

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***CTENANTHE SETOSA*'DA YAPRAK KIVRILMASI SIRASINDA APOPLASTİK
VE SİMPLASTİK ALANLARDA ANTİOKSİDAN SİSTEMDE MEYDANA
GELEN DEĞİŞİMLER**

DOKTORA TEZİ

Neslihan SARUHAN GÜLER

MART 2008

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**CTENANTHE SETOSA'DA YAPRAK KIVRILMASI SIRASINDA APOPLASTİK
VE SİMPLASTİK ALANLARDA ANTİOKSİDAN SİSTEMDE MEYDANA
GELEN DEĞİŞİMLER**

Neslihan SARUHAN GÜLER

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Doktor (Biyoloji)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Enstitüye Verildiği Tarih : 28.01.2008
Tezin Savunma Tarih : 03.03.2008**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU *A. Kadıoğlu*
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ertuğrul SESLİ *E. Seşli*
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Faik Ahmet AYAZ *Faik Ahmet Ayaz*
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN *Atalay Sökmen*
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ayşen Sülün ÜSTÜN *Ayşen Sülün Üstün*

Enstitü Müdür V. : Doç. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2008

ÖNSÖZ

“*Ctenanthe setosa*’da yaprak kıvrılması sırasında apoplastik ve simplastik alanlarda antioksidan sistemde meydana gelen değişimler” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Öncelikle doktora tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi, gerekse çalışmaların yürütülmesi sırasında ilgi ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’na teşekkür ederim.

Tez süresi boyunca rapor sunumlarımı izleyen ve değerli yorumlarıyla geliştirilmesinde emeği geçen tez izleme jürilerim sayın Prof. Dr. Ertuğrul SESLİ ile tezdeki HPLC analizlerini gerçekleştiren sayın Prof. Dr. Faik Ahmet AYZ’A, bu çalışmayı yapabilmem için her türlü laboratuvar imkanlarını kullanmamı sağlayan sayın Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e teşekkür ederim. Ayrıca literatür taraması ve metotlar konusunda yardım aldığım ve tavsiyelerinden yararlandığım K.T.Ü. Bitki Fizyolojisi Laboratuvarı araştırmacıları; başta Öğr. Gör. Dr. Rabiye TERZİ ve Arş. Gör. Aykut SAĞLAM olmak üzere, Arş. Gör. Nihal KUTLU, Hatice NAR, Arş. Gör. Hülya TORUN’a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca moral desteğiyle her zaman yanımda olan ve laboratuvar çalışmalarım süresince anlayış ve hoşgörüsünden ötürü eşim Yrd. Doç. Dr. Bahadır Özgür GÜLER’e ve hayatım boyunca sonsuz emek ve desteklerini hep arkamda hissettiğim sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Bu çalışma COST FA 0605 nolu aksiyon kapsamında yürütülen TÜBİTAK 105T354 nolu proje tarafından desteklenmiştir.

Neslihan SARUHAN GÜLER

Trabzon 2008

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Stres ve Stres Çeşitleri.....	3
1.3. Kuraklık ve Kuraklık Stresi.....	5
1.4. Yaprak Kıvrılması	7
1.5. Bitkilerde Kuraklık Stresinin Etkileri.....	8
1.5.1. Mekanik Etki	8
1.5.2. Metabolik Etki	9
1.5.3. Oksidatif Etki.....	9
1.5.3.1. Serbest Radikaller.....	10
1.5.3.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$).....	10
1.5.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	11
1.5.3.1.3. Hidroksil Radikali ($\bullet OH$).....	12
1.5.3.1.4. Singlet Oksijen (1O_2).....	12
1.1.6. Antioksidan Sistem.....	13
1.5.3.2. Antioksidan Enzimler	13
1.5.3.2.1. Peroksidaz (POD)	13
1.5.3.2.2. Askorbat Peroksidaz (APX)	14
1.5.3.2.3. Süperoksit Dismutaz (SOD)	15
1.5.3.2.4. Katalaz (KAT).....	16
1.5.3.2.5. Glutatyon Redüktaz (GR).....	17
1.5.3.2.6. Monodehidroaskorbat Redüktaz (MDHAR)	18

1.5.3.2.7.	Dehidroaskorbat Redüktaz (DHAR)	19
1.5.3.3.	Antioksidan Bileşikler	20
1.5.3.3.1.	Glutasyon	20
1.5.3.3.2.	Askorbat (L-Askorbik Asit, C Vitamini).....	21
1.6.	Polifenol Oksidaz (PPO)	23
1.7.	NAD(P)H Oksidaz.....	24
1.8.	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G-6-PDH)	25
1.9.	Kuraklık Stresinin Etkili Olduğu Bazı Bitkisel Faktörler.....	25
1.9.1.	Yaprak Su Potansiyeli	25
1.9.2.	Stoma İletkenliği.....	26
1.9.3.	Nispi Su İçeriği (NSİ).....	26
1.10.	Apoplastın Yapısı ve Fonksiyonu.....	26
1.11.	Marantaceae Familyasının ve <i>Ctenanthe</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	30
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	31
2.1.	Bitkilerin Büyütülmesi	31
2.2.	Yaprak Kıvrılma Derecesinin Ölçülmesi	31
2.3.	Nispi Su İçeriği Tayini	31
2.4.	Yaprak Su Potansiyelinin Belirlenmesi	32
2.5.	Stoma İletkenliğinin Belirlenmesi	32
2.6.	Yaprak ve Petiyolden Apoplastik Sıvının Ekstraksiyonu.....	32
2.7.	Enzimler İçin Ekstrakt Hazırlanması.....	33
2.7.1.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini.....	33
2.7.2.	Guaiakol Peroksidaz (GPX) Aktivitesinin Tayini	33
2.7.3.	Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini	34
2.7.4.	Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Tayini	34
2.7.5.	Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Tayini.....	34
2.7.6.	Monodehidroaskorbat Redüktaz (MDHAR) Aktivitesinin Tayini.....	35
2.7.7.	Dehidroaskorbat Redüktaz (DHAR) Aktivitesinin Tayini	35
2.7.7.1.	Enzim Ekstraktının Hazırlanması	35
2.7.7.2.	Enzim Aktivitesinin Tayini	35
2.8.	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G-6-PDH) Aktivitesinin Tayini.....	35
2.9.	NAD(P)H Oksidaz Aktivitesinin Tayini	36
2.9.1.	Enzim Ekstraktının Hazırlanması	36

