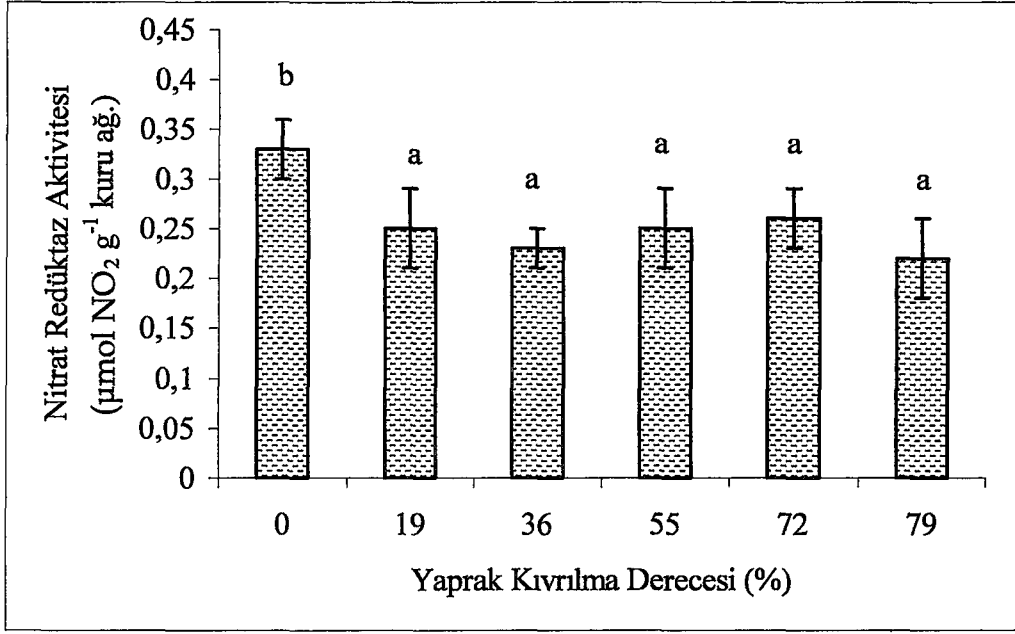
Şekil 19. *C. setosa*'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca nitrat redüktaz aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

Bitkinin petiyollerinde nitrat redüktaz aktivitesinin yapraklarda olduğu gibi kıvrılma derecesinin artmasına paralel olarak azaldığı belirlendi. Bununla beraber kontrol ve % 19 kıvrılma arasında yapraklardan farklı olarak petiyollerde herhangi bir değişiklik görülmedi. Ancak kontrol ile karşılaştırıldığında, % 36 yaprak kıvrılma derecesinde aktivitenin 0,44 µmol'den 0,35 µmol'e düştüğü, daha sonra azalmanın devam ettiği ve % 79 kıvrılma derecesinde yaklaşık olarak yarı yarıya azalarak 0,21 µmol'e gerilediği bulundu (Şekil 20).



Şekil 20. *C. setosa*'nın petiyollerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca nitrat redüktaz aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

Köklerde yapılan analizler sonucunda ise nitrat redüktaz aktivitesinin kontrol ile karşılaştırıldığında % 19 kıvrılma derecesinde bile azaldığı ve bu azalmanın istatistiki bakımdan ($P>0,05$) önemli olduğu belirlendi. Bununla beraber, bu kıvrılmadan sonraki kıvrılma derecelerinde maksimum kıvrılmada dahil olmak üzere aktivitede önemli bir değişiklik görülmedi (Şekil 21).

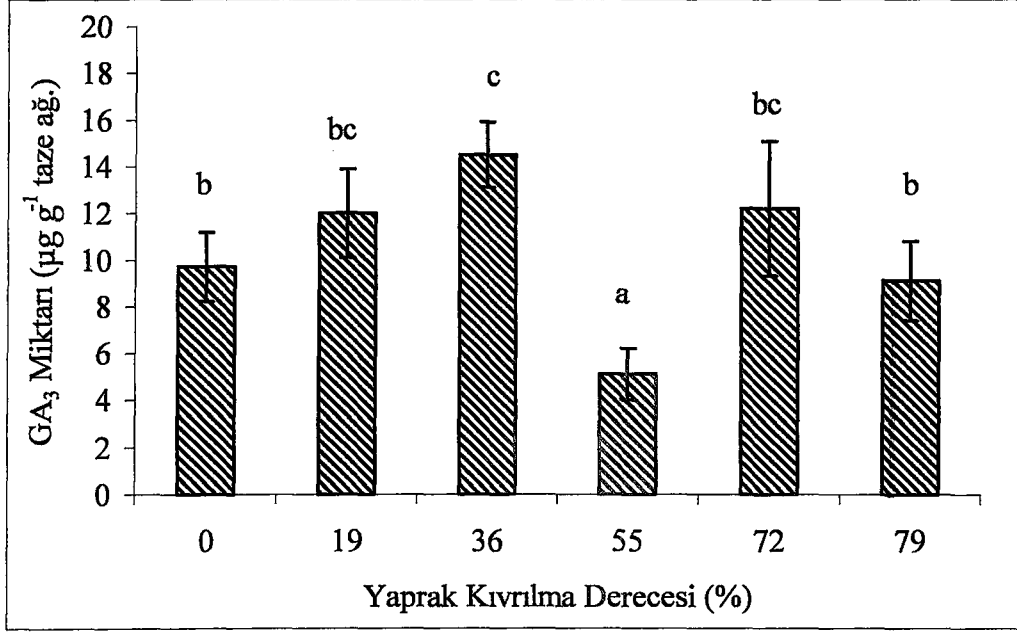


Şekil 21. *C. setosa*'nın köklerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca nitrat redüktaz aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

Bitkinin yaprak, petiyol ve kökleri kendi arasında karşılaştırıldığında nitrat redüktaz aktivitesinin yapraklarda petiyol ve köklere nazaran oldukça fazla olduğu, petiyollerde ise köklere nazaran daha fazla olduğu tespit edildi (Şekil 19-21).

3.9. Yaprak Kıvrılmasının Endojenik Giberellik Asit (GA) Miktarı Üzerine Etkisi

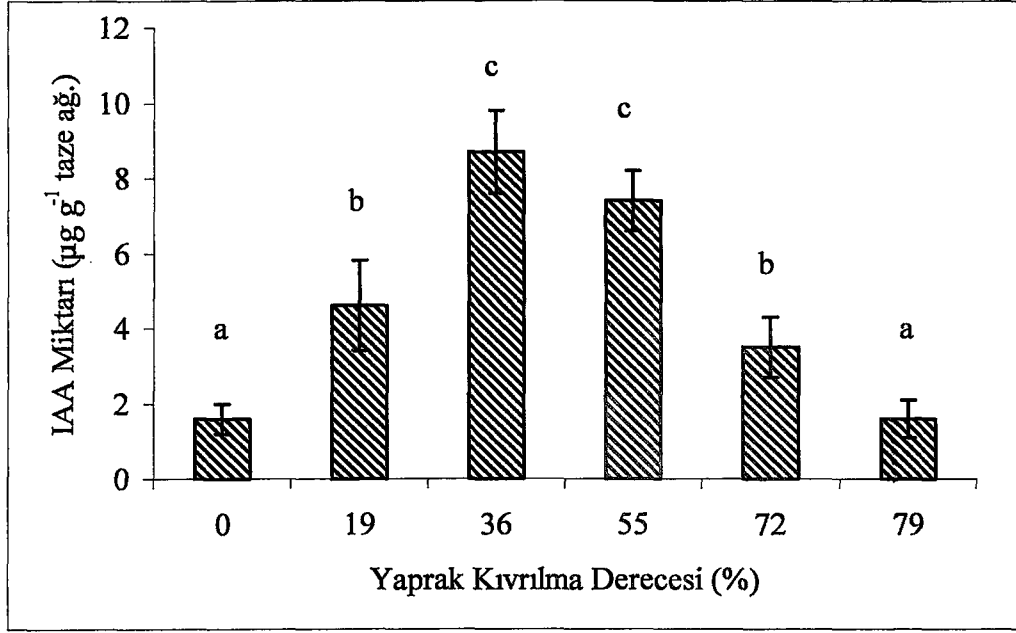
Yaprak kıvrılması ile birlikte *C. setosa* yapraklarında endojenik GA₃ miktarının önce arttığı sonra azaldığı ve daha sonra yine arttığı görüldü. GA₃ içeriğinin % 19 yaprak kıvrılma derecesinde % 49,5 oranında arttığı tespit edildi. Kontrole göre kaydedilen bu artışın istatistiki bakımdan önemli ($P>0,05$) olmadığı ancak % 36 kıvrılma derecesinde önemli olduğu belirlendi. Kontrole karşılaştırıldığında % 55 kıvrılmada % 47,4 oranında tespit edilen azalmanın ise istatistiki bakımdan önemli olduğu belirlendi. Bununla beraber sonraki kıvrılma derecelerinde endojenik GA₃ içeriğinin hızla artarak yeniden kontrol seviyesine ulaştığı kaydedildi (Şekil 22).



Şekil 22. *C. setosa*'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca GA₃ miktarındaki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 (P>0,05) seviyesinde önemsizdir)

3.10. Yaprak Kıvrılmasının Endojenik İndol Asetik Asit (IAA) Miktarı Üzerine Etkisi

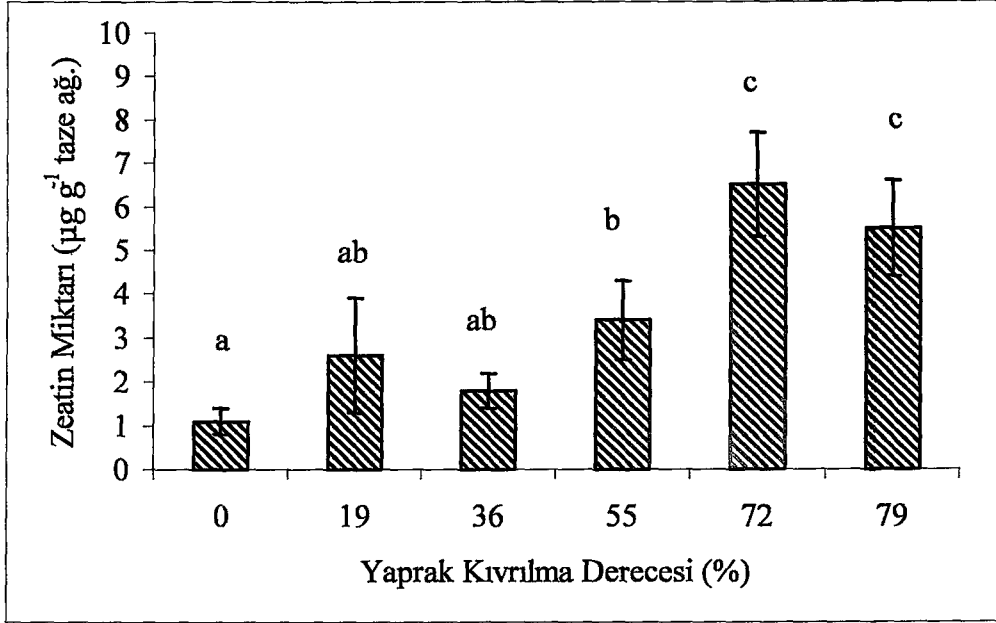
GA₃ miktarına benzer olarak kuraklık stresine maruz bırakılmış *C. setosa*'da yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca, IAA miktarının kontrole oranla istatistiki (P>0,05) bakımdan önemli ölçüde önce arttığı sonra ise azaldığı belirlendi. Yaprak kıvrılma derecesi % 19 olarak ölçüldüğünde IAA miktarında kontrole oranla 2,9 kat artış meydana geldi. Bu artışın % 36 ve 55 kıvrılma derecesinde sırasıyla 5,4 ve 4,6 kat olduğu kaydedildi. Kıvrılma derecesi % 72 olarak ölçüldüğünde ise IAA miktarının % 55 kıvrılmaya oranla yaklaşık olarak yarım kat azaldığı ve maksimum kıvrılmada da kontrol ile aynı değere düştüğü tespit edildi (Şekil 23).



Şekil 23. *C. setosa*'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca IAA miktarındaki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P > 0,05$) seviyesinde önemsizdir)

3.11. Yaprak Kıvrılmasının Endojenik Zeatin (Z) Miktarı Üzerine Etkisi

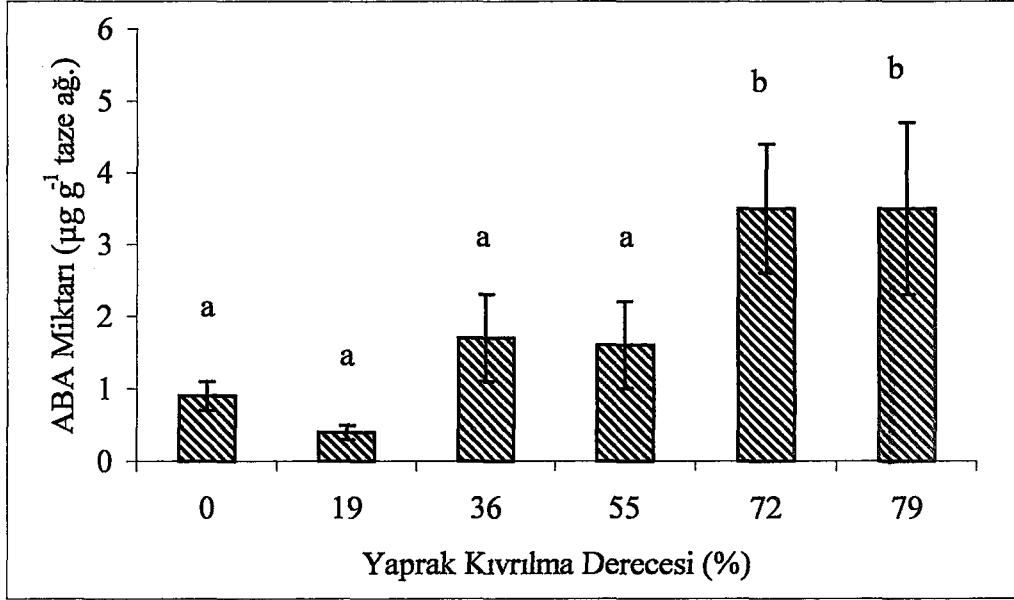
Kontrolle kıyaslandığında yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca zeatin miktarının arttığı ve bu artışın istatistiki bakımdan önemli olduğu belirlendi. Kontrol bitkilerinde 1,1 µg/g olan Z miktarının % 19 kıvrılma ölçülen bitkilerde 2,6 µg/g olduğu bulundu (Şekil 24). Kıvrılma derecesi % 36 olarak ölçüldüğünde ise Z miktarının % 19 kıvrılma derecesine göre azaldığı tespit edildi. Bununla beraber bu azalmanın istatistiki bakımdan önemli olmadığı görüldü. Yaprak kıvrılma derecesi % 55'e ulaştığında ise kontrole göre 3,1 kat artış belirlendi. Kıvrılma derecesi artarken Z miktarının daha da artarak % 72 kıvrılma derecesinde 6,5 µg/g ve % 79 kıvrılma derecesinde de 5,5 µg/g'a ulaştığı belirlendi (Şekil 24).