2.9.2.	Enzim Aktivitesinin Tayini	36
2.10.	Polifenol Oksidaz (PPO) Aktivitesinin Tayini	36
2.10.1.	Enzim Ekstraktının Hazırlanması	36
2.10.2.	Enzim Aktivitesinin Tayini	37
2.11.	Antioksidan Maddelerin Analizi	37
2.11.1.	Glutasyon Ekstraksiyonu	37
2.11.2.	Glutasyon (GSH) İçeriğinin Belirlenmesi.....	37
2.11.3.	Askorbat (ASC) İçeriğinin Belirlenmesi	38
2.12.	Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (PAGE) ile İzoenzimlerin Belirlenmesi	38
2.12.1.	Guaiakol Peroksidaz (GPX) İzoenzimlerinin Belirlenmesi.....	39
2.12.2.	Süperoksit Dismutaz (SOD) İzoenzimlerinin Belirlenmesi	39
2.12.3.	Katalaz (CAT) İzoenzimlerinin Belirlenmesi.....	39
2.12.4.	Glutasyon Redüktaz (GR) İzoenzimlerinin Belirlenmesi	39
2.12.5.	Askorbat Peroksidaz (APX) İzoenzimlerinin Belirlenmesi.....	40
2.12.6.	Monodehidroaskorbat Redüktaz (MDHAR) İzoenzimlerinin Belirlenmesi.....	40
2.12.7.	Polifenol Oksidaz (PPO) İzoenzimlerinin Belirlenmesi.....	40
2.13.	Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi	41
2.13.1.	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) İçeriğinin Belirlenmesi.....	41
2.13.2.	Süperoksit (O ₂ ^{•-}) İçeriğinin Belirlenmesi.....	41
2.13.3.	Apoplastik H ₂ O ₂ and O ₂ ^{•-} İçin Sulandırma Katsayısının Belirlenmesi	42
2.14.	Reaktif Oksijen Türlerinin Histokimyasal Olarak Belirlenmesi	42
2.17.	İstatistik Analizler.....	43
3.	BULGULAR	44
3.1.	Kuraklığın Yaprak Kıvrılma Derecesi Üzerine Etkisi.....	44
3.2.	Kuraklığın Nispi Su İçeriği, Yaprak Su Potansiyeli ve Stoma İletkenliği Üzerine Etkisi	44
3.3.	Glukoz-6-Fosfat-Dehidrogenaz (G-6-PDH) Aktivitesi	45
3.4.	Kuraklık Stresinin Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Üzerine Etkisi	46
3.4.1.	Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Üzerine Etkisi	46
3.4.2.	Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Süperoksit (O ₂ ^{•-}) Üzerine Etkisi.....	47

3.5.	Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	48
3.6.	Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Guaiakol Peroksidaz (GPX) Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	49
3.7.	Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Katalaz (CAT) Aktivitesi Üzerine Etkisi	51
3.8.	Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	53
3.9.	Kuraklık Stresinin NAD(P)H Oksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	55
3.10.	Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi Üzerine Etkisi	56
3.11.	Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Dehidroaskorbat Redüktaz (DHAR) Aktivitesi Üzerine Etkisi	58
3.12.	Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Monodehidroaskorbat Redüktaz (MDHAR) Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	59
3.13.	Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Polifenol Oksidaz (PPO) Aktivitesi Üzerine Etkisi	60
3.14.	Kuraklık Stresinin Guaiakol Peroksidaz (GPX) İzoenzimleri Üzerine Etkisi.....	63
3.15.	Kuraklık Stresinin Süperoksit Dismutaz (SOD) İzoenzimleri Üzerine Etkisi.....	64
3.16.	Kuraklık Stresinin Katalaz (CAT) İzoenzimleri Üzerine Etkisi.....	65
3.17.	Kuraklığın Glutasyon Redüktaz (GR) İzoenzimleri Üzerine Etkisi	66
3.18.	Kuraklık Stresinin Askorbat Peroksidaz (APX) İzoenzimleri Üzerine Etkisi.....	67
3.19.	Kuraklık Stresinin Monodehidroaskorbat Peroksidaz (MDHAR) İzoenzimleri Üzerine Etkisi	68
3.20.	Kuraklık Stresinin Polifenol Oksidaz (PPO) İzoenzimleri Üzerine Etkisi...	69
3.21.	Kuraklık Stresinin İndirgenmiş Glutasyon (GSH) İçeriği Üzerine Etkisi	69
3.22.	Kuraklık Stresinin Askorbat (ASC) İçeriği Üzerine Etkisi	70
3.23.	Kuraklık Stresi Esnasında Reaktif Oksijen Türlerinin Dokusal Yerleşimi	72
4.	TARTIŞMA.....	79
5.	SONUÇLAR.....	96
6.	ÖNERİLER	97
7.	KAYNAKLAR.....	98