Şekil 24. *C. setosa*'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca Z miktarındaki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

3.12. Yaprak Kıvrılmasının Endojenik Absisik Asit (ABA) Miktarı Üzerine Etkisi

Kuraklığa maruz bırakılan bitkilerde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca ABA miktarının kontrole oranla arttığı ve bu artışın istatistiki bakımdan önemli olduğu belirlendi (Şekil 25). Kontrol bitkilerinde g taze ağırlık başına 0,9 µg/g olan endojenik ABA miktarının % 19 kıvrılma derecesinde 0,4 µg/g'a düştüğü bulundu. Bununla beraber bu azalışın istatistiki olarak önemli olmadığı kaydedildi. % 36 yaprak kıvrılma derecesinde kontrol bitkileri ile kıyaslandığında 1,8 kat, % 55 kıvrılma derecesinde ise 1,9 kat artışın olduğu belirlendi. Bununla beraber bu artışın da yine istatistiki bakımdan önemli olmadığı tespit edildi. Ancak % 72 ve % 79 kıvrılma derecelerinde kontrole göre 3,9 kat olarak ölçülen artışın istatistiki bakımdan önemli olduğu görüldü.



Şekil 25. *C. setosa*'nın yapraklarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca ABA miktarındaki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P > 0,05$) seviyesinde önemsizdir)

3.13. Yaprak Kıvrılmasının RNA Miktarı Üzerine Etkisi

Ctenanthe setosa'nın yapraklarını orta ve aşırı derecede kıvrıldığı durumda RNA miktarında meydana gelen değişiklikler Tablo 4'te gösterildi.

Kontrol bitkileri ve % 55 ve 79 yaprak kıvrılma derecelerinde yapılan RNA izolasyonları sonucunda, kıvrılmış yapraklardan izole edilen RNA miktarının kontrolle karşılaştırıldığında istatistik olarak önemli derecede azaldığı tespit edildi (Tablo 4).

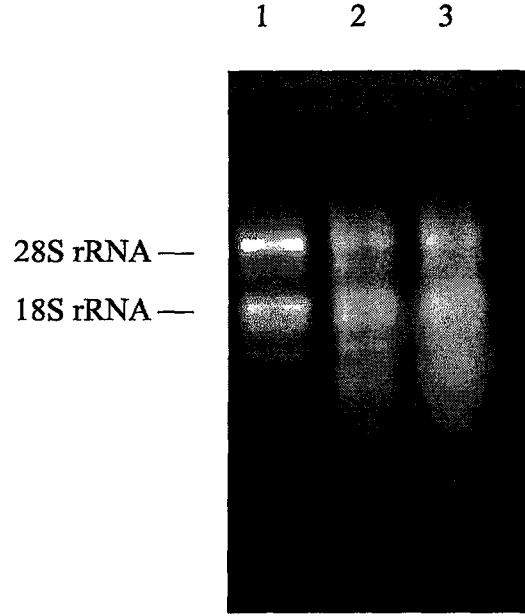
Tablo 4. *C. setosa*'nın yapraklarını kıvrırması esnasındaki RNA miktarları

Yaprak Kıvrılma Derecesi (%)	RNA miktarı $\mu\text{g}/\text{mg}$ taze ağ.
0	2,1 \pm 0,2* b
55	1,8 \pm 0,2 a
79	1,3 \pm 0,1 a

^aÜç tekerrürün ortalaması. ^{*}Üç tekerrürlü ortalamaların standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P>0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

3.14. Yaprak Kıvrılmasının RNA Profili Üzerine Etkisi

C. setosa'nın yapraklarını orta (% 55 kıvrılma derecesi) ve aşırı (% 79 kıvrılma derecesi) derecede kıvrıldığı durumda RNA profilinde meydana gelen değişimleri belirlemek için yapılan agaroz jel elektroforezi sonucunda küçük RNA profillerinde farklılıkların olduğu belirlendi. İzolasyonun doğru bir şekilde yapıldığını gösteren 28S ve 18S RNA bantları ile kontrol bitkilerinde 4 adet ve kıvrılmış bitkilerde 5 adet küçük RNA bantları jel üzerinde gözlemlendi. Daha sonra küçük RNA profillerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan inceleme sonucunda büyüklük olarak 18S RNA'ya yakın olan bantlardan hafif olanlara doğru gidildikçe kontrol bitki RNA'ları ile karşılaştırıldığında iki RNA bandının stres esnasında yoğunluğunun arttığı kaydedildi. Kontrol bitkilerinde belli belirsiz olarak gözlenen iki bandın ise stres geçirmiş bitkilerde çok daha belirgin hale geldiği görüldü. Ayrıca, stres geçirmiş bitkilerde kontrol bitki grubunda bulunmayan ilave bir bant gözlemlendi (Şekil 26).



Şekil 26. *C. setosa*'dan izole edilen RNA'ların % 1,4'lük agaroz jeldeki görüntüsü (1: Kontrol, 2: % 55 yaprak kıvrılma derecesi, 3: % 79 yaprak kıvrılma derecesinde izole edilen RNA)

3.15. PCR Reaksiyonları ile 18S rRNA ve lp3 Genlerinin Çoğaltılması

Pinus taeda L.'den elde edilen 18S rRNA geni için Pt18SrRNAB1 ile Pt18SrRNAF1 ve su stresi şartlarında uyarılan lp3 geni için RTLP3B1 ile RTLP3F1 dejenerat primer kombinasyonları kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünler, % 1,4'lük agaroz jelde yürütülmüş ve sonuçlar BioDocAnalyze Jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir (Şekil 27-28).



Şekil 27. Pt18SrRNAB1 ve Pt18SrRNAF1 dejenerat primer kombinasyonu ile *C. setosa* genomik DNA'larından PCR yoluyla çoğaltılan DNA parçaları (1:negatif kontrol, 2:primer kombinasyonu)



Şekil 28. RTLP3B1 ve RTLP3F1 dejenerat primer kombinasyonu ile *C. setosa* genomik DNA'larından PCR yoluyla çoğaltılan DNA parçaları (1:negatif kontrol, 2:primer kombinasyonu, 3: + kontrol (*Pinus taeda* L.'ya ait 18S rRNA için düzenlenen dejenerat primerler))

3.16. 18S rRNA ve lp3 Genleri Esas Alınarak Elde Edilen Baz Dizileri

18S rRNA ve lp3 geni esas alınarak düzenlenen dejenerat primerlerden elde edilen DNA parçalarının pGEM-T vektörüne klonlanmasının doğruluğu agaroz jelde teyit edildikten sonra, baz dizini belirleyen Davis Sequencing (ABD) şirketi aracılığıyla baz dizinleri belirlendi. 18S rRNA ve lp3 geni esas alınarak düzenlenen dejenerat primerlerden elde edilen DNA baz dizileri sırasıyla Şekil 29 ve 30'da gösterildi.

TACGCCCCGACGGTGACGGAGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAG
 AACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCT
 GACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCTCTTCGAGTCTGGT
 AATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAG
 TCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGT
 TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGACCTTGGGTTGGGTTCGGTTCGGTCCGCCTC
 GCGGTGTGCACCGGTCGTCCCGTCCCTTCTGCCGGTGATGCGTGCCTGGCCTTA
 ACTGGCCGGGTCGTGCCTCCGGCGCCGTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGCTCA
 AAGCAAGCCCACGCTCTGGATACATTAGCATGGGATAACATCACAGGATTTCCG
 GTCCTATTGTGTTGGCCTTCGGGATCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGG
 GGGCATTTCGTATTTTCATAGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTATGAAAGACGA
 ACCACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTT
 GGGGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCG
 ACCAGGGATCGGCGGATGTTGCTTTTAGGACTCCGCCGGCACCTTATGAGAAA
 TCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGG
 AATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAA
 CACGGGGAAACTTACCAGGTCCAGACATAGCAAGGATTGACAGACTGAGAGC
 TCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGA
 TTTGTCTGGTTCTAGTGGATCCCCCAGAAAGAGCTGAATCGTATC

Şekil 29. *C. setosa*'da 18S rRNA geni esas alınarak elde edilen baz dizisi

GTATCGCCACGACTCACACCACAAGGGAAGATGGGTAGCAAGGTAGAGGGAC
 ACGGCCGACTCGATGCCGTTGACATCCTCCACTAGAAAGCTCGTAGTGGCTCTT
 CACGTCCTCAATGGTTTTCCCGGTACATCCGCTGCAATTTTCTCCCACCGGTC
 GCTGCAATCCTCAGGGTGAGTTGCTAGGGCATTCTCAAATGCTTTTTCTGCTC
 CCTAGTCCACGACGAACCGCAGCTTTCTTCTTCCATCACCATCTCGCCAATCGA
 AGACACCACGAACAAGGACGCCCTCAAAGTGTTTCGAGATCCAAATTCATCAAC
 TCATGTGCTCAAGGTGGGATCTTTCGCAGCGATAGCCCGCCTCCGCCTCAGATT
 GATGAAAAGGCCACTAACTTCGCCAGAATAGCGGCCAGAAATTGGATCTGAC
 TGGTTCTTGAAAACAGAGACCCGATGACTCACCGGTATCTGAAAAATCATGCA
 GAAAGGAGGCTGTAAAATGAAACCGCAGGCATGGAAGAAGATAGATGCGGAG
 CAGTCGAGAGGAAAGGGCACCAAAACACAGAGCAAAAAAATCGAACAAAGA
 AGACAACAGCCACCACTCAACAAAAACTAGGGCTTCCTGCAATAGCAAGCAG
 AGTCACTGCAAAAGCCGGCCAAGGTTAAAAATGCAAGTGGAAAAAATATCC
 GCATCTGAGGACACAGAGGTATAACAATAGGGAGATTGGAAGTATTGGGGCG
 AGAGATTGAAAGCAACCTTTGAAACCAGACAAAGAACCAAATAGATGTGATT
 GTGGGATAACAGGAACAAAAGAGAACCTTGTGGATGATTGGAATGGGAACCC
 TAAGCGATTTCTTTCACGCTCACAGTCCCCAAGTCCAATCCCTCAATCAAACAA
 CATTACAGTAAAAATCTGGAATTTTGTCTACCAAAACAAGGAAGAAAAGAGCG
 ACAAGAGGAAAAGGAAGGGCAAAAAGCATCACCCACCTCTAGTGGATCCCCCA
 GTAAAGAGCTGAATTCTATTCATCAT

Şekil 30. *C. setosa*'da lp3 geni esas alınarak elde edilen baz dizisi

18S rRNA geni esas alınarak elde edilen DNA baz sırası, gen bankasında var olan diğer bitkilere ait baz sıraları ile karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları belirlendi ve sonuçlar Tablo 5'te gösterildi.

Tablo 5. Elde edilen 18S rRNA baz dizisinin gen bankasında var olan bitkilere ait 18S rRNA baz dizileriyle karşılaştırılması

18S rRNA dizisine göre en fazla benzediği organizma	Familya	18S rRNA'nın benzeme oranı
<i>Marantochloa atropurpurea</i>	Marantaceae	% 99
<i>Maranta bicolor</i>	Marantaceae	% 99
<i>Calathea loeseneri</i>	Marantaceae	% 98
<i>Strelitzia nicolai</i>	Strelitziaceae	% 99
<i>Phenakospermum guyannense</i>	Strelitziaceae	% 99
<i>Ravenala madagascariensis</i>	Musaceae	% 99
<i>Musa acuminata</i>	Musaceae	% 98
<i>Heliconia indica</i>	Heliconiaceae	% 99
<i>Orchidantha fimbriata</i>	Lowiaceae	% 99
<i>Orchidantha siamensis</i>	Lowiaceae	% 99
<i>Pimeleodendron griffithianum</i>	Euphorbiaceae	% 98
<i>Xeronema callistemon</i>	Xeronemataceae	% 98
<i>Calyptronoma occidentalis</i>	Aracaceae	% 98

Lp3 geni esas alınarak dizayn edilen dejenerat primerler kullanılarak elde edilen baz sırasının 6 farklı yönden translasyonu sonucunda oluşabilecek amino asit dizileri belirlendi (Ek 1). Bu amino asit dizileri gen bankasında var olan diğer bitkilere ait dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları belirlendi. Elde edilen sonuçlardan önemli görülenler Tablo 6'da gösterildi.

Tablo 6. Lp3 geni esas alınarak elde edilen DNA baz dizisinden oluşması mümkün olan amino asit sıralarının gen bankasında kayıtlı diğer transkriptlerle karşılaştırılması

Amino asit dizisine göre en fazla benzediği organizma	Familya	Benzediği ürün	Benzeme oranı
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	myb transkripsiyon faktörü	% 63
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Solanaceae	I-kutusu bağlanma faktörü	% 52
<i>Glycine max</i>	Fabaceae	Syringolid-uyarıcı protein	% 52
<i>Hevea brasiliensis</i>	Euphorbiaceae	myb transkripsiyon faktörü	% 50

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada *C. setosa*'nın yaprak, petiyol ve köklerinde yapılan analizlerde kuraklık stresi esnasında bitkinin strese karşı dayanıklılık geliştirebilmesinde yaprak kıvrılma mekanizmasının yanı sıra başka biyokimyasal ve moleküler değişimlerin rol alıp almadığı ve bu parametrelerin yaprak kıvrılma mekanizması ile ilişkili olup olmadığı tespit edilmiştir.

Bitkide stres koşullarında değişen ve bitkideki su eksikliğinin derecesini gösteren parametrelerden birinin, nispi su içeriğindeki azalmanın olduğu ileri sürülmüştür (Flower ve Ludlow, 1986). Bu nedenle çalışmamızda öncelikle yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca nispi su içeriğindeki değişimler belirlenmiş ve böylece bitkinin strese maruz kalıp kalmadığı, kalmışsa maruz kaldığı stresin derecesi tespit edilmiştir. Nispi su içeriğinin yaprak kıvrılma derecesinin artmasıyla beraber azaldığı ve 64 gün kuraklık periyodu sonunda, yapraklarda % 94'ten % 78'e, petiyollerde ise yine % 94'ten % 67'e düştüğü belirlenmiştir. Bu sonuçlar literatürdeki stres esnasında bitki su içeriği üzerine yapılan benzer çalışmalarla uygunluk içerisindedir. Örneğin, *Xerosicyos danguyi* (Cucurbitaceae)'de NSİ'nin % 92'den % 50'ye düştüğü tespit edilmiştir (Bastide vd., 1993). Yine, mısırdaki yapılan benzer bir araştırmada, kontrol bitkilerinin yapraklarındaki NSİ değişmezken, kuraklığa maruz bırakılanlarda kuraklığın 3. gününden sonra azalmaların olduğu belirlenmiştir (Foyer vd., 1998). Mevcut çalışmada, *C. setosa*'da bu düşüş ancak 32. günde başlamış ve yukarıdaki değerlere ancak 64. günde ulaşılmıştır. Görüldüğü gibi diğer bitkilerle karşılaştırıldığında *C. setosa*'daki bu düşüşün uzun bir kuraklık periyodu sonunda ve düşük oranlarda olması bitkinin yaprak kıvrılması mekanizması ile su kaybını azaltarak kuraklıktan sakındığını ve böylece kuraklığa karşı dayanıklılık gösterdiğini düşündürmektedir. Bu konuyu biraz daha açıklamak gerekirse; iki bitki türü aynı kuraklık şiddetine maruz kaldığı zaman birinin diğerine göre daha fazla NSİ'ye sahip olması o bitkinin kuraklığa karşı daha dayanıklı olduğunu göstermektedir (Passiosura vd., 1993). Diğer taraftan, bu sonuçlar *C. setosa*'nın şiddetli kuraklık periyodu esnasında bile yaprak kıvrılması sayesinde ancak orta derecedeki bir su stresinde görülmesi mümkün olan bir NSİ seviyesine sahip olduğunu ve böylece yaprak kıvrılmasının strese dayanıklılık sağladığını söylemek mümkün olmaktadır. Smirnoff (1993)'un yaptığı çalışma

bu düşünceyi destekler niteliktedir. Nitekim bu araştırmacı, orta derecede su stresine maruz kalan bitkilerdeki NSİ seviyesinin % 70'in üzerinde olduğunu ileri sürmüştür.

Su stresinden etkilenen diğer parametrelerden birisi de kök:sürgün kuru ağırlık oranının artmasıdır (Hopkins, 1995; Wu ve Cosgrove, 2000). Bu nedenle mevcut araştırmada kök:sürgün kuru ağırlık oranındaki değişimler de ölçülmüş ve NSİ azalırken kök:sürgün kuru ağırlık oranının stres esnasında arttığı bulunmuştur. Başka çalışmalarda da stres esnasında kök:sürgün kuru ağırlık oranındaki değişim araştırılmıştır. Örneğin, çalışmamızdaki sonuçlara benzer olarak, Nguyen vd. (1997), kuraklık stresinin etkisi artarken, kök:sürgün kuru ağırlık oranının yükseldiğini ileri sürmüşlerdir. Larsson vd. (1989), ise osmotik strese maruz bırakılmış buğday fidelerinde 6 günlük muamele süresi boyunca kök:sürgün kuru ağırlık oranında belirgin artışlar belirlemişlerdir. Çalışmamızda kuru ağırlık yönünden kök:sürgün oranındaki artış, bu oranlarda NSİ'nin olası etkilerinden kaynaklanmış olabilir. Nitekim, topraktan su alınımı azaldığı zaman bitkilerde su eksikliğinin meydana geldiği ve yaygın bir cevap olarak kök:sürgün kuru ağırlık oranının arttığı ileri sürülmüştür (Wu ve Cosgrove, 2000).

Su stresinden etkilenen ve bitkinin strese karşı tolerans derecesini belirlemede kullanılan başka bir parametre ise fotosentetik pigmentlerin miktarıdır. Örneğin klorofil a, klorofil b, toplam klorofil içeriği, klorofil a/b oranı, klorofil kararlılık indeksindeki ve karotenoid miktarlarındaki değişimlerin bitkilerin kuraklığa toleransının göstergesi olduğu (Sairam vd., 1997/98) ve bu pigmentlerin içeriklerinin toleranslı olan bitki çeşitlerinde yüksek olduğu kaydedilmiştir (Pastori ve Trippi, 1992; Sairam, 1994; Kraus vd., 1995). Bu nedenle mevcut araştırmada bu parametrelere de bakılmış ve toplam klorofil içeriğinin % 36, toplam karotenoid içeriğinin ise % 55 yaprak kıvrılma derecesine kadar sırasıyla % 22 ve % 33 oranında azaldığı, daha sonraki kıvrılma derecelerinde ise artarak yaklaşık olarak kontrol seviyesine ulaştığı görülmüştür. Pigment miktarındaki azalmanın az olması ve hemen sonra kontrol seviyesine ulaşması *C. setosa*'nın yaprak kıvrılma mekanizması sayesinde strese karşı tolerans gösterdiğinin diğer bir delili olarak düşünülmektedir. Nitekim, kuraklığa duyarlı buğday çeşitlerinin klorofil içeriğinde belirgin azalışların olduğu, kuraklığa toleranslı olanlarda ise bu azalışın fazla olmadığı ileri sürülmüştür (Lascano vd., 2001). Diğer taraftan fotosentetik pigment miktarlarındaki bu düşüş literatürdeki bazı çalışmalarla uygunluk içerisindedir. Örneğin, buğdayda yapılan bir araştırmada klorofil a ve klorofil b miktarının kuraklık (Nyachiro vd., 2001), nem ve sıcaklık stresi esnasında (Sairam vd., 1997) önemli derecede azaldığı bulunmuştur.

Araştırmamızda ilerleyen yaprak kıvrılma derecesi ile beraber pigment miktarlarının artması ise *Triticum* ve *Aegilops* türleri üzerine yapılan bir çalışma ile uygunluk içerisinde. Bu çalışmada osmotik stres muamelesi ile klorofil içeriğinin arttığı tespit edilmiştir (Gaspar vd., 2002). Başka çalışmalarda da su stresinin fotosentetik pigmentlerin içeriğinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Örneğin, su stresinin *Digitalis lanata*'da β -karoten (Smirnoff, 1993), *Poa pratensis* L. ve *Festuca arundinacea* L.'de ise klorofil içeriğinde artışlara neden olduğu tespit edilmiştir (Jiang ve Huang, 2001). Çalışmamızda yaprak kıvrılma derecesinin az olduğu koşullarda fotosentetik pigment miktarlarındaki azalmalar, nispi su içeriğinin etkilerinden kaynaklanabilir. Sonraki kıvrılma derecelerinde pigment içeriğinin artması ise artan yaprak kıvrılması ile yaprağın iç yüzeyindeki bölgede birikebilen su buharı sayesinde bitkiye iyileşme sağlamasından kaynaklanabilir. Nitekim, Matthews vd. (1990), yaprak kıvrılması ile yaprağın iç yüzeyindeki bölgede nem biriktiğini ve bu sayede bitkinin strese karşı daha fazla direnç sağladığını ileri sürmüşlerdir. Görüldüğü gibi *C. setosa*'da yaprak kıvrılması sırasında NSİ azalmasına rağmen yaprak kıvrılma mekanizması tarafından bitkinin şiddetli derecede stres geçirmesi engellenmiştir. Nitekim, soğanda yapılan bir çalışmada kuraklık esnasında NSİ'nin azalmasına rağmen yapraklarda klorofil kaybının meydana gelmemesinin kuraklığın şiddetine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (Rensburg ve Kruger, 1994; Zhang ve Kirkham, 1996; Bartoli vd., 1999; Egert ve Tevini, 2002).

Su stresi esnasında bitkilerin strese karşı toleransı ile ilişkili olan başka bir parametre de lipid peroksidasyonudur. Örneğin, su stresine maruz bırakılmış buğday ve mısır çeşitlerinde su stresi şartları altında lipid peroksidasyonunun arttığı, bununla beraber hassas çeşitlerle karşılaştırıldığında strese toleranslı olanlarda azaldığı ileri sürülmüştür (Sairam vd., 1998; Pastori ve Trippi, 1992). Bu nedenle mevcut araştırmada, yaprak kıvrılması süresince bitkinin yaprak, petiyol ve kökünde lipid peroksidasyonu ölçülmüş, yaprak ve petiyolde MDA içeriğinin % 36, köklerde ise % 55 yaprak kıvrılma derecesine kadar artış gösterdiği, daha sonraki kıvrılma derecelerinde ise azaldığı belirlenmiştir. Benzer şekilde başka çalışmalarda da su eksikliği esnasında lipid peroksidasyonunun arttığı rapor edilmiştir (Dhindsa vd., 1981/82; Burke vd., 1985; Borsani vd., 2001; Sairam vd., 2001). Lipid peroksidasyonunun önce artması daha sonra ise azalması, kuraklık periyoduna maruz kalmış bitkilerdeki NSİ'nin azalmasından ve fotosentetik pigment miktarlarındaki değişimlerden kaynaklanmış olabilir. Nitekim, Jiang ve Huang (2001), kuraklığa maruz kalmış *Festuca arundinacea* L. ve *Poa paratensis* L. türlerindeki lipid

peroksidasyonunun önemli derecede artmasını pigment miktarları ve NSİ'deki azalışlara bağlamışlardır. Benzer olarak çalışmamızda klorofil ve karotenoid içeriği % 36 yaprak kıvrılma derecesine kadar azalırken, MDA içeriğinin aynı kıvrılma derecesinde artış gösterdiği, sonraki yaprak kıvrılma derecelerinde ise klorofil ve karotenoid içeriği artarken MDA içeriğinin azaldığı görülmüştür. Diğer taraftan lipid peroksidasyonunun azalmasına bazı antioksidant enzim aktivitelerinin yüksek seviyede tutulmasının katkı sağlayabileceği de rapor edilmiştir (Fu ve Huang, 2001). Mevcut araştırmada bu sorunun cevabı antioksidant enzimlerin aktivitelerindeki değişimler araştırılarak belirlenmiştir.

Bitkilerin maruz kaldığı çeşitli streslerde değişken olan parametrelerden biri de antioksidant enzim aktiviteleridir. Bu enzimlerin aktivitelerindeki değişimin, bitkilerde çeşitli yollarla üretilen reaktif oksijen bileşiklerinin sitotoksik etkilerinden hücre ve hücre alt yapılarını koruduğu ve (Liebler vd., 1986; Elstner, 1987; Larson, 1988) bitkinin çevresel streslere dayanıklılığında ve su stresine toleransında etkili olduğu ileri sürülmüştür (Pastori ve Trippi, 1993). Diğer taraftan, reaktif oksijen bileşiklerinin oluşum yollarından birinin kuraklık sonucunda stomaların kapanmasıyla mezofil dokusundaki CO₂ konsantrasyonunun azalmasının NADPH birikimine neden olması ve böylece oksijenin elektronların akseptörü olarak rol oynamasının olduğu kaydedilmiştir (Egneus vd., 1975; Cadenas, 1989). Bu nedenle, stomalarını kapatmak yerine yaprak kıvrılmasını tercih eden *C. setosa*'da artan yaprak kıvrılma derecesine bağlı olarak bazı antioksidant (SOD, GR ve POD) enzimlerin aktivitelerindeki değişimler araştırılmıştır. Yapraklarda yapılan analizler sonucunda kıvrılma derecesi artarken SOD aktivitesinin istatistiki bakımdan önemli derecede değişmediği görülmüştür. Reaktif oksijen türlerinin artması durumunda SOD aktivitesinin arttığı konusunda fazlaca çalışma olmakla birlikte, elde ettiğimiz bulgulara benzer olarak bazı çalışmalarda su stresinin SOD aktivitesini etkilemediği rapor edilmiştir (Zhang ve Schmidt, 1999; Bartoli vd., 1999). Örneğin, Borsani vd., (2001)'nin elde ettikleri sonuçlar bu bulgularımızı destekler niteliktedir. Bu araştırmacılar, *Lotus corniculatus*'da kuraklık esnasında SOD aktivitesinde önemli bir değişimin olmadığını kaydetmişlerdir. Yapraklarda SOD aktivitesinde önemli derecede değişme olmaması, bitkinin stomalarını kapatmak yerine yapraklarını kıvrımayı tercih etmesinden ve böylece aşırı miktarda süperoksit radikalinin oluşmamasından kaynaklanabilir. Nitekim, *C. setosa*'nın stomalarını kapatmak yerine yapraklarını kıvrıdığı kaydedilmiştir (Turgut ve Kadioğlu, 1998). Petiyol ve kökte ise SOD aktivitesinin % 19 yaprak kıvrılma derecesinde sırasıyla % 12 ve % 11,5 oranında azaldığı ve bu azalmaların sonraki yaprak kıvrılma

derecelerinde artarak kontrol seviyesine ulaştığı bulunmuştur. SOD aktivitesinin % 19'luk yaprak kıvrılma derecesinde azalması, bitkinin yaprak kıvrılmasını başlatarak stres hasarlarına karşı koruma sağlamasından kaynaklanabilir. Nitekim, antioksidant enzim aktivitelerindeki azalmanın bitkinin strese karşı diğer koruyucu mekanizmaları harekete geçirdiğinin bir işareti olabileceği ileri sürülmüştür (Kronfuss vd., 1996). Başka bir olasılıkla bu görevi diğer antioksidant enzimlerinin (peroksidaz vs.) üstlendiği düşünülebilir. Ayrıca, *C. setosa*'da kuraklık stresi altında SOD cevabının farklı olmasının bu türe has bir özellik olduğunu da söyleyebiliriz. Nitekim, literatürdeki bazı çalışmalarda SOD aktivitesinin azaldığı, bazılarında ise arttığı kaydedilmiştir. Örneğin, SOD aktivitesinin *Corchorus*' da azaldığı (Chowdury ve Choudhuri, 1985), *Hordeum*, *Armeria* ve *Deschampsia*'da arttığı (Smirnoff, 1993), yonca (Irigoyen vd., 1992) ve ayçiçeğinde ise değişmediği (Smirnoff, 1993) belirlenmiştir. Görüldüğü gibi bu konuda literatürde açık bir sonuç sergilenmemiştir. Çünkü antioksidant enzimlerin su stresine cevapları oldukça çeşitlilik göstermekte olup, bitkinin türüne, gelişim aşamasına, metabolik durumuna ve stresin şiddetine bağlı olarak değişebilmektedir (Smirnoff, 1993; Iturbe-Ormaetxe vd., 1998).