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

Bu çalışmada 56 gün kuraklık periyoduna maruz bırakılan *Ctenanthe setosa*'da yaprak kıvrılmasının, kuraklığın 35. gününde başladığı ve yaprak kıvrılma derecesinin giderek arttığı gözlemlendi. Yaprak kıvrılma derecesindeki artış boyunca nispi su içeriği, yaprak su potansiyeli ve stoma iletkenliğinin azaldığı bulundu. Yaprak simplastik alanında kıvrılma periyodu boyunca en yüksek aktiviteyi katalaz (CAT) ve guaiakol peroksidaz (GPX) gösterirken, süperoksit dismutaz (SOD) ve askorbat peroksidaz (APX) aktivitelerinde önemli bir değişimin olmadığı görüldü. APX aktivitesi dışında petiyol simplastik alanında da benzer durumun olduğu belirlendi. Yaprak apoplastik alanında ise en yüksek artışın APX ve GPX aktivitelerinde olduğu, CAT ve SOD aktivitelerinde ise çok az bir artışın olduğu kaydedildi. Petiyol apoplastik alanında SOD, APX ve CAT aktivitelerinde nispeten az bir artışın olduğu belirlenirken, en yüksek artışın sadece GPX aktivitesinde olduğu bulundu. Simplastik glutatyon redüktaz (GR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) aktivitelerinin yaprakta arttığı, petiyolde ise GR aktivitesinin apoplastik alanda arttığı simplastta ise azaldığı bulundu. DHAR ve MDHAR aktivitelerinin apoplastta bulunmadığı belirlendi. Ayrıca polifenol oksidaz (PPO) aktivitesinin yaprak simplastik alanında azalırken, her iki bitkisel yapının apoplastik alanında arttığı bulundu. İndirgenmiş glutatyon (GSH) içeriğinin yaprak ve petiyolde kıvrılma derecesi arttıkça arttığı, yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) içeriğinin ise yaprakta azalırken petiyolde önemli ölçüde değişmediği belirlendi. Askorbat (ASC) miktarının yaprak ve petiyol simplastik alanında azaldığı apoplastik alanında arttığı bulundu. Diğer taraftan dehidroaskorbat (DHA) miktarının yaprak apoplast ve simplastik alanlarında arttığı, petiyolde ise azaldığı kaydedildi. Hidrojen peroksit (H₂O₂) ve süperoksit (O₂^{•-}) içeriğinin yaprak ve petiyol apoplastik ve simplastik alanlarında % 54 kıvrılma derecesine kadar arttığı daha sonra azaldığı tespit edildi. NAD(P)H oksidaz aktivitesinin yaprakta artarken petiyolde değişmediği saptandı. Elde edilen bulgulara göre, *C. setosa*'nın kıvrılma boyunca hem simplastik hem de apoplastik alanda ROS temizleyici etkili bir antioksidan mekanizmaya sahip olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Apoplast, Antioksidan Enzimler, Kuraklık, Simplast, Yaprak Kıvrılması

SUMMARY

Antioxidant System Changes in Apoplastic and Symplastic Areas During Leaf Rolling in *Ctenanthe setosa*

In this study, it was seen that leaf rolling has begun on the 35th of drought period and the degree of leaf rolling has gradually increased in *Ctenanthe setosa* exposed to 56 days of drought periods. It was found that the relative water content, leaf water potential and stomatal conductance decreased while leaf rolling was increasing. In symplast the highest changes were found in catalase (CAT) and guaiacol peroxidase (GPX) activities when compared to the controls during leaf rolling period. No significant change was observed in superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) activities in symplast of leaf. The same phenomenon was also present in symplast of petiole except for APX activity. In the leaf apoplastic area, the highest increase was observed in APX and GPX activities, while a slight increase in CAT and SOD activities. In the petiole's apoplast, the highest increment was only found in GPX activity, whereas there was a small increase in SOD, APX and CAT activities. Symplastic glutathione reductase (GR), dehydroascorbate reductase (DHAR) and monodehydroascorbate reductase (MDHAR) activities in the symplastic area increased in the leaf. As for the petiole, GR activity increased in the apoplastic area but decreased in the symplastic area. DHAR and MDHAR activities were seemed to be absent in apoplastic area. Polyphenol oxidase activity (PPO) also decreased in leaf symplast while it increased in apoplast of both plant parts. While symplastic reduced glutathione (GSH) content enhanced by increasing of leaf rolling in the leaf and petiole, oxidized glutathione (GSSG) content increased in the leaf but not changed in the petiole. The ascorbate (ASC) content in the apoplastic area increased in both plant parts, whereas symplastic ASC content decreased in the leaf and petiole during drought period. Furthermore, the apoplastic and symplastic DHA contents rose in the leaf but decreased in the petiole. Hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide (O₂^{•-}) contents increased up to 54 % degree of rolling in the apoplast and symplast of leaf and petiole but decreased later. NAD(P)H oxidase activity increased in the leaf but not changed in the petiole during leaf rolling. In conclusion *C. setosa* has an effective antioxidant mechanism scavenging of ROS in symplast and apoplast areas during rolling.