Mevcut çalışmada diğer bir antioksidant enzim olan GR aktivitesindeki değişimler de araştırılmıştır. Su stresine cevap olarak stomaların kapanması sırasında GR aktivitesinin artması neticesinde fotosentetik ışık reaksiyonunda NADP'nin elektronları kabul edebildiği ve böylece süperoksit radikalının oluşma ihtimalinin azaldığı kaydedilmiştir (Sairam vd., 1997/98). Çalışmamızda yaprak kıvrılma derecesi artarken yaprak ve petiyollerde GR aktivitesinde kontrolle karşılaştırıldığında istatistiki bakımdan önemli bir değişimin olmadığı bulunmuştur. Bu nedenle, yaprak ve petiyolde GR aktivitesinin değişmeme nedeninin stomaların kuraklık periyodu esnasında açık kalmasından ve böylece aşırı seviyede reaktif oksijen türlerinin üretilmemesinden kaynaklanabileceği düşünülebilir. Nitekim, mevcut çalışmada yapraklarda yapılan analizlerde, süperoksit radikallerini temizleyecek olan SOD aktivitesinin değişmemesi bu düşüncemizi desteklemektedir. Ayrıca yaprak ve petiyollerde GR aktivitesinin değişmemesinin diğer bir nedeni de bitkinin yapraklarını kıvrarak aşırı seviyede su eksikliğine maruz kalmasını engellemesi olabilir. Nitekim, literatürdeki bazı çalışmalar bu düşüncemizi destekler niteliktedir. Örneğin Sgherri ve Navari-Izzo (1995), bu açıklamalarımıza benzer olarak GR aktivitesinin su eksikliğinin yoğunluğuna bağlı olduğunu rapor etmiştir. Köklerde ise GR aktivitesinin yaprak kıvrılma derecesi artarken istatistiki bakımdan önemli derecede arttığı görülmüştür.

Bu sonuçlara benzer nitelikte, GR aktivitesinin kuraklık stresine maruz kalmış buğdayda (*Triticum aestivum*) (Burke vd., 1985) ve pamukta (*Gossypium hirsutum*) (Gamble ve Burke, 1984) arttığı kaydedilmiştir. Mevcut çalışmada GR aktivitesinin literatürden farklı değişim göstermesini *C. setosa* türüne özgü bir aktiviteye sahip olmasına da bağlayabiliriz. Nitekim, Castillo (1996)'nın yaptığı araştırmanın sonuçları bu açıklamaları destekler niteliktedir. Bu araştırıcı uzun süreli kuraklık periyodu esnasında, GR aktivitesinin şiddetli derecede su eksikliği olduğu zaman (%50 NSİ) *Sedum album* L.'da arttığı tespit etmiştir. Başka bir çalışmada GR aktivitesinin kuraklık esnasında aynı NSİ'de azaldığının kaydedildiği ve sonuçların literatürden farklı olmasının nedeninin tür farklılığından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Jiang ve Huang, 2001).

Mevcut çalışmada, araştırılan antioksidant enzimlerden biri de peroksidaz enzimidir. Yaptığımız analizler sonucunda yaprak ve petiyolde yaprak kıvrılma derecesinin artışı esnasında peroksidaz aktivitesinin de arttığı belirlenmiştir. Bu bulgular literatürdeki başka çalışmalarla uygunluk içerisindedir. Örneğin, soğanda yapılan benzer bir çalışmada kuraklık esnasında biriken H_2O_2 'in temizlenebilmesi için POD aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir (Egert ve Tevini, 2002). Benzer sonuçlar ıspanak (Tanaka vd., 1990) ve *Sedum album* yapraklarında (Castillo, 1996) yapılan çalışmalarda da ortaya konulmuştur. Diğer taraftan, peroksidazların bitki hücrelerinde çeperin uzama özelliği ile ilişkili olduğu ve lignin biyosentezindeki son enzimatik adımı kataliz ettikleri kaydedilmiştir (Hinman ve Lang, 1965; Mader ve Füssl, 1982). Bu nedenle araştırmamızda POD aktivitesindeki artışların asıl nedeninin antioksidant sistemde rol almasından ziyade, bitkide stres esnasında lignifikasyona katkı sağlamasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Diğer taraftan, peroksidaz enziminin bitkinin dayanıklılığının bir göstergesi olduğu (Hammerschmidt vd., 1982, Dalisay ve Kue, 1995) ve POD aktivitesinin kuraklığa dirençli olan buğday çeşitlerinde artış gösterdiği rapor edilmiştir (Sairam vd., 2001). Bu nedenle *C. setosa*'da yaprak kıvrılma derecesi artarken POD aktivitesinin artmasının kuraklık koşullarında bitkiye dayanıklılık sağladığını söylemek mümkündür. Kökte ise POD aktivitesinin istatistiki bakımdan önemli derecede azaldığı görülmüştür. Bu sonuçtan hareketle kökteki POD enziminin rolünü, daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu saptadığımız GR enzimi üstlenmiş olabilir. Nitekim, GR enziminin POD enzimine benzer olarak, hücre içerisindeki H_2O_2 gibi oksidatif stres ürünlerinin temizlenmesinde rol aldığı ve böylece oksidatif stresin olumsuz etkilerinin onarılmasına yardımcı olabileceği ileri sürülmüştür (Sairam vd., 1997/98).

Mevcut araştırmada, bitkinin yaprak ve petiyollerinde SOD ve GR enzimlerinden farklı olarak POD enziminin aktivitesinde bariz artışlar gözlenmiştir. Bu nedenle peroksidazların poliakrilamid jel elektroforezi ile daha ayrıntılı araştırılması amaçlanmıştır. Bu metotla elde ettiğimiz sonuçlar incelendiğinde, *C. setosa*'nın yapraklarında Rf değerleri sırasıyla 0,05, 0,17 ve 0,2 olan 3 tane izoenzim bandı belirlenmiştir. Kontrolde ve yüksek yaprak kıvrılma derecelerinde 0,2 Rf değerine karşılık gelen bir bandın % 19'luk yaprak kıvrılma derecesinde bulunmadığı ve böylece kontrolde 3 tane olan izoenzim bant sayısının bu kıvrılma derecesinde 2 tane olduğu görülmüştür. Petiyollerde ise Rf değerleri 0,16; 0,19; 0,34 ve 0,37 olan 4 adet izoenzim bandı gözlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda genel olarak incelendiğinde yaprak ve petiyoldeki bazı izoenzim bantlarının yaprak kıvrılma derecesine bağlı olarak koyuluk ve kalınlıklarının giderek arttığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla yaprak kıvrılma derecesindeki artışın bitkiyi strese karşı daha toleranslı hale getirebileceği düşünülebilir. Nitekim, POD enziminin strese toleransla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Sgherri vd., 2000; Sairam vd., 2001). Tanaka vd. (1990), ise su stresi altındaki ıspanak yapraklarındaki POD aktivitesinin arttığını ve strese karşı toleranslarının geliştiğini rapor etmişlerdir.

Antioksidant enzim aktiviteleri ile ilgili elde edilen bulgularımıza dayanarak, lipid peroksidasyonunun yaprak ve petiyolde % 55, kökte ise % 72 yaprak kıvrılma derecelerinden sonra azalmasına kıvrılma esnasında yapraklarda POD, kökte ise GR aktivitesinin katkı sağlayabileceğini ifade edebiliriz.

Antioksidant enzimlerden olmayan fakat stres koşullarında etkilenen enzimlerden biri de azot metabolizmasında rol alan nitrat redüktaz enzimidir. Araştırmamızda kuraklık periyodu esnasında bu enzimin aktivitesindeki değişimler de araştırılmıştır. NR aktivitesinin yaprak, petiyol ve kökte azaldığı saptanmış ve bu azalmalar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Literatürde yapılan başka çalışmalarda da su stresi ve osmotik stres koşulları altında NR aktivitesinin azaldığı ileri sürülmüştür (Ackerson vd., 1977; Larsson vd., 1989; Foyer vd., 1998). Örneğin çalışmamıza benzer olarak, pirincin hem sürgün hem de köklerinde yapılan analizler sonucunda, NR aktivitesinin su stresi koşullarında azaldığı kaydedilmiştir (Pandey ve Agarwal, 1998). Literatürde yapılan çalışmalarda stres esnasında NR aktivitesindeki azalmanın bir çok nedenlerden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir. Örneğin bazı araştırmacılar su stresi esnasında NR aktivitesindeki azalmanın nedenini enzimin inaktivasyonuna (Sinha ve Nicholas, 1981), nitratın yaprağa taşınma

oranının azalmasına (Shaner ve Boyer, 1976), protein sentezinin inhibisyonuna (Plaut, 1974) bağlanmışlardır.

Çalışmamızda ise yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca, NR aktivitesindeki azalışın bitkinin dayanıklılığına aşağıdaki yollarla katkı sağlaması olasıdır: 1) NR aktivitesinin azalması kuraklık esnasında nitrat asimilasyonunu durdurarak bitkiye biyokimyasal bir adaptasyon sağlamış olabilir (Hanson ve Hitz, 1982). 2) Aktivitenin azalması sonucunda hücre içindeki nitrat miktarı artmış ve böylece osmotik ayarlamaya katkı yapmış olabilir (Cornic, 1994). *C. setosa*'da yapılan başka bir çalışmada prolin ve indirgen şeker gibi osmotik ayarlamaya katkı sağlayan bileşiklerin yaprak kıvrılması esnasında arttığı rapor edilmiştir (Kadioğlu ve Turgut, 1999). Bu nedenle yüksek osmotik ayarlama mekanizmasına sahip olan bu bitkide nitrat miktarını azaltmamak amacıyla NR aktivitesinin azalmış olabileceği düşünülebilir.

Stres esnasında etkilenen parametreler arasında içsel hormon seviyeleri de yer almaktadır. Bu nedenle *C. setosa* yapraklarında GA₃, IAA, Z ve ABA'nın yaprak kıvrılması esnasındaki değişimleri araştırılmış ve yaprak kıvrılması derecesi artarken içsel IAA miktarlarının kontrole oranla önce arttığı sonra ise azaldığı görülmüştür. Bu sonuçları destekler nitelikte başka çalışmalarda da kuraklığın bitki büyüme hormonlarının içeriği üzerine etkileri araştırılmış ve IAA içeriğinin stres esnasında azaldığı bulunmuştur (Cellier vd.,1998). Diğer taraftan çalışmamızda, GA₃ içeriğinin yaprak kıvrılması ile orantılı bir değişkenlik göstermediği bulunmuştur. Dolayısıyla bu hormonun seviyesindeki değişimlerin, kuraklık stresinden değil de bitkinin gelişimi gibi başka nedenlerden kaynaklanabileceği söylenebilir. Nitekim, Hosoki vd. (1987)'nin stres şartlarındaki kavunda yaptıkları çalışmalar bu bulgularımızı desteklemektedir. Bu araştırmacılar, GA₃'nin su kaybını kontrol etmede diğer hormonlardan daha az önemli olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Ayrıca, çalışmamızda zeatin ve ABA miktarlarının istatistiki bakımdan önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. Başka çalışmalarda da düşük su potansiyelinde ABA seviyesinde önemli artışların olduğu ileri sürülmüştür (Wright, 1969; Larsson vd., 1989; Ederli vd., 1997; Stikic ve Davies, 2000). Diğer taraftan, çalışmamızda ABA seviyesinin % 72 ve % 79 yaprak kıvrılma derecelerinde artması ABA'nın bitkinin toleransına katkı sağladığını göstermektedir. Nitekim, su stresi koşullarında üretilen ABA'nın kuraklığa karşı toleransta önemli bir rol oynadığı kaydedilmiştir (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Price vd. (2002), ise yaprak kıvrılması ve ABA üretiminin artmasının su eksikliğinin olumsuz etkilerini azalttığını ileri sürmüşlerdir. Diğer taraftan, sitokininlerin

su ve sıcaklık streslerine toleranslı olan kloroplast tiplerinin oluşumunu uyardığı (Lichtenthaler vd., 1981) ve belli proteinlerin sentezini teşvik ederek su stresinin bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerini azalttığı (Chernyadev, 1997) rapor edilmiştir. Çalışmamızda yaprak kıvrılma derecesi artarken zeatin miktarının da artması bu düşünceyi desteklemektedir.

Yaprakların kıvrılma periyodunda büyüme hormonlarının seviye' ne genel olarak bakıldığında ise yüksek kıvrılma derecelerinde GA₃ ve IAA seviyesinin önemli derecede azaldığı, zeatin ve ABA seviyelerinin ise arttığı bulunmuştur. Bu nedenle ancak yüksek derecedeki yaprak kıvrılması esnasında içsel hormon seviyesinin etkilendiği fikri güçlenmiştir.

Mevcut araştırmada, kuraklık stresine cevap olarak bazı moleküler parametreler de tayin edilmiştir. Bunlar RNA miktarı, RNA profili ve gen seviyesinde yapılan tayinlerdir. *C. setosa*'da yaprak kıvrılması esnasında RNA seviyesinin azaldığı belirlenmiştir. Barathi vd. (2001)'nin yapmış olduğu çalışmalar bu bulgularımızı desteklemektedir. Bu araştırmacılar, dut bitkisinde su stresi esnasında kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında RNA içeriğinde belirgin bir azalma gözlemişlerdir. Başka çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin kantitatif analiz sonucunda kloroplast RNA'larının su stresi esnasında azaldığı belirlenmiştir (Yordanov vd., 2000).

Çalışmamızda RNA'ların agaroz jel elektroforezi sonuçlarına bakıldığında ise kloroplast ve mitokondi RNA'larına ait bazı bantların % 55 ve % 79 yaprak kıvrılma derecelerinde, kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında yoğunluklarının arttığı gözlenmiştir. Bu nedenle muhtemelen kloroplast veya mitokondride bulunan bazı proteinleri sentezleyen transkriptlerin yaprak kıvrılması esnasında seviyelerinin arttığı düşünülmektedir. Nitekim, bir çok bitki türünde stres esnasında bazı genlerde transkripsiyonel seviyede değişimlerin meydana geldiği ileri sürülmüştür (Mittler ve Zilinskas, 1994; Ashok vd., 2001). Çalışmamızda bazı transkriptlerin seviyeleri artarken RNA miktarının azalması ise NR enzimini kodlayan transkriptler gibi bazı enzim veya proteinlere ait transkriptlerin seviyelerinin azalmasından kaynaklanabileceğini söyleyebiliriz. Nitekim mevcut çalışmamızda NR aktivitesinde ve daha önce protein sentezinde (Kadioğlu ve Turgut, 1999) belirlediğimiz azalmalar bu ifademizi desteklemektedir.