Key Words: Apoplast, Antioxidant Enzymes, Drought, Symplast, Leaf Rolling,

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Başlıca çevresel stres tipleri	4
Şekil 2. Askorbat-glutasyon döngüsü (Asada-Halliwell yolu)	22
Şekil 3. <i>C. setosa</i> 'nın kuraklık stresine maruz bırakılmamış (a) ve strese maruz bırakılmış (b) görünümü.....	44
Şekil 4. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca SOD aktivitesindeki değişiklikler.....	48
Şekil 5. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak ve petiyol apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca SOD aktivitesindeki değişiklikler.....	49
Şekil 6. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca GPX aktivitesindeki değişiklikler.....	50
Şekil 7. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak ve petiyol apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca GPX aktivitesindeki değişiklikler.....	51
Şekil 8. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca CAT aktivitesindeki değişiklikler.....	52
Şekil 9. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak ve petiyol apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca CAT aktivitesindeki değişiklikler.....	53
Şekil 10. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca APX aktivitesindeki değişiklikler.....	54
Şekil 11. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak ve petiyol apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca APX aktivitesindeki değişiklikler.....	55
Şekil 12. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak ve petiyolde kıvrılma derecesinin artışı boyunca NAD(P)H Oksidaz aktivitesindeki değişiklikler	56
Şekil 13. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca GR aktivitesindeki değişiklikler	57
Şekil 14. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak ve petiyol apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca GR aktivitesindeki değişiklikler	58
Şekil 15. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca DHAR aktivitesindeki değişiklikler	59
Şekil 16. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca MDHAR aktivitesindeki değişiklikler	60
Şekil 17. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca PPO aktivitesindeki değişiklikler	61
Şekil 18. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak ve petiyol apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca PPO aktivitesindeki değişiklikler	62
Şekil 19. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak simplast ve apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin GPX izoenzimleri üzerine etkisi	63

Şekil 20. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak simplast ve apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin SOD izoenzimleri üzerine etkisi	64
Şekil 21. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak simplast ve apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin CAT izoenzimleri üzerine etkisi	65
Şekil 22. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak simplast ve apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin GR izoenzimleri üzerine etkisi	66
Şekil 23. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak simplast ve apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin APX izoenzimleri üzerine etkisi	67
Şekil 24. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak simplast alanındaki kıvrılma derecesinin MDHAR izoenzimleri üzerine etkisi	68
Şekil 25. <i>C. setosa</i> 'nın yaprak simplast ve apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin PPO izoenzimleri üzerine etkisi	69
Şekil.26. <i>C. setosa</i> 'da kuraklık stresi esnasında kontrol bitkilerinin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerde NBT indirgenmesi sonucu formazon oluşumu	73
Şekil 27. <i>C. setosa</i> 'da kuraklık stresi esnasında kontrol grubu bitkilerinin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerdeki formazon oluşumu üzerine inhibitörün (DDC) etkisi	73
Şekil. 28. <i>C. setosa</i> 'da kuraklık stresi esnasında % 26 yaprak kıvrılma derecesine sahip bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerdeki formazon oluşumu üzerine inhibitörün (DDC) etkisi	74
Şekil 29. <i>C. setosa</i> 'da kuraklık stresi esnasında % 54 yaprak kıvrılma derecesine sahip bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerdeki formazon oluşumu üzerine inhibitörün (DDC) etkisi	74
Şekil 30. <i>C. setosa</i> 'da kuraklık stresi esnasında % 74 yaprak kıvrılma derecesine sahip bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerdeki formazon oluşumu üzerine inhibitörün (DDC) etkisi	75
Şekil 31. <i>C. setosa</i> 'da kuraklık stresi esnasında kontrol bitkilerinde 10 mM ASC varlığında DAB ile boyanan bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerde H ₂ O ₂ birikimi	76
Şekil 32. <i>C. setosa</i> 'da kuraklık stresi esnasında DAB varlığında kontrol grubu bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerde H ₂ O ₂ birikimi	76
Şekil 33. <i>C. setosa</i> 'da kuraklık stresi esnasında DAB varlığında % 26 kıvrılma derecesine sahip bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerde H ₂ O ₂ birikimi	77
Şekil 34. <i>C. setosa</i> 'da kuraklık stresi esnasında DAB varlığında % 54 yaprak kıvrılmasına sahip bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerde H ₂ O ₂ birikimi	77
Şekil 35. <i>C. setosa</i> 'da kuraklık stresi esnasında DAB varlığında % 74 yaprak kıvrılmasına sahip bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerdeki H ₂ O ₂ birikimi	78

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Kuraklık stresine maruz bırakılmış <i>C. setosa</i> bitkisindeki yaprak kıvrılma derecesi, nispi su içeriği (%), yaprak su potansiyeli ve stoma iletkenliği	45
Tablo 2. Kuraklık stresine maruz bırakılmış <i>C. setosa</i> bitkisinde Glukoz-6-fosfat-dehidrogenaz aktivitesindeki değişimler	46
Tablo 3. <i>C. setosa</i> 'da yaprak kıvrılması boyunca H ₂ O ₂ içeriğinde meydana gelen değişimler	47
Tablo 4. <i>C. setosa</i> 'da yaprak kıvrılması boyunca O ₂ ^{•-} içeriğinde meydana gelen değişimler	47
Tablo 5. Kuraklık stresine maruz bırakılmış <i>C. setosa</i> bitkisinde yaprak ve petiyol simplastik alanlarındaki indirgenmiş glutatyon ve okside glutatyon içeriğindeki değişimler	70
Tablo 6. <i>C. setosa</i> 'da yaprak kıvrılması boyunca yaprak ve petiyol apoplastik alanlarındaki askorbat ve dehidroaskorbat içeriğinde meydana gelen değişimler	71
Tablo 7. <i>C. setosa</i> 'da yaprak kıvrılması boyunca yaprak ve petiyol simplastik alanlarındaki askorbat ve dehidroaskorbat içeriğinde meydana gelen değişimler	71

SEMBOLLER DİZİNİ

ABA	: Absisik Asit
AO	: Askorbat oksidaz
APX	: Askorbat peroksidaz
ASC	: Askorbik asit
CAT	: Katalaz
DAB	: 3,3'-diaminobenzidin
DCIP	: 2,6-diklorofenol indofenol
DDC	: <i>N,N</i> -dietildithiocarbamate
DHA	: Dehidroaskorbat
DHAR	: Dehidroaskorbat redüktaz
DTNB	: 5-5'-Ditiobis (2-nitro-benzoik asit)
G-6-PDH	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GPX	: Guaiakol peroksidaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
MBTH	: 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone
MDHA	: Monodehidroaskorbat
MDHAR	: Monodehidroaskorbat redüktaz
MTT	: Thiazolyl blue tetrazolium bromid
NADH	: β -Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	: Nikotinamid dinükleotid fosfat
NADPH	: β -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBT	: Nitro blue tetrazolium
NSİ	: Nispi su içeriği
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PPO	: Polifenol oksidaz
POD	: Peroksidaz