Son yıllarda yaprak kıvrılmasını kontrol eden gen bölgesini bulmaya yönelik, pirinç ve şeker kamışında klonlama çalışmaları yapılmış ve bazı veriler elde edilmiştir (Carson ve Botha, 2000; Price vd., 2002). Diğer taraftan, çoğu bitkilerde kuraklık tarafından uyarılan

bazı genler tanımlanmasına rağmen, bitkilerin su stresine toleransındaki moleküler esaslar hala tam olarak açıklanamamıştır (Ashok vd., 2001). Çalışmamızda ise 18S rRNA ve su stresi tarafından uyarılan lp3 geni esas alınarak dejenerat primerler düzenlenmiş ve DNA baz dizileri elde edilmiştir. Bitkinin 18S rRNA geninin baz dizisi gen bankasında var olan diğer bitkilere ait baz dizileri ile karşılaştırıldığında bu sıranın *C. setosa* ile aynı familyaya ait üç türe (*Maranta bicolor*, *Calathea loeseneri*, *Marantochloa atropurpurea*) % 98-99 oranında yüksek bir benzerlik göstermesi bu sıranın doğruluğunu teyit etmektedir. Bundan sonra yapılacak olan diğer PCR çalışmalarında bu sıranın kontrol olarak kullanılabileceğini ifade edebiliriz. Ayrıca mevcut çalışmada *Pinus taeda*'dan elde edilen Lp3 geni esas alınarak dizayn edilen dejenerat primerler kullanılarak *C. setosa*'da elde edilen baz dizisinin bitki genomunun su eksikliği stresine cevap veren bölümlerle ilgili olabileceği kanaatine varılmıştır. Nitekim, *Pinus taeda* L.'da lp3 geninin su eksikliği stresi tarafından uyarılan bir gen olduğu rapor edilmiştir (Padmanabhan vd., 1997). Diğer taraftan yapılan bir çalışmada stres esnasında bazı genlerin uyarılmasının bitkinin strese karşı adaptasyonunu güçlendirdiği ileri sürülmüştür (Bray, 1997). Bu nedenle, *C. setosa*'da elde edilen bu sıranın bitkinin strese karşı adaptasyonu ile ilgili olabileceği fikri güçlenmiştir. Diğer taraftan karakterize edilemeyen bu baz sırasının bir proteini kodlayıp kodlamadığı konusunda bir bilgiye sahip değiliz. Bununla beraber bu sıranın 6 farklı yönden translasyonu yapıp gen bankasındaki mevcut bilgilerle karşılaştırıldığında, 3'5' ve 3. yönden elde edilen amino asit dizisinin *Arabidopsis thaliana* başta olmak üzere bitkilere ait transkripsiyon faktörlerine % 50'den fazla benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Dolayısıyla, mevcut baz sırasından bu aminoasit dizisinin oluşma ihtimalinin yüksek olduğunu söylemek mümkündür.

Sonuç olarak; çalışmamızda elde edilen bulgulara göre, *C. setosa*'nın yaprak kıvrılma cevabının yanı sıra bazı biyokimyasal ve moleküler seviyedeki mekanizmaların da uyarılmasıyla kuraklık stresine ortak bir tolerans gösterdiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca söz konusu bu mekanizmaların sadece yapraklarda değil, bitkinin diğer kısımlarını oluşturan petiyol ve köklerde de aktif olduğu saptanmıştır.

5. SONUÇLAR

1) Kuraklık stresine maruz bırakılan *Ctenanthe setosa*'da yaprak kıvrılma derecesinin (%) artışı boyunca, nispi su içeriğinin azaldığı, kök:sürgün oranının arttığı, toplam klorofil, klorofil a/b oranı ile klorofil kararlılık indeksinin % 36 yaprak kıvrılma derecesine kadar azaldığı, daha sonraki kıvrılma derecelerinde arttığı, toplam karotenoid, miktarının ise % 55 yaprak kıvrılma derecelerine (%) kadar azaldığı, daha sonraki kıvrılma derecelerinde de arttığı bulunmuştur.

2) Bitkilerde lipid peroksidasyonunun meydana geldiğini gösteren MDA içeriğinin yaprak kıvrılma derecesinin artışı esnasında yaprak ve petiyolde % 36 yaprak kıvrılma derecesine kadar arttığı, daha sonraki kıvrılmalarda da azaldığı, köklerde ise % 55 yaprak kıvrılma derecesine kadar arttığı, sonra ise azaldığı görülmüştür.

3) Yaprak kıvrılma derecesinin artışı süresince, SOD aktivitesinin yapraklarda önemli derecede değişiklik göstermediği, petiyol ve kökte ise % 19 yaprak kıvrılma derecesinde sırasıyla % 12 ve % 11,5 oranında azaldığı fakat bu azalmanın sonraki kıvrılma derecelerinde artarak kontrol seviyesine ulaştığı saptanmıştır.

4) GR aktivitesinin yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca, yapraklarda kontrole göre önce arttığı sonra azaldığı daha sonra yine arttığı kaydedildi. Bununla beraber aktivitedeki değişimlerin kontrole oranla istatistiki bakımdan önemli olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışma sonucunda petiyolde de GR aktivitesinin değişmediği fakat kökte önemli derecede arttığı bulunmuştur.

5) Kuraklık periyodu boyunca artan yaprak kıvrılma derecelerinde, peroksidaz aktivitesinin bitkinin yaprak ve petiyolünde istatistiki bakımdan önemli derecede arttığı, kökünde ise azaldığı belirlenmiştir. Poliakrilamid jel elektroforezi sonucunda yapraklarda Rf değerleri sırasıyla 0,05, 0,17 ve 0,2 olan 3 tane peroksidaz izoenzim bandının olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kontrolde ve yüksek yaprak kıvrılma derecelerinde 0,2 Rf değerine karşılık gelen bir bandın % 19 kıvrılma derecesinde bulunmadığı ve böylece 3 tane olan izoenzim bant sayısının 2 tane olduğu görülmüştür. Petiyolde ise Rf değerleri 0,16; 0,19; 0,34 ve 0,37 olan 4 adet izoenzim bandı ölçülmüş ve bu bantların aktifliğinin yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca giderek arttığı tespit edilmiştir.

6) Bitkinin yaprak, petiyol ve köklerinde yapılan analizler sonucunda NR aktivitesinin istatistiki bakımdan önemli derecede azaldığı bulunmuştur.

7) Yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca, *C. setosa* yapraklarında endojenik GA miktarının % 36 kıvrılma derecesine kadar istatistiki bakımdan önemli derecede arttığı, % 55 kıvrılma derecesinde azaldığı ve daha sonraki kıvrılmalarda yine arttığı saptanmıştır. IAA miktarının da kontrole oranla % 36 kıvrılma derecesine kadar arttığı sonraki kıvrılmalarda azaldığı görülmüştür. Bununla beraber zeatin ve ABA miktarının ise arttığı belirlenmiştir.

8) Kontrol bitkileri ve % 55 ve 79 yaprak kıvrılma derecelerinde yapılan RNA izolasyonları sonucunda, RNA miktarının kontrole göre istatistiki olarak önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir.

9) RNA profilinde meydana gelen değişimleri belirlemek için yapılan agaroz jel elektroforezi sonucunda kontrol bitkilerinde 4 adet ve kıvrılmış bitkilerde 5 adet küçük RNA bantları gözlenmiştir. Ayrıca bu bantların kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında stres esnasında bazılarının daha belirgin hale geldiği, bazılarının ise yoğunluğunun arttığı saptanmıştır.

10) *C. setosa*'nın yaprak kıvrılma mekanizmasının yanı sıra nispi su içeriği, kök:sürgün oranı, fotosentetik pigmentler, lipid peroksidasyonu, bazı antioksidant enzimler, NR enzimi ve bazı büyüme hormonlarının seviyelerindeki değişimler ile artan bazı transkriptlerin katkılarıyla kuraklık stresine tolerans gösterebileceği sonucuna varılmıştır.

11) Bu çalışma sonucunda, *C. setosa*'da 18S rRNA geni ilk defa belirlenmiş ve su stresi şartlarında uyarılan lp3 geni esas alınarak dizayn edilen dejenerat primerler kullanılarak karakterize edilemeyen bir DNA baz dizisi elde edilmiştir.

6. ÖNERİLER

Ctenanthe kuraklık stresine karşı adaptasyon yeteneği yüksek ve laboratuvar koşullarında yetiştirilmesi nispeten kolay olan model bir bitkidir. Bu bitki üzerinde sürekli çalışmalar yapmamızın asıl nedeni, bitkinin stomalarını kapatmayarak, yapraklarını kıvrırmak suretiyle kurak bir ortamda uzun süre yaşamına devam etmesidir. Yaprak kıvrılma mekanizmasının en büyük avantajı, daha önce belirtildiği gibi bitkinin stomalarını kapatmamasından dolayı fotosentez olayının belirli bir seviyede devam etmesidir. Yaprak kıvrılması olmayan bitkilerin kuraklığa maruz kalması sonucunda genelde stomalarını kapatarak belirli bir süre bu stres durumundan sakınmaya çalışmakta, stresin uzaması sonucu ise besin sentezi (fotosentez) yapamamasından dolayı ölümlü söz konusu olabilmektedir. Dünyadaki tarım alanlarında karşılaşılan en önemli olumsuzluklardan birisinin kuraklık olmasından dolayı, *Ctenanthe setosa*'da ve diğer bazı Gramineae türlerinde mevcut olan yaprak kıvrılma veya katlanma mekanizmasının diğer kültür bitkilerine kazandırılmasının verim artışında çok önemli rol oynayacağı açıktır. Yaprak kıvrılma mekanizmasının çalışması bakımından yukarıda belirtildiği gibi iyi bir model bitki olan *Ctenanthe setosa*'da kuraklık stresi esnasında meydana gelen değişimlerin ayrıntılı olarak bilinmesi önemlidir. Burada asıl önemli olan, bu olayın gen seviyesindeki kontrolünün belirlenmesidir. Bu olaydan sorumlu genlerin tanımlanmasında sonra, kültür bitkilerine bu genlerin aktarılması diğer araştırılması gereken önemli konulardan biridir.

Yaprak kıvrılma mekanizmasının araştırıldığı mevcut çalışmamızda, kıvrılma derecesi artarken antioksidant sistemde rol alan bazı enzimlerdeki değişim belirlenmiştir. Bu mekanizmanın daha ayrıntılı olarak incelenebilmesi için antioksidant sistemde rol alan enzimatik olmayan antioksidantların araştırılmasına ve kuraklık stresi ile ilgili enzimleri kodlayan genlerin ifadelerinin incelenmesine gereksinim duyulmaktadır.

Klonlama çalışmalarımızın sonucunda ise *Ctenanthe setosa* bitkisine ait 18S rRNA geninin baz dizisi belirlenmiştir. Bundan sonra yapılacak olan diğer PCR çalışmalarında bu sıranın kontrol olarak kullanılabileceği kanaatindeyiz. Ayrıca çalışmamızda su stresi şartlarında uyarıldığı bilinen lp3 geni esas alınarak dizayn edilen dejenerat primerler *C. setosa*'nın genomuna klonlanarak bu bitkiye ait karakterize edilemeyen bir baz dizisi elde edilmiştir. Bundan sonraki yaprak kıvrılmasını kontrol eden genin bulunmasına yönelik araştırmaların devam etmesi gerektiği düşüncesindeyiz.

7. KAYNAKLAR

- Ackerson, R.C., Krieg, D.R., Haring, C.L. ve Chang, N., 1977. Effects of Plant Water Status on Stomatal Activity, Photosynthesis and Nitrate Reductase Activity of Field Grown Cotton, Crop Sci., 17, 81-84.
- Ackerson, R.C., Kreig, D.R. ve Sung, F.J.M., 1980. Leaf Conductance and Osmoregulation of Field Grown Sorghum Genotypes, Crop Sci., 20, 10-14.
- Ackerson, R.C. ve Hebert, R.R., 1981. Osmoregulation in Cotton in Response to Water Stress. I. Alteration in Photosynthesis, Leaf Conductance, Translocation, and Ultrastructure, Plant Physiol., 67, 484-488.
- Alscher, R.G., Donahue, J.L. ve Cramer, C.L., 1997. Reactive Oxygen Species and Antioxidants: Relationships in Green Cells, Physiol. Plant., 100, 224-233.
- Anikiev, V.V. ve Kuramagomedov, M.K., 1975. Activity of Nitrate Reductase in Leaves of Barley Shoots at Different Levels of Soil Moisture, Soviet Plant Physiol., 22, 293-297.
- Arnon, D.I., 1949. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*, Plant Physiol., 24, 1-15.
- Arora, A. ve Mohan, J., 2001. Expression of Dwarfing Genes under Nitrogen and Moisture Stress in Wheat (*Triticum spp*): Dry Matter partitioning, Root Growth and Leaf Nitrogen, J. Agronomy & Crop Sci., 186, 111-118.
- Ashok, K. J., Basha, S. M. ve Holbrook, C. C., 2001. Identification of Drought-Responsive Transcripts in Peanut (*Arachis hypogaea* L.), J. Biotechnology, 15, 59-67.
- Ayaz, F.A., 1999. Mısır (*Zea mays* L.) Fidelerinin Düşük ve Yüksek Sıcaklığa Adaptasyonunda Büyümeği Düzenleyici Maddelerin Rolü, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Ayaz, F.A., Kadioğlu, A. ve Turgut, R., 2000. Water Stress Effects on The Content of Low Molecular Weight Carbohydrates and Phenolic Acids in *Ctenanthe setosa* (Rosc.) Eichler (Marantaceae), Can.J. Plant Sci., 80, 373-378.
- Baisak, R., Rana, D., Acharya, P.B. ve Kar, M., 1994. Alterations in The Activities of Active Oxygen Scavenging Enzymes of Wheat Leaves Subjected to Water Stress, Plant Cell Physiol., 35, 489-495.
- Barathi, P., Sundar, D. ve Reddy, A.R., 2001. Changes in Mulberry Leaf Metabolism in Response to Water Stress, Biol. Plant., 44, 83-87.
- Bardzik, J.M., Marsh, H.V.J. ve Havis, J.R., 1971. Effects of Water Stress on The Activities of Three Enzymes in Maize Seedlings, Plant Physiol., 47, 828-831.

- Bartoli, C.G., Simontacchi, M., Tambussi, E. ve Beltrano, J., 1999. Drought and Watering-Dependent Oxidative Stress: Effect on Antioxidant Content in *Triticum aestivum* L. Leaves, J. Exp. Bot., 50, 375-383.
- Bastide, B., Sipes D., Hann, J. ve Ting, I. P., 1993. Effect of Severe Water Stress on Aspects of Crassulacean Acid Metabolism in *Xerosicyos*, Plant Physiol., 103, 1089-1096.
- Beardsell, M.F. ve Cohen, D., 1975. Relationships between Leaf Water Status, Abscisic Acid Levels and Stomatal Resistance in Maize and *Sorghum*, Plant Physiol., 56, 207-212.
- Beauchamp, C. ve Fridovich, I., 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and An Assay Applicable to Acrylamide Gels, Anal. Biochem., 44, 276-287.
- Begg, J.E., 1980. Morphological Adaptation of Leaves to Water Stress, In: Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress, Turner, N.C. ve Kramer, P.J., Eds., John Wiley & Sons, New York, 33-42.
- Bidwell, R.G.S., 1974. Plant Physiology, Giles, McMillan Co., New York.
- Björkman, O. ve Demmig-Adams, B., 1993. Regulation of Photosynthetic Light Energy Capture, Conversion and Dissipation in Leaves of Higher Plants, In: Ecophysiology of Photosynthesis, Shulze, E. D. ve Caldwell, M. M. Eds., Springer-Verlag, Berlin, 17-47.
- Blum, A., 1988. Plant Breeding for Stress Environments, CRC Press, Boca Raton, USA, 1-223.
- Bohnert, H.J. ve Sheveleva, E., 1998. Plant Stress Adaptations, Making Metabolism Move, Current Opinion in Plant Biology, 1, 267-274.
- Borsani, O., Diaz, P., Agius, M.F., Valpuesta, V. ve Monza, J., 2001. Water Stress Generates An Oxidative Stress through The Induction of A Specific Cu/Zn Superoxide Dismutase in *Lotus corniculatus* Leaves, Plant Sci., 161, 757-763.
- Bowler, R.C., Van Montagu, M. ve Inze, D., 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance, Ann. Rev. Plant Physiol., 43, 83-116.
- Boo, Y.C. ve Jung, J., 1999. Water Deficit-Induced Oxidative Stress and Antioxidative Defenses in Rice Plants, J. Plant Physiol., 155, 255-261.
- Bray, E.A., 1988. Drought and ABA-Induced Changes in Polypeptide and mRNA Accumulation in Tobacco Leaves, Plant Physiol., 88, 1210-1214.
- Bray, E.A., 1991. Regulation of Gene Expression by Endogenous ABA during Drought Stress, In: Abscisic Acid: Physiology and Biochemistry, Davies, W.J. ve Jones, H.G., Eds., Bios Scientific Publishers, Oxford, 81-96.