PVPP : Polivinilpolipirrolidon
ROS : Reaktif oksijen türleri
SOD : Süperoksit dismutaz
TEMED : N,N,N,N-tetrametil etilen diamin

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bitkiler yaşamları süresince birçok stres faktörü ile karşılaşılır. Stres faktörleri biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılırlar. Biyotik (patojen, diğer organizmalarla rekabet vb.) ve abiyotik (kuraklık, tuzluluk, radyasyon, yüksek sıcaklık veya don vb.) stresler ekonomik olan tahıllar dahil, tüm bitkilerin normal fizyolojik işlevlerinde değişikliklere yol açarlar. Tüm bu stresler bitkilerin biyosentetik kapasitelerini azaltır, normal fonksiyonlarını değiştirir ve bitkinin ölümüne yol açabilecek zararlara neden olabilir. Örneğin dünyanın ortalama sıcaklığında 1°C'lik azalmanın pirinç üretiminde % 40'luk düşüş meydana getireceği, bununla beraber narenciye, kışlık tahıl, bazı sebzelerin ve meyve ağaçlarının dona dayanıklılığının 2°C yükselmesinin dünyadaki üretimi önemli derecede artıracığı ileri sürülmüştür (Hale ve Orcutt, 1987). Bu nedenle ürün kayıplarını en aza indirmek ve dünyanın değişen iklim koşullarına karşı dayanıklı türler geliştirmek için bitkilerin stresten sakınma ve tolerans mekanizmalarının iyi bilinmesi oldukça önem kazanmıştır. Bitkilerin kuraklık stresi altında hayatlarını sürdürebilmek için geliştirdikleri sakınma mekanizmalarından biri transpirasyonu azaltan yaprakların rulo şeklinde kıvrılmasıdır (Bidwell, 1974). Yaprak kıvrılması, radiant sıcaklığı ve ışık absorpsiyonunu azaltır ve böylece bitkileri aşırı ışık etkisinden korur (O'Toole ve Cruz, 1980; Corlett vd., 1994). Bu olayın bazı Gramineae türlerinde yaprağın üst epidermisinde orta damar boyunca yer alan bulliform hücrelerinin turgor özelliklerini kaybetmesi sonucu meydana geldiği bilinmektedir. *Ctenanthe setosa* (Rosc.) Eichler (Marantaceae) bitkisinde ise, yapraklarını kıvrıran diğer bitkilerden farklı olarak, üst epidermisin hemen altında ve yaprağın yüzeyi boyunca yer alan büyük hipodermis hücrelerinin rol oynadığı belirlenmiştir (Kadıoğlu ve Terzi, 2007). Bu mekanizmalara sahip olan şanslı bitkiler uzun bir süre canlılıklarını devam ettirebilir ve kuraklıktan en az hasarla sakınabilirler (Sighn ve Mackill, 1977; Heckathorn ve Delucia, 1991).

Yaprak kıvrılma mekanizmasına sahip olan çeltik (*Oryza sativa*) (Jones, 1979; Ekanayake vd., 1993), buğday (*Triticum sativum*) (Jones, 1979) ve diğer bazı Gramineae türleri (bir çok kserofitik çimlerde) (Heckathorn ve Delucia, 1991) üzerinde de pek çok

çalışma yapılmış ve yaprak kıvrılması ile strese tolerans arasındaki ilişki araştırılmıştır. Ayrıca, kuraklığa en toleranslı *Festuca arundinacea* Schreb. türlerinin belirlenmesinde yaprak kıvrılma derecesinin önemli bir özellik olduğu ileri sürülmüştür (White vd., 1992). Marantaceae familyası bitkilerinde de benzer bir yaprak kıvrılma mekanizması bulunmaktadır. Yapılan literatür araştırmalarında, *C. setosa*'daki yaprak kıvrılması üzerinde ilk fizyolojik ve biyokimyasal çalışmaların Kadioğlu ve vd. (Turgut ve Kadioğlu, 1998; Kadioğlu ve Turgut, 1999; Ayaz, vd., 2000, 2001; Kadioğlu, vd., 2002; Terzi, 2005) tarafından yapıldığı anlaşılmıştır. Bu çalışmalarda yaprakların kıvrılması sırasında osmotik ayarlama sağlamak için yaprakta çözünebilir şeker ve düşük moleküler ağırlıklı karbohidratların biriktiği, kıvrılma derecesine bağlı olarak prolin, fenolik asit seviyesi ve peroksidaz aktivitesinin arttığı, (Kadioğlu ve Turgut, 1999, Ayaz vd., 2000, 2001; Terzi, 2005), süperoksit dismutaz ve glutatyon redüktaz aktivitesinin ise değişmediği rapor edilmiştir (Terzi, 2005). *C. setosa*'nın kuraklık stresi çalışmalarında kullanılabilir iyi bir model bitki olduğu da önerilmiştir (Kadioğlu ve Terzi, 2007).