- Bray, E.A., 1993. Molecular Responses to Water Deficit. Plant Physiol., 103, 1035-1040.
- Bray, E.A., 1997. Plant Responses to Water Deficit. Trends in Plant Science, 2, 48-54.
- Brickell, C., 1989. The Royal Horticultural Society Gardeners' Encyclopedia of Plants and Flowers, Dorling Kindersley, London.
- Burke, J.J., Gamble, P.E., Hatfield, J.L. ve Quisenberry, J.E., 1985. Plant Morphological and Biochemical Responses to Field Water Deficits. I. Responses to Glutathione Reductase Activity and Paraquat Sensitivity, Plant Physiol., 79, 415-419.
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of Oxygen Toxicity, Annu. Rev. Biochem., 58, 79-110.
- Carson, D.L. ve Botha, F.C., 2000. Preliminary Analysis of Expressed Sequence Tags for Sugarcane, Crop Sci., 40, 1769-1779.
- Castillo, F.J., 1996. Antioxidative Protection in the Inducible CAM Plant *Sedum album* L. Following the Imposition of Severe Water Stress and Recovery, Oecologia, 107, 469-477.
- Cellier, F., Conejero, G., Breitler, J.C. ve Casse, F., 1998. Molecular and Physiological Responses to Water Deficit in Drought-Tolerant and Drought-Sensitive Lines of Sunflower, Plant Physiol., 116: 319-328.
- Champoux, M.C., Wang, G., Sarkarung, S., Mackill, D.J., O'Toole, J.C., Huang, N. ve McCouch, S.R., 1995. Locating Genes Associated with Root Morphology and Drought Avoidance in Rice via Linkage to Molecular Markers, Theor. Appl. Genet., 90, 969-981.
- Chandler, P.M. ve Robertson, M., 1994. Gene Expression Regulated by Abscisic Acid and its Relation to Stress Tolerance. Ann. Review Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 45, 113-141.
- Chandrasekar, V., Sairam, R.K. ve Srivastava, G.C., 2000. Physiological and Biochemical Responses of Hexaploid and Tetraploid Wheat to Drought Stress, J. Agron. Crop Sci., 185, 219-227.
- Chen, H.H., Li, P.H. ve Brenner, M.L., 1983. Involvement of Abscisic Acid in Potato Cold Acclimation, Plant Physiol., 71, 362-365.
- Chernyadev, I.I., 1997. Plant Photosynthesis under Conditions of Water Stress and the Protective Effect of Cytokinins, Appl. Biochem. Microbiol., 33, 1-12.
- Chowdury, S.R. ve Choudhuri, M.A., 1985. Hydrogen Peroxide Metabolism as An Index of Water Stress Tolerance in Jute, Physiol. Plant., 65, 503-507.
- Clarke, J.M., 1986. Effect of Leaf Rolling on Leaf Water Loss in *Triticum spp.*, Can. J. Plant Sci., 66, 885-891.

- Cornic, G., 1994. Drought Stress in High Light Effects on Leaf Photosynthesis. In: *Photoinhibition of Photosynthesis from Molecular Mechanisms to The Field*, Baker, N.R., Bowyer, J.R., Eds., Bioscientific Publishers, Oxford, 297-313.
- Creissen, G., Edwards, E.A. ve Mullineaux, P.M., 1994. Glutathione Reductase and Ascorbate Peroxidase, In: *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, Foyer, C.H. ve Mullineaux, P.M., Eds., CRC Press, Boca Raton, 343-364.
- Curry, J. ve Walker-Simmons, M.K., 1993. Unusual Sequence of Group 3 LEA (II) mRNA Inducible by Dehydration Stress in Wheat, *Plant. Mol. Biol.*, 21, 907-912.
- Cutting, J.G.M., 1991. Determination of the Cytokinin Complement in Healthy and Witchesbroom Malformed Protease, *Plant Growth Regul.*, 10, 85-89.
- Dahan, Y.G., Yaniv, Z. Zilinskas, B.A. ve Ben-Hayyim, G., 1997. Salt and Oxidative Stress: Similar and Specific responses and Their Relation to Salt Tolerance in Citrus, *Planta*, 203, 460-469.
- Dalisay, R.F. ve Kue, J.A., 1995. Resistance of Reduced Penetration by *Colletotrichum lagenarium* into Cucumber leaves with Induced Systemic Resistance and its Relation to Enhanced Peroxidase and Chitinase Activity, *Physiol Mol. Plant Pathol.*, 47, 315-327.
- Dhindsa, R.S. ve Matowe, W., 1981. Drought Tolerance in Two Mosses: Correlated with Enzymatic Defence against Lipid Peroxidation, *J. Exp. Bot.*, 32, 79-91.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. ve Thorpe, T.A., 1981/82. Leaf Senescence Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation, and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase, *J. Exp. Bot.*, 32, 93-101.
- Dhindsa, R.S., 1991. Drought Stress, Enzymes of Glutathione Metabolism, Oxidation Injury, and Protein Synthesis in *Tortula ruralis*, *Plant Physiol.* , 95, 648-651.
- Dingkuhn, M., Cruz, R.T., O'Toole, J.C. ve Dörffling, K., 1989. Net Photosynthesis, Water Use Efficiency, Leaf Water Potential and Leaf Rolling as Affected by Water Deficit in Tropical Upland Rice, *Australian J. Agric. Research*, 40, 1171-1181.
- Ederli, L., Pasqualini, S., Batini, P., Antonielli, M., 1997. Photoinhibition and Oxidative Stress: Effects on Xanthophyll Cycle, Scavenger Enzymes and Abscisic Acid Content in Tobacco Plants, *Plant Physiol.*, 151, 4, 422-428.
- Egert, M. ve Tevini, M., 2002. Influence of Drought on Some physiological Parameters Symptomatic for Oxidative Stress in Leaves of Chives (*Allium schoenoprasum*), *Environ. Exp. Bot.*, 48, 43-49.

- Egneus, H., Heber, U. ve Kirk, M., 1975. Reduction of Oxygen by The Electron Transport Chain of Chloroplasts during Assimilation of Carbon Dioxide, Biochim. Biophys. Acta, 408, 252-268.
- Ekanayake, I.J., De Datta , S.K. ve Steponkus, P.L., 1993. Effect of Water Deficit Stress on Diffusive Resistance, Transpiration, and Spikelet Desiccation of Rice (*Oryza sativa* L.), Ann. Bot., 72, 73-80.
- Elstner, E.F., 1987. Metabolism of Activated Oxygen Species, In: The Biochemistry of Plants, Davies, D.D. Ed., Vol II, Academic Press, USA, 253-315.
- Elstner, E.F., Osswald, W., 1994. Mechanisms of Oxygen Activation during Plant Stress, Proc. Royal Soc. Edinburgh Biol., 102, 131-154.
- Espelie, K.E., Franceschi, V.R. ve Kolattukudy, P.E., 1986. Immunocytochemical Localization and Time Course of Appearance of Anionic Peroxidase Associated with Suberization in Wound-Healing Potato Tuber Tissue, Plant Physiol., 81, 487-492.
- Feng, Y.L., Cao, K.F. ve Feng, Z.L., 2002. Thermal dissipation, Leaf Rolling and Inactivation of PSII Reaction Centres in *Amomum villosum*. J. Tropical Ecol., 18, 865-872.
- Flower, D.J. ve Ludlow, M.M., 1986. Contribution of Osmotic Adjustment to The Dehydration Tolerance of Water Stressed Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) Millsp. Leaves, Plant Cell Environ., 9, 33-40.
- Foyer, C.H. ve Halliwell, B., 1976. The Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplasts: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism, Planta, 133, 21-25.
- Foyer, C.H., Valadier, M.H., Migge, A. ve Becker, T.W., 1998. Drought-Induced Effects on Nitrate Reductase Activity and mRNA and on the Coordination of Nitrogen and Carbon Metabolisms in Maize Leaves, Plant Physiol., 117, 283-292.
- Fridovich, L., 1986. Biological Effect of Superoxide Radical, Arch. Biochem. Biophys., 247, 1-11.
- Fu, J. ve Huang, B., 2001. Involvement of Antioxidants and Lipid Peroxidation in The Adaptation of Two Cool-Season Grasses to Localized Drought Stress, Envir. Exp. Bot., 45, 105-114.
- Gamble, P.E. ve Burke, J.J., 1984. Effect of Water Stress on The Chloroplast Antioxidant System. I. Alterations in Glutathione Reductase Activity, Plant Physiol., 76, 615-621.

- Gaspar, L., Sarvari, E., Molnar, I., Stehli, L., Molnar-Lang, M. ve Galiba, G., 2002. Structural Changes of The Photosynthetic Apparatus under Osmotic Stress in Different *Triticum aestivum* and *Aegilops biuncialis*, Acta Biologica Szegediensis, 46, 91-93.
- Gillham, D.J. ve Dodge, A.D., 1987. Chloroplast Superoxide and Hydrogen Peroxide Scavenging Systems from Pea Leaves: Seasonal Variations, Plant Sci., 50, 105-109.
- Gosti, F., Bertauche, N., Vartanian, N. ve Giraudal, J., 1995. Abscisic Acid-Dependent and Independent regulation of Gene Expression by Progressive Drought in *Arabidopsis thaliana*, Molecular and General Genetics, 246, 10-18.
- Grisebach, H., 1981. Lignins, In: The Biochemistry of Plants, Stumpf, P.K. ve Conn, E.E., Eds., Vol. 7, Academic Press, USA, 457-478.
- Gupta, S.C. ve Beevers, L., 1983. Environmental Influences on Nitrite Reductase Activity in *Pisum sativum* L. Seedlings, J. Exp. Bot., 34, 1455-1462.
- Hale, M.G., ve Orcutt, D.M., 1987. The Physiology of under Stress, John Wiley & Sons, New York, USA.
- Hammerschmidt, R., Nuckles, E.M. ve Kue, J., 1982. A Association of Enhanced Peroxidase Activity with Induced Sistemic Resistance of Cucumber to *Colletotrichum lagenarium*, Physiol. Mol. Plant. Pathhol. 20, 73-82.
- Handa, S., Bressan, R.A., Handa, A.K., Carpita, N.C. ve Hasegawa, P.M., 1983. Solutes Contributing to Osmotic Adjustment in Cultured Plant Cells Adapted to Water Stress, Plant Physiol., 73, 834-843.
- Hanson, A.D. ve Hitz, W.D., 1982. Metabolic Responses of Mesophytes to Plant Water Deficits, Annual Rev. Plant Physiol., 33, 163-203.
- Hartung, W. ve Davies, W.J., 1991. Drought-Induced Changes in Physiology and ABA, In: Abscisic Acid: Physiology and Biochemistry, Davies, W.J., ve Jones, H.G. Eds., Bios Scientific Publishers Ltd., UK, 63-80.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Handa, S. ve Handa, A.K., 1984. Cellular Mechanisms of Tolerance to Water Stress, Hort Sci., 19, 371-377.
- Hasman, M., 1972. Bitkilerin Metabolizma Fizyolojisi, İstanbul Üniv. Yayınları, No 12, İstanbul, 253-254.
- Heath, R.L. ve Packer, L., 1968. Photoperoxidation in Isolated Chloroplast. I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation, Arch. Biochem. Biophys., 125, 189-198.

- Heckathorn, S.A. ve Delucia, E.H., 1991. Effect of Leaf Rolling on Gas Exchange and Leaf Temperature of *Andropogon gerardii* and *Spartina pectinata*, Bot. Gaz., 152, 263-268.
- Hensen, I.E., 1983. Abscisic Acid and Water Relations of Rice (*Oryza sativa* L.): Effect of Drought Conditioning on Abscisic Acid Accumulation in the Leaf Stomatal Response, Ann. Bot., 52: 247-255.
- Herbinger, K., Tausz, M., Wonisch, A., Soja, G., Sorger, A. ve Grill, D., 2002. Complex Interactive Effects of Drought and Ozone Stress on The Antioxidant Defence Systems of Two Wheat Cultivars, Plant Physiol. Biochem., 40, 691-696.
- Heuer, B., Plaut, Z. ve Federman, E., 1979. Nitrate and Nitrite Reduction in Wheat Leaves as Affected by Different Types of Water Stress, Physiol. Plant., 46, 318-323.
- Heywood, V. H., 1978, Flowering Plants of The World, Oxford University Press, Oxford.
- Hinman, R.L. ve Lang, J., 1965. Peroxidase Catalyzed Oxidation of Indole-3-Acetic Acid, Biochem., 4, 144-158.
- Hopkins, W.G., 1995. Introduction to Plant Physiology, The University of Western Ontario, John Wiley & Sons Inc., 423-443.
- Horgan, R. ve Kramers, M.R., 1979. High Performance Liquid Chromatography of Cytokinins, J. Chromatog., 173, 263-270.
- Hosoki, T., Tsuchihashi, Y. ve Asahira, T., 1987. Difference in Drought Resistance in Melons of Different Ecotypes II. Physiological Differences, J. Japan. Soc. Hort. Sci., 56, 3, 306-312.
- Hsiao, T.C., O'Toole, J.C., Yambao, E.B. ve Turner, N., 1984. Influence of Osmotic Adjustment on Leaf Rolling and Tissue Death in Rice (*Oryza sativa* L.), Plant Physiol., 75, 338-341.
- Huang, B. ve Fry, J.D., 1998. Root Anatomical, Physiological, and Morphological Responses to Drought Stress for Tall Fescue Cultivars, Crop Sci., 38, 1017-1022.
- Huffaker, R.C., 1970. Biochemistry and Physiology of Leaf Proteins. In: Encyclopedia of Plant Physiology, Boulter, D. ve Parthier, B., Eds., Volume 14 A, Springer, Berlin, 370-400.
- Ilahi, I. ve Dorffling, K., 1982. Changes in Abscisic Acid and Proline Levels in Maize Varieties of Different Drought Resistance, Physiol. Plant., 55, 129-135.
- Ingram, J. ve Bartels, D., 1996. The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 47, 377-403.

- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W. ve Sanchez-Diaz, M., 1992. Alfalfa Leaf Senescence Induced by Drought Stress: Photosynthesis, Hydrogen Peroxide Metabolism, Lipid Peroxidation and Ethylene Evolution, Physiol. Plant., 84, 67-72.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P., Arrese-Igor, C. ve Becana, M., 1998. Oxidative Damage in Pea Plants Exposed to Water Deficit or Paraquat, Plant Physiol., 116, 173-181.
- Jarillo, J.A., Leyva, A., Salinas, J. ve Martinez-Zapater, J.M., 1993. Low Temperature Induces the Accumulation of Alcohol dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, A Chilling-Tolerant Plant, Plant. Physiol., 101, 833-837.
- Jaspars, E.M.J., 1965. Pigmentation of Tobacco Crown Gall Tissues Cultured *in vitro* in Dependence of the Composition of the Medium, Physiol. Plant., 18, 933-940.
- Jiang, Y. ve Huang, B., 2001. Drought and Heat Injury to Two Cool-Season Turfgrasses in Relation to Antioxidant Metabolism and Lipid Peroxidation, Crop Sci., 41, 436-442.
- Jones, H.G., 1979. Visual Estimation of Plant Water Status in Cereals, J. Agric. Sci., 92, 83-89.
- Kadioğlu, A. ve Turgut, R., 1999. Some Biochemical Changes during Leaf Rolling in *Ctenanthe setosa* (Marantaceae), Acta Physiol. Plant., 21, 209-214.
- Kadioğlu, A., Turgut, R., Palavan-Ünsal, N. ve Saruhan, N., 2002. Effect of Polyamines on Leaf Rolling in *Ctenanthe setosa*, Israel J. Plant Sci., 50, 19-23.
- Kao, W.Y. ve Forseth, I. N., 1992. Diurnal Leaf Movement, Chlorophyll Fluorescence and Carbon Assimilation in Soybean Grown under Different Nitrogen and Water Availabilities, Plant, Cell Environ., 15, 703-710.
- Kenis, J.D., Rouby, M.B., Edelman, M.O. ve Silvente, S.T., 1994. Inhibition of Nitrate Reductase by Water Stress and Oxygen in Detached Oat Leaves: A Possible Mechanism of Action, J. Plant Physiol., 144, 735-739.
- Kirchoff, B. K. ve Kennedy, H., 1985. Foliar, Nonstructural Nectaries in The Marantaceae, Can. J. Bot., 63, 1785-1788.
- Kirtikara, K. ve Talbot, D., 1996. Alteration in Protein Accumulation, Gene Expression and Ascorbate-Glutathione Pathway in Tomato (*Lycopersicon esculentum*) under Paraquat and Ozone Stress, J. Plant Physiol., 148, 752-760.
- Knap, A.K., 1985. Effect of Fire and Drought on the Ecophysiology of *Andropogon gerardii* and *Panicum virgatum* in a Tallgrass Prairie, Ecology, 66, 1309-1320.
- Kramer, P.J., 1980. Water Relations in Plants, Academic Press, New York.

- Kraus, T.E., McKersie, B.D. ve Fletcher, R.A., 1995. Paclobutrazole Induced Tolerance of Wheat Leaves to Paraquat May Involve Antioxidant Enzyme Activity, J. Plant Physiol., 145, 570-576.
- Kronfuss, G., Wieser, G., Havranek, W.M. ve Polle, A., 1996. Effects of Ozone and Mild Drought Stress on Total Apoplastic Guaiacol Peroxidase and Lipid Peroxidation in Current-Year Needles of Young Norway Spruce (*Picea abies* L., Karst.), J. Plant Physiol., 148, 203-206.
- Kubo, A., Aono, M., Nakajima, N. ve Saji, H., 1999. Differential Responses in Activity of Antioxidant Enzymes to Different Environmental Stresses in *Arabidopsis thaliana*, J. Plant Res., 112, 279-290.
- Kuraishi, S., Tasaki, K., Sakurai, N. ve Sadatoku, K., 1991. Changes in Levels of Cytokinin in Etiolated Squash Seedlings after Illumination, Plant Cell Physiol., 32, 585-591.
- Larque-Saavedra, A. ve Wain, R.L., 1974. Abscisic Acid Levels in Relation to Drought Tolerance in Varieties of *Zea mays* L., Nature, 251, 716-717.
- Larque-Saavedra, A. ve Wain, R.L., 1976. Studies on Plant Growth Regulating Substances, XLII. Abscisic Acid as A Genetic Character Related to Drought Tolerance, Ann. Appl. Biol., 83, 291-297.
- Larson, R.A., 1988. The Antioxidants of Higher Plants, Phytochemistry, 27, 969-978.
- Larsson, M., Larsson, C.M., Whitford, P.N. ve Clarkson, D.T., 1989. Influence of Osmotic Stress on Nitrate Reductase Activity in Wheat (*Triticum aestivum* L.) and the Role of Abscisic Acid, J. Exp. Bot., 40, 1265-1271.
- Larsson, M., 1992. Translocation of Nitrogen in Osmotically Stressed Wheat Seedlings, Plant Cell and Environment, 15, 447-453.
- Lascano, H.R., Antonicelli, G.E., Luna, C.M., Melchiorre, M.N., Gomez, L.D., Racca, R.W., Trippi, V.S. ve Casano, L.M., 2001. Antioxidant System Response of Different Wheat Cultivars under Drought: Field and in Vitro Studies, Aust. J. Plant Physiol., 28, 1095-1102.
- Levitt, J., 1972. Responses of Plants to Environmental Stresses, Academic Press, New York.
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., Döll, M., Fietz, H.J., Bach, T., Kozel, U., Meier, D. ve Rahmsdorf, U., 1981. Photosynthetic Activity, Chloroplast Ultrastructure, and Leaf Characteristics of High-Light and Low-Light Plants and of Sun and Shade Leaves, Photosynth. Res., 2, 115-141.

- Liebler, D.C., Kling, D.S. ve Reed, D.J., 1986. Antioxidant Protection of Phospholipid Bilayers by α -Tocopherol Control of α -Tocopherol Status and Lipid Peroxidation by Ascorbic Acid and Glutathione, J. Biol. Chem., 261, 12114-12119.
- Liu, E.H., 1973. A Simple Method for Determining the Relative Activities of Individual Peroxidase Isoenzymes in A Tissue Extract, Anal. Biochem., 56, 149-154.
- Lopez, F., Vansuyt, G., Fourcroy, P. ve Casse-Delbart, F., 1994. Accumulation of a 22 kDa Protein and its mRNA in the Leaves of *Raphanus sativus* in Response to Salt Stress of Water Deficit, Physiol. Plant. 91, 605-14.
- Ludlow, M.M., Fisher, M.J. ve Wilson, J.R., 1985. Stomatal Adjustment to Water Deficits in Three Tropical Grasses and A Tropical Legumen Grown in Controlled Conditions and in the Field, Aust. J. Plant physiol., 12, 131-149.
- Machackova, I., Krekule, J., Seidlova, F. ve Strand, M., 1993. Cytokinins in Photoperiodic Introduction of Flowering *Chenopodium* Species, Physiol. Plant., 87, 160-166.
- Mader, M. ve Füssl, R., 1982. Role of Peroxidase in Lignification of Tobacco Cells, Plant Physiol., 70, 1132-1134.
- Matters, G.L. ve Scandalios, J.G., 1986. Effect of the Free Radical Generating Herbicide Paraquat on the Experssion of Superoxide Dismutase (SOD) Genes of Maize, Biochem., Biophys. Acta, 882, 29-38.
- Matthews, R.B., Azam-Ali, S.N. ve Peacock, J.M., 1990. Response of Four Sorghum Lines to Mid-Season Drought:II. Leaf Characteristics, Field Crops Research, 25, 297-308.
- Mehlhorn, M., 1990. Ethylene-Promoted Ascorbate Peroxidase Activity Protecrs Plants against Hidrogen Peroxide, Ozone and Paraquat, Plant Cell and Environment, 13, 971-976.
- Mittler, R. ve Zilinskas, B.A., 1994. Regulation of Pea Cytosolic Ascorbate Peroxidase and Other Antioxidant Enzymes during the Progression of Drought Stress and Following Recovery from Drought, The Plant Journal, 5, 397-405.
- Moran, J.F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R.V. ve Aparicio-Tejo, P., 1994. Drought Induces Oxidative Stress in Pea Plants, Planta, 194, 346-352.
- Morgan, J.M., 1980. Osmotic Adjustment in the Spikelets and Leaves of Wheat, J. Exp. Bot., 31, 655-665.
- Nguyen, H.T., Babu, R.C. ve Blum, A., 1997. Breeding for Drought Resistance in Rice: Physiology and Molecular Genetics Considerations, Crop Sci., 37, 1426-1434.
- Noctor, G. ve Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and Glutathione, Keeping Active Oxygen under Control, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49, 249-279.

- Nyachiro, J.M., Briggs, K.G., Hoddinott, J. ve Johnson-Flanagan, A.M., 2001. Chlorophyll Content, Chlorophyll Fluorescence and Water Deficit in Spring Wheat, Cereal Res. Commun., 29, 135-142.
- Ober, E. S., ve Sharp, R. E., 1994. Proline Accumulation in Maize (*Zea mays* L.) Primary Roots at Low Water Potentials: Requirement for Increased Levels of Abscisic Acid, Plant Physiol., 105, 981-987.
- Oppenheimer, H.R., 1960. Plant Water Relationships in Arid and Semi-Arid Conditions, UNESCO, UK., 105-138.
- O'Toole, J.C., ve Moya, T.B., 1978. Genotypic Variation in Maintenance of Leaf Water Potential in Rice, Crop Sci., 18, 873-876.
- O'Toole, J.C., 1979. Leaf Rolling and Transpiration, Plant Sci. Letters, 16, 111-114.
- Padmanabhan, V., Dias, D.M.A.L. ve Newton, R.J., 1997. Expression Analysis of Gene Family in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) Induced by Water Deficit Stress, Plant Mol. Biol., 35, 801-807.
- Pal, U.R., Johnson, R.R. ve Hageman, R.H., 1976. Nitrate Reductase Activity in Heat (Drought) Tolerant and Intolerant Maize Genotypes. Crop Sci., 16, 775-779.
- Palatnik, J.F., Valle, E.M. ve Carillo, N., 1997. Oxidative Stress Causes Ferredoxin-NADP⁺ Reductase Solubilization from the Thylakoid Membranes in Methylene Viologen-Treated Plants, Plant Physiol. 115, 1721-1727.
- Pandey, R. ve Agarwal, R.M., 1998. Water Stress-Induced Changes in Proline Contents and Nitrate Reductase Activity in Rice under Light and Dark Conditions, Physiol. Mol. Biol. Plants, 4, 53-57.
- Passiosura, J.B., Condon, A.G. ve Richards, R.A., 1993. The Development of Leaf Area Crop Productivity, In: Water Deficits, Smith, J.A.C. ve Griffiths, H., Eds., Bios Scientific Publishers, Oxford, 253-263.
- Pastori, G.M. ve Trippi, V.S., 1992. Oxidative Stress Induces High Rate of Glutathione Reductase Synthesis in A Drought Resistant Maize Strain, Plant Cell Physiol., 33, 957-961.
- Pastori, G.M. ve Trippi, V.S., 1993. Antioxidative Protection in A Drought-Resistant Maize Strain during Leaf Senescence, Physiol. Plant., 87, 227-231.
- Pierce, M.L., ve Raschke, K., 1980. Correlation between Loss of Turgor and Accumulation of Abscisic Acid in Detached Leaves, Planta, 148, 174-182.
- Plaut, Z., 1974. Nitrate Reductase Activity of Wheat Seedlings during Exposure to and Recovery from Water Stress and Sallinity, Physiol. Plant., 30, 212-217.

- Premachandra, G.S., Saneoka, H., Fujita, K. ve Ogata, S., 1993. Water Stress and Potassium Fertilization in Field Grown Maize (*Zea mays* L.): Effects of Leaf Water Relations and Leaf Rolling, J. Agron. Crop Sci., 170, 195-201.
- Price, A.H., Cairns, J. E., Horton, P., Jones, H. G. ve Griffiths, H., 2002. Linking Drought-Resistance Mechanisms to Drought Avoidance in Upland Rice Using a QTL Approach: Progress and New Opportunities to Integrate Stomatal and Mesophyll Responses, J. Exp. Bot., 53, 989-1004.
- Quarrie, S.A. ve Jones, H.G., 1979. Genotypic Variation in Leaf Water Potential, Stomatal Conductance and Abscisic Acid Concentration in Spring Wheat Subjected to Artificial Drought Stress, Annals of Bot., 44, 323-332.
- Ray, I.M. ve Sisson, W.B., 1986. Nitrate Reductase Activity of Kleingrass (*Panicum coloratum* L.) during Drought in the Northern Chihuahuan Desert, J. Range Management, 39, 531-535.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K. V. ve Vivekanandan, M., 2004. Drought-Induced Responses of Photosynthesis and Antioxidant Metabolism in Higher Plants, J. Plant Physiol., 161, 1189-1202.
- Redmann, R.E., 1985. Adaptation of Grasses to Water Stress: Leaf Rolling and Stomata Distribution, Ann. Mo. Bot. Gard., 72, 833-842.
- Rensburg, L.V. ve Kruger, G.H.J., 1994. Evaluation of Components of Oxidative Stress Metabolism for Use in Selection of Drought Tolerant Cultivars of *Nicotiana tabacum* L., J. Plant Physiol., 143, 730-737.
- Richards, R. A., Rebetzke, G. J., Condon, A. G. ve Van Herwaarden, A. F., 2002. Breeding Opportunities for Increasing the Efficiency of Water Use and Crop Yield in Temperate Cereals, Crop Sci., 42, 111-121.
- Rodriguez, R. ve Sanchez, T.R., 1982. Peroxidase and IAA Oxidase in Germinating Seeds of *Cicer arietinum* L., Rev. Esp. Fisiol., 38, 183-188.
- Sairam, R.K., 1994. Effect of Moisture Stress on Physiological Activities of Two Contrasting Wheat Genotypes, Indian J. Exp. Biol., 32, 594-597.
- Sairam, R.K., Deshmukh, P.S. ve Shukla, D.S., 1997. Tolerance of Drought and Temperature Stress in Relation to Increased Antioxidant Enzyme Activity in Wheat, J. Agronomy & Crop Sci., 178, 171-178.
- Sairam, R.K., Shukla, D.S., ve Saxena, D.C., 1997/98. Stress Induced Injury and Antioxidant Enzymes in Relation to Drought Tolerance in Wheat Genotypes, Biol. Plant., 40, 357-364.
- Sairam, R.K., Deshmukh, P.S. ve Saxena, D.C., 1998. Role of Antioxidant Systems in Wheat Genotypes Tolerance to Water Stress, Biol. Plant., 41, 387-394.