Yapraklarını kıvrımayan, fakat kuraklık stresine dayanıklı bitkilerin stresi telafi etmek için sahip oldukları diğer koruyucu mekanizmalarının birçoğu yapraklarını kıvrıyan bitkilerde de mevcuttur. Bu özelliklerden bir tanesi antioksidan sistemlerin aktif hale getirilmesidir (Smirnoff, 1993). Kuraklık stresi esnasında antioksidan enzim sistemleri ve strese dayanıklılık arasındaki ilişki geniş olarak araştırılmış olup, su ve kuraklık stresi altında bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttığı bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Baisak vd., 1994; Tanaka, 1994). Örneğin kuraklığa dayanıklı mısır bitkisinde su eksikliği durumunda antioksidanlarda artış olurken hassas olan bitkilerde antioksidanların fazlaca değişmediği ve dolayısıyla daha az bir korumanın sağlandığı (Pastori ve Trippi, 1992) ve su stresine toleransın antioksidan sistemlerin aktivitesiyle ilgili olduğu rapor edilmiştir (Pastori ve Trippi, 1993). Görüldüğü gibi yapraklarını kıvrıma özelliğine sahip olan bazı bitkilerde stres koşullarında antioksidan sistemdeki değişimler araştırılmasına rağmen yaprak kıvrılması ile bu sistem arasındaki ilişki açıkça ortaya konulmamıştır.

Yukarıda bahsedilen biyokimyasal değişimlerin belirli hücre bölümlerinde saptanması, daha bariz sonuçların elde edilmesi yönünden önemlidir. Hücrenin kabaca ikiye ayrılabilen bölümlerinden birisi apoplastik alan diğeri ise simplastik alandır. Bitki hücre apoplastının, bitki hücrelerinin beslenmesinde fonksiyonu olduğu, ağır metal, kuraklık ve yüksek sıcaklık streslerine yanıt oluşturduğu gösterilmiş ve apoplastik alandaki antioksidan sistem

üzerine abiyotik ve biyotik streslerin etkisi çalışılmıştır (Luwe, 1996; Dietz, 1997; Vanacker vd., 1998a, 1998b). Ayrıca bu stres faktörlerinin bitki hücrelerinin apoplastlarında antioksidan enzimlerin seviyelerini de değiştirdikleri rapor edilmiştir (Luwe, 1996; Vanacker vd., 1998a, 1998b; Hernandez vd., 2001). Bununla beraber kuraklık stresi esnasında apoplastik antioksidanların oynadıkları roller hakkında çok az bilgi mevcuttur. Bu konu ile ilgili olarak sitoplazma (simplastik alan) ile karşılaştırıldığında apoplastik boşluk ve hücre çeperinin nispeten daha az antioksidan savunmaya sahip olduğu, bu nedenle güçlü bir oksidatif sinyalin apoplastta daha uzun süre kaldığı rapor edilmiştir. Ayrıca apoplastın redoks durumunun sitoplazmadan farklı seyrettiği, bitki apoplastik proteinlerinin stresle ilişkili olarak değiştiği bilinmektedir. Çeşitli stres durumlarında (özellikle donma stresi) apoplastik alandaki değişimler daha fazla araştırılmış, kuraklık stresi ile ilgili fazlaca bir veriye rastlanılmamıştır. *C. setosa* bitkisinde apoplasttaki reaktif oksijen türlerinin ve apoplastik antioksidanların kuraklık stresi ile teşviki konusunda ise bir bilgi mevcut değildir. Ayrıca kuraklık esnasında apoplastik alanda gelişen bazı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların kıvrılma ile ilişkisi bilinmemektedir.

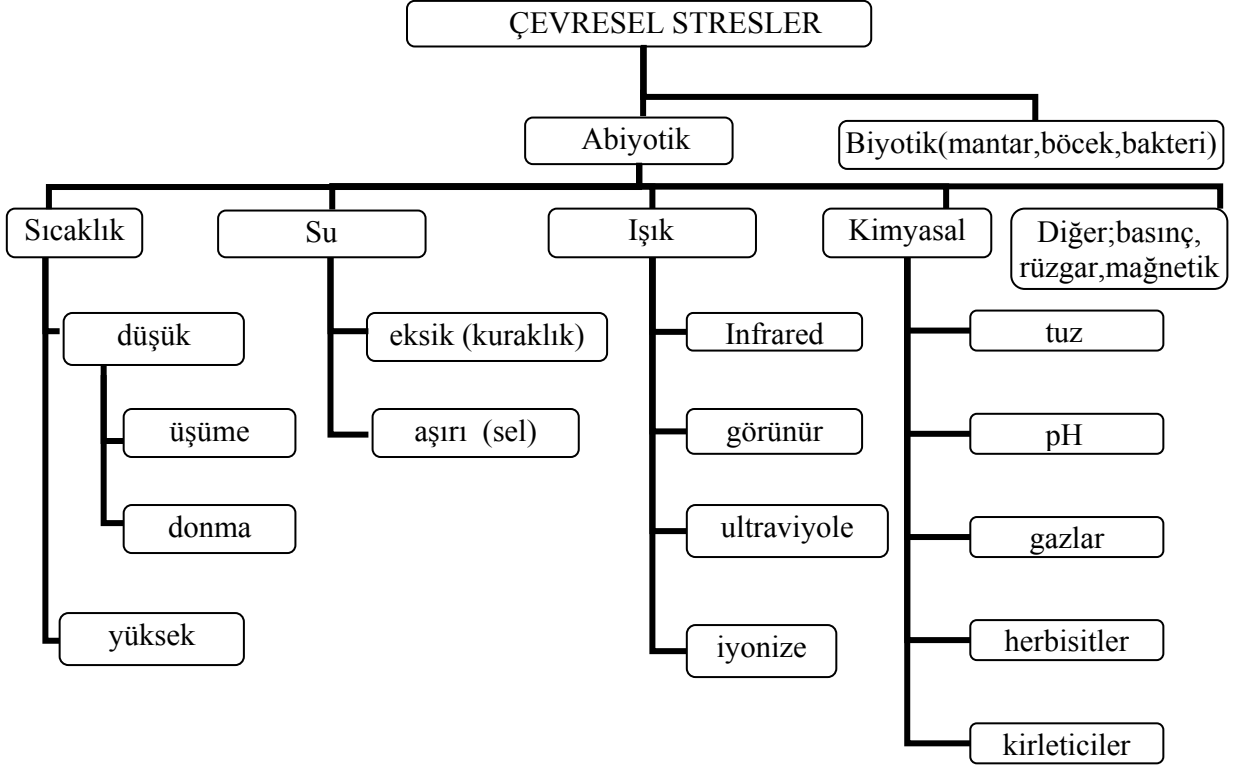
Bu amaçla çalışmamızda öncelikle bitkiler kuraklık stresine maruz bırakılarak yaprak kıvrılması sağlanacak ve yaprak kıvrılması boyunca yapılan analizlerde bitkinin su durumunu gösteren nispi su içeriği, yaprak su potansiyeli ve stoma iletkenliği ile yaprak ve petiyolün simplastik ve apoplastik alanlarında yer alan ve antioksidan sistemde fonksiyonu olan enzimlerin aktiviteleri araştırılacaktır. Ayrıca stres esnasında reaktif oksijen türlerinin dokusal yerleşimi de incelenecektir. Kısaca, bu çalışmada *C. setosa* bitkisinde yaprak kıvrılması esnasında apoplast ve simplast arasındaki dengenin sağlanmasında antioksidanların fonksiyonunun ortaya konulması, kuraklık stresi esnasında yaprak kıvrılmasıyla ilişkili olarak reaktif oksijen türleri yönünden dengenin nasıl değiştiğinin açıklanması amaçlandı.