- Sairam, R.K., Chandrasekhar, V. ve Srivastava, G.C., 2001. Comparison of Hexaploid and Tetraploid Wheat Cultivars in Their Responses to Water Stress, Biol. Plant., 44, 89-94.
- Schlesinger, M.J., Ashburner, M. ve Tissieres, A., 1982. Heat Shock from Bacteria to Man, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Scruton, N.S., Berry, A. ve Perham, R.N., 1990. Redesign of the Coenzyme Specificity of A Dehydrogenase by Protein Engineering, Nature, 343, 38-43.
- Setter, T.L., Flannigan, B.A. ve Melkonian, J., 2001. Loss of Kernel Set Duo to Water Deficit and Shade in Maize:Carbohydrate Supplies, Absciscic Acid, and Cytokinins, Crop Sci., 41, 1350-1540.
- Sgherri, C.L.M. ve Navari-Izzo, F., 1995. Sunflower Seedlings Subjected to Increasing Water Deficit Stress:Oxidative Stress and Defence Mechanisms, Physiol. Plant., 93, 25-30.
- Sgherri, C.L.M., Maffei, M. ve Navari-Izzo, F. 2000. Antioxidative Enzymes in Wheat Subjected to Increasing Water Deficit and Rewatering, J. Plant Physiol., 157, 273-279.
- Shaner, D.L. ve Boyer, J.S., 1976. Nitrate Reductase Activity in Maize (*Zea mays* L.) Leaves. II. Regulation by Nitrate Flux at Low Leaf Water Potential, Plant Physiol., 58, 505-509.
- Sharp, R. E., Wu, Y., Voetberg, G. S., Soab, I. N. ve LeNoble, M. E., 1994. Confirmation that Absciscic Acid Accumulation Is Required for Maize Primary Root Elongation at Low Water Potentials, J. Exp. Bot., 45, 1743-1751.
- Shinozaki, K., ve Yamaguchi-Shinozaki, K., 1997. Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response, Plant Physiol., 115, 327-334.
- Sinha, S.K., ve Nicholas, D.J.D., 1981. Nitrate Reductase, In:The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants, Paleg, L.G. ve Aspinall, D., Eds, Academic Press, Sydney, 145-169.
- Sivaramakrishnan, S., Patell, V.Z., Flower, D.J. ve Peacock, J.M., 1988. Proline Accumulation and Nitrate Reductase Activity in Contrasting Sorghum Lines during Mid-Season Drought Stress, Physiol. Plant., 74, 418-426.
- Smirnoff, N., Winslow, M.D. ve Stewart, G.R., 1985. Nitrate Reductase Activity in Leaves of Barley (*Hordeum vulgare*) and Durum Wheat (*Triticum durum*) during Field and Rapidly Applied Water Deficits, J. Exp. Bot., 36, 1200-1208.
- Smirnoff, N., 1993. The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation, New Phytol., 125, 27-58.

- Stewart, G.R. ve Lee, J.A., 1974. The Role of Proline Accumulation in Halophytes, Planta, 120, 279-289.
- Street, H.E. ve Öpik, H., 1984. The Physiology of Flowering Plants: Their Growth and Development, Third Edition, Baltimore.
- Stikic, R. ve Davies, W.J., 2000. Stomatal Reactions of Two Different Maize Lines to Osmotically Induced Drought Stress, Biol. Plant., 43, 3, 399-405.
- Tanaka, K., Masuda, R., Sugimoto, T., Omasa, K. ve Sakaki, Z., 1990. Water Deficiency-Induced Changes in the Contents of Defensive Substances against Active Oxygen in Spinach Leaves, Agric. Biol. Chem., 54, 2629-2634.
- Tanaka, K., 1994. Tolerance to Herbicides and Air Pollutants In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants, Foyer, C.H. ve Mullineaux, P.M., Eds., CRC Press, Boca Raton, 365-378.
- Taylor, J.S., Pharis, R.P., Loveys, B., Notodimedjo, S. ve Edwards, G.R., 1984. Changes in Endogenous Hormones in Apple during Bud Burst Induced by Defoliation, Plant Growth Regul., 2, 117-134.
- Thompson, J.E., Ledge, R.L. ve Barber, R.F., 1987. The Role of Free Radicals in Senescence and Wounding, New Phytol., 105, 317-344.
- Townley-Smith, T.F. ve Hurd, E.A., 1979. Testing and Selecting for Drought Resistance in Wheat, In: Stress Physiology in Crop Plants, Mussell, H. ve Staples, R.C., Eds., John Wiley & Sons, New York, 447-464.
- Truax, B., Gagnon, D., Lambert, F. ve Chevrier, N., 1994. Nitrate Assimilation of Raspberry and Pin Cherry in a Recent Clearcut, Can. J. Bot., 72, 1343-1348.
- Turgut, R. ve Kadioğlu, A., 1998. The Effect of Drought, Temperature and Irradiation on Leaf Rolling in *Ctenanthe setosa*, Biol. Plant., 41, 629-663.
- Turner, N.C., Begg, J.E., ve Tonnet, M.L., 1978. Osmotic Adjustment of Sorghum and Sunflower Crops in Response to Water Deficits and Its Influence on the Water Potential at Which Stomata Close, Aust. J. Plant Physiol., 5, 597-608.
- Turner, N.C., O'Toole, J.C., Cruz, R.T., Nambuco, O.S. ve Ahmad, S., 1986. Responses of Seven Diverse Rice Cultivars to Water Deficits. I. Stress Development, Canopy Temperature, Leaf Rolling and Growth, Field Crops Research 13, 257-271.
- URL-1 www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/components/6967_02b.html, Herbicide and Nonherbicide Injury Symptoms on Spring Wheat and Barley, 06.01.2004.
- URL-2, Home.manhattan.edu/~frances.cardillo/plants/anatomy/monocot.html, Leaf Tissues-Monocot, 05.06.2004.

- URL-3, [Www.botany.com/ctenanthe.html](http://www.botany.com/ctenanthe.html), Ctenanthe (Ctenan'the), 05.01.2005.
- Van Assche, F. ve Clijsters, H., 1980. Effects of Metals on Enzyme Activity in Plants, Plant, Cell Environ., 13, 195-206.
- Van Lelyveld, I.J. ve Pretorius, W. J., 1973. Assay Method for Determination of α -Amylase, Indole 3-Acetic Acid Oxidase and Ascorbic Acid Oxidation in A Crude Extract from Aavocado, Agrochemo. Physica, 5, 29-34.
- Walker, M.A. ve McKersie, B.D., 1993. Role of the Ascorbate-Glutathione Antioxidant System in Chilling Resistance of Tomato, J. Plant Physiol., 141, 234-239.
- Wang, Y., Mopper, S. ve Hasenstein, K.H., 2001. Effects of Salinity on Endogenous ABA, IAA, JA, and SA in *Iris hexagona*, J. Chem. Ecol., 27, 327-342.
- Ward, J. M., Pei, Z. M. ve Schroeder, J. I., 1995. Roles of Ion Channels in Initiation of Signal Transduction in Higher Plants, Plant Cell, 7, 833-844.
- White, R.H., Engelke, M.C., Morton, S.J. ve Ruemmele, B.A., 1992. Competitive Turgor Maintenance in Tall Fescue, Crop Sci., 32, 251-256.
- Wright, S.T.C., 1969. An Increase in The 'Inhibitor-B' Content of Detached Wheat Leaves Following A Period of Wilting, Planta, 86, 10-20.
- Wu, Y. ve Cosgrove, D.J., 2000. Adaptation of Roots to Low Water Potentials by Changes in Cell Wall Extensibility and Cell Wall Proteins, J. Exp. Bot., 51, 1543-1553.
- Xiong, L ve Zhu, J.K., 2002. Molecular and Genetics Aspects of Plant Responses to Osmotic Stress, Plant Cell Environ., 25, 131-139.
- Xu, D.-Q. ve Wu, S., 1996. Three Phases of Dark-Recovery Course from Photoinhibition Resolved by the Chlorophyll Fluorescence Analysis in Soybean Leaves under Field Conditions, Photosynthetica, 32, 417-423.
- Yandow, T.S. ve Klein, M., 1986. Nitrate Reductase of Primary Roots of Red Spruce Seedling, Plant Physiol., 81, 723-725.
- Yaneva, I.A., Baydanova, V.D. ve Vunkova-Radeva, R.V., 2000. Nitrate Reductase Activation State in Leaves of Molybdenumdeficient Winter Wheat, J. Plant Physiol., 157, 495-501.
- Yordanov, I., Velikova, V. ve Tsonev, T., 2000. Plant Responses to Drought, Acclimation, and Stress Tolerance, Photosynthetica, 38, 171-186.
- Zeevart, J.A.D. ve Creelman, R.A., 1988. Metabolism and Physiology of Abscisic Acid, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 39, 439-473.
- Zeybek, N., ve Zeybek, U., 1994, *Farmasotik Botanik*, 2. Baskı, Ege Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları, İzmir, 53-54.

- Zhang, J. ve Kirkham, M.B., 1996. Enzymatic Responses of the Ascorbate-Glutathione Cycle to Drought in Sorghum and Sunflower Plants, Plant Sci., 113, 139-147.
- Zhang, X., Schmidt, R.E., 1999. Antioxidant Response to Hormone-Containing Product in Kentucky Bluegrass Subjected to Drought, Crop Sci., 39, 545-551.



8. EKLER

Ek 1. *C. setosa*'da Lp3 geninden elde edilen baz dizisinin olası amino asit sıraları

5'3' Yön 1

VSPRLTPQGKMGSKVEGHGRTRCRHPPEARSGSSRPQWFSPVHPLQFSPTGRCNP
QGELLGHSQMLFPAPSTTNRSFLLPSPSRQSKTPRTRTPSKCSRSKFINSCAQGGIFR
SDSPPPPQIDEKATKLRQNSGQKLDLTGSKQRPDDSPVSEKSCRKEAVKNRRHGRR
MRSSREERAPKHRAKKSNKEDNSHHSTKTRASCNSKQSHCKSRPRLKMQVEKNIR
IGHRGITIGRLEVLRGRIESNLNQTKNQIDVIVGQEQKRTLWMIGMGTLSDFFHAHS
PQVQSLNQTTLQKSGILSTKTRKKRATRKGKRAKSITTSSGSPSKELNSIHH

5'3' Yön 2

YRHDSHHKGRWVARRDTAGLDAVDILHKLVALHVLNGFPRYIRCNFLPPVAAIL
RVSCGILKCFLLPSPRRTAAFFHHHLANRRHHEQGRPQSVRDPNSSTHVLKVGK
FAAIARLRLRLMKRPLNFARIAARNWILVLENRDPMTHTRYLKNHAERRLNETAGM
EEDRCGAVERKGHQNTQKNRTKKTATTQQLGLPAIASRVTAKAGQGKCKW
KKISASEDTEVQGDWKYWGERLKATFETRQRTKMLWDNRNKREPCGLEWEPAIS
FTLTPKSNPSIKQHYSKNLEFCLPKQGRKERQEEKEGQKASPPLVDPPVKSILFI

5'3' Yön 3

IATHTTTREDGQGRGTRPDSMPLTSSTRSSWLFTSSMVFPGTSAAFSHRSLQSSGV
ARAFSNAFSCSLVHDEPQLSSSITISPIEDTTNKDALKVFEIQIHQLMCSRWDLSQR
PASASDKGHTSPERPEIGSDWFLKTETRLTGKIMQKGGCKMKPQAWKKIDAEQS
RGKGTKTQSKKIEQRRQPPLNKNGLFLOQAESLQKPAKVKNASGKKYPHLRTQR
YNNREIGSIGARDKQPLKPDKEPNRCDGCGITGTENLVDDWNGNPKRFLSRSQSPS
PIPQSNNTVKIWNFVYQNKEEKSDKRKRKGKKHHHLWIPQRAEFYSS

3'5' Yön 1

MMNRIQLFTGGSTRGGDAFCPSFSSCRSFLPCFGRQNSRFLCCLIEGLDLGTVSVK
EIAGSHSNHPQGSLLFLLSHNHIYLVLCVSKVAFNLSPQYFQSPYCYTSVSSDADI
FFHLHFPWPAFAVTLIAIAGSPSFCVVAVVFVRFVFCVFWCPFLSTAPHLSSSMPA
VSFYLLSAFFRYRVIGSLFSRSTSQQFLAAILAKFSGLFINLRRRRAIAAKDPTLSTV
DEFGSRTLGRPCSWCLRLARWWKKKAAVRRGLGSRKKHLRMPQLTLRIAATGGR
KLQRMYRGKPLRTRATTSFWRMSTASSPAVSLYLATHLPLWCESWRY

3'5' Yön 2

IEFSSLLGDPLEVVMLFALPFPLVALFFLVLDKIPDFYCNVVLDRDWTWGLAKKS
LRVPIPIIHKVLFCSQYPTITSIWFFVWFQRLLSISRPNTSNLPIVIPLCPQMRIFFSTC
IFNLGRLLQLCLLLQEALVFVEWWLLSSLFDFFALCFGALSSRLLRIYLLPCLRFHF
TASFLHDFSDTGESSGLCFQEPVRSNFWPLFWRSVAFSSIGGGGLSLRKIPPAHEL
MNLBLEHFEGVLVRGVFDWRDGDGRKLRVVDGAGKSIECPSNSPGLQRPVGE
NCSGCTGENHGREEPLRASSGGCQRHRVRPCPSTLLPIFPCGVSRGD

Ek 1'in devamı**3'5' Yön 3**

DENSALYWGHRWCFLPFLFLLSLFSSLFWTKFQIFTVMLFDGIGLGDCERERNR
LGFPFQSSTRFSFVPVIPQSHLFGSLSGFKGCFQSLAPILPISLLLYLCVLRFCGYFFPL
AFLTLAGFCSDSACYCRKPFLLSGGCCLLCSIFLLCVLVPFPLDCSASIFFHACGFIL
QPPFCMIFQIPVSHRVSFVKNSDPISGRYSGEVWPFHQSEAEAGYRCERSHLEHM
SIWISNTLRASLFVVSSIGEMVMEEESCGSSWTREQEKA FENALATHPEDCSRWE
KIAADVPGKTIEDVKSHYELLVEDVNGIESGRVPLPCYPSSLVVVVAI



ÖZGEÇMİŞ

01.05.1972 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladıktan sonra 1990-1991 öğretim yılında K.T.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 1994 yılında bu bölümden biyolog unvanı ile mezun oldu. Aynı yıl K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 1995-1998 yılları arasında 3 yıl süreyle Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalıştı. 1998 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne Öğretim Görevlisi olarak atandı. 1999 yılında K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsünde doktora programına başladı ve şu anda Biyoloji Anabilim Dalındaki görevine devam etmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.