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 de kapsar. Bir metabolizma bozukluğunun sonucunda

oluşan bu hasarlar bitkinin büyümesinde ve veriminde azalma meydana getirirler (Hale ve Orcutt, 1987).

Bitkilerin maruz kaldığı başlıca stres faktörleri, biyotik ve abiyotik olmak üzere iki kısma ayrılabilir (Şekil 1).



Şekil 1. Başlıca çevresel stres tipleri

Bu çevresel stres tiplerinin etkileri birbirleriyle ilişkilidir. Örneğin, yüksek sıcaklığa dayanıklılık, onunla birlikte meydana gelen kuraklık şartlarına dayanıklılığa bağlıdır. Diğer taraftan donmaya dayanıklılık, dokunun dehidrasyona dayanıklılığı ile önemli derecede bağlantılıdır (Hale ve Orcutt, 1987).

Tüm bitkiler belirli derecelerde stres hasarlarına karşı koyma ve canlı kalabilme özelliğindedir. Bir bitkinin bazı kısımları (tohumlar, tomurcuk ve dormant hücreler) strese dayanıklı iken, diğer kısımları (meristemler, sukkulent organlar ve fideler) duyarlı olabilir. Ayrıca bitkiler yaşamak zorunda oldukları çevreye kısmen veya tamamen uyabilme özelliğine sahiptirler (Bidwell, 1974). Bu, bitkilerin ortamdaki mevcut streslere dayanıklılık veya hassaslık özelliklerine bağlıdır.

Strese dayanıklılık sakınma ve tolerans olmak üzere ikiye ayrılır (Levitt, 1972). Sakınma, bitkiye dıştan uygulanan olumsuz bir faktörün etkisini stres oluşturmadan önleme yeteneğidir (Street ve Öpik, 1984). Çoğu bitkilerde çeşitli kuraklık sakınma mekanizmaları gelişmiştir. Örneğin, kserofit bitkilerde su kaybını azaltan yaprak kıvrılması, yüzey tüyleri, alt durumlu stoma ve benzer mekanizmalar bulunur. Benzer şekilde kaktüs bitkisi su stresi esnasında hücre içindeki su miktarını koruyarak kuraklıktan sakınabilir (Bidwell, 1974). Eğer bir bitki stres sonucu oluşan hasarları azaltabilme veya hiç hasar oluşturmama özelliğinde ise bu durum tolerans olarak adlandırılır. Diğer bir deyişle tolerans dıştan uygulanan bir strese canlının dayanabilme yeteneğidir (Street ve Öpik, 1984). Örneğin kuraklık toleransına sahip bitkiler protoplazma su kaybettiği zaman protoplazması yeniden su alana kadar hayatsal faaliyetlerine devam edebilirler (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 dayanma yeteneklerinin ölçülmesi ve dolayısıyla 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 stresleri tolere edebilen bitkiler yetiştirmeye ihtiyaç vardır. Daha dayanıklı ve toleranslı bitkiler yetiştirmek için strese dayanıklılık ve tolerans mekanizmalarının bilinmesi gerekir (Bidwell, 1974).

1.3. Kuraklık ve Kuraklık Stresi

Kuraklık genel anlamda meteorolojik bir olgu olup, toprağın su içeriği ile bitki gelişiminde gözle görülür azalmaya neden olacak kadar uzun süren yağışsız dönem için kullanılan bir terimdir. Yağışsız dönemin kuraklık oluşturması; toprağın su tutma kapasitesi ve bitkiler tarafından gerçekleştirilen buharlaşma veya transpirasyon hızına bağlı olarak gerçekleşmektedir (Jones, 1992; Kozlowski ve Pallardy, 1997).

Dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar stres faktörlerine göre sınıflandırıldığında doğal bir stres faktörü olan kuraklık stresi %26'lık payıyla en büyük dilimi içermektedir. Kuraklık stresini %20 ile mineral stresi ve %15 ile soğuk ve don stresi takip etmektedir. Bunların dışında kalan tüm stresler %29'luk bir pay alırken, yalnızca %10'luk bir alan herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamaktadır (Blum, 1986). Bu durumda kuraklık

stresi büyüme ve verimi etkileyen en yaygın çevresel streslerden biri olup bitkilerde birçok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler cevabı oluşturmaktadır. Buna bağlı olarak bitkiler, sınırlı çevresel koşullara adapte olmayı sağlayacak bazı tolerans mekanizmaları geliştirirler (Arora ve Mohan, 2002). Kramer (1980)'e göre bu mekanizmalar kuraklıktan sakınma ve kuraklığa tolerans gösterme olmak üzere iki ana başlık altında incelenebilir. Çoğu bitkide çeşitli kuraklık sakınma mekanizmaları gelişmiştir. Stresten sakınma mekanizmalarından ilki çöl bitkilerinde görülür. Örneğin, çölde kısa ömürlü olan bitkiler yeterli yağmur periyodu sırasında büyür ve ürerler. Kuraklık periyodunda ise dormant tohumlar meydana getirirler. Diğer bir kaçınma mekanizması sukkulent bitkilerde görülür. Bu bitkiler kuraklığa karşı sukkulent dokularında su depolayarak su kaybını en az oranda tutarlar ve böylece uzun bir süre canlılıklarını sürdürebilirler (Salisbury and Ross, 1992). Örneğin herdem yeşil çöl bitkileri kuraklık periyodu boyunca dokularındaki turgoru devam ettirebilmek için suda çözünebilir maddeleri biriktirerek kuraklıktan kaçınırlar (Mundree vd., 2002). Diğer taraftan, bitkisel organlar arasında stresten en çok etkilenen organlardan birisi yapraklar olup, özel çevre koşullarına adapte olmak için bir takım metamorfozlar geçirirler. Örneğin, kurak ortam bitkileri ışık etkisinden korunmak ve suyu iyi bir şekilde absorbe etmek için yaprak yüzeyinde tüy, kütikula ve stoma modifikasyonları gibi özel yapılar geliştirirler.

Stresten kaçınan bitkiler yalnızca orta şiddetteki kuraklık stresi durumunda hayatta kalırken strese toleranslı bitkilerde ise çok daha şiddetli kuraklık stresi durumunda hayatta kalabilirler. Kuraklığa toleranslı bitkiler dehidrasyonu erteleyenler ve dehidrasyona tolerans gösterenler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (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 büyüten mekanizmaları içerir. Su hasarı artarsa hücreler turgor durumlarını kaybederler ve böylece hücrelerin büyümesi sınırlandırılır. Ayrıca, 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). Kuraklık stresinin bir sonucu olarak bitkiler, osmolitler olarak bilinen ve turgorun devamını sağlayan maddeleri biriktirirler. Osmotik ayarlama, kuraklık sonucu turgor özelliğini kaybeden bitki hücrelerinin, sakınma mekanizmalarının yokluğunda

turgoru yeniden kazanmaları ve büyümeyi devam ettirebilmeleri için başvurdukları bir yoldur (Handa vd., 1983). Osmotik ayarlamaya en önemli kaynağı indirgen şekerler sağlar (Hasegawa vd., 1984). Bunun yanında prolin, betainler, trehaloz, K⁺, fruktanlarda, osmotik ayarlama sağlamak için bitkiler tarafından sentezlenirler (Smirnoff, 1998). Yapılan araştırmalar, osmotik ayarlamının bitkinin türüne, yaşına, stresin derecesine, çevresel şartlara ve strese maruz kalan bölgeye bağlı olduğunu göstermektedir (Ackerson vd., 1980; Turner vd., 1986). Osmotik ayarlama, stoma açıklığının korunmasına (Turner vd., 1978; Ackerson vd., 1980; Ludlow vd., 1985) ve fotosentezin devam etmesine (Ackerson vd., 1980) katkı sağlar.

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 (Terzi, 2005).

Yaprak kıvrılması bitkilerin stresten sakınma mekanizmalarından birisidir (Clarke, 1986). Bitkilerde yaprak kıvrılmasıyla ilişkili iki farklı tip hücre bulunmaktadır. Bunlardan biri bulliform hücreleri olup, bu hücreler bazı Gramineae türlerinin yaprak üst epidermisinde orta damar boyunca yer alırlar. 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. Bu şekildeki bir kıvrılma ile yaprak alanının sadece % 68'i ışığa maruz kalır ve transpirasyon da % 46-83 oranında azaltılır (Oppenheimer, 1960). Yaprak kıvrılmasıyla ilişkili diğer bir hücre hipodermis hücreleridir. *C. setosa*'da bulliform hücreleri yerine yaprağın üst epidermisinin altında ve yaprağın yüzeyi boyunca yer alan büyük hipodermis hücreleri yaprakların rulo şeklinde kıvrılmasına neden olmaktadır (Kadioğlu ve Terzi, 2007).

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 ışık hasarından 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 çok kısıtlı olan su, bitki tarafından daha 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 tam olarak açık değildir (Terzi, 2005).

1.5. Bitkilerde Kuraklık Stresinin Etkileri

1.5.1. Mekanik Etki

Bitki hücrelerinden belirgin bir su kaybı gerçekleştiği zaman bitkide turgor azalmasıyla kendini gösteren birincil strestir (Lewitt, 1980). Plazma membranının yapısı hücredeki sulu ortamın bir sonucudur; bu yapı membrandaki hidrofobik fosfolipid kuyrukların su tarafından itilmesiyle oluşur (sıvı-katı faz). Hücreden su kaybıyla beraber, membran yapısı değişikliğe uğrar; fosfolipidlerin hidrofilik baş kısımları birbirine yaklaşır ve membranlar kompakt bir görüntü alır (Jel fazı). Bu yeni yapıda membran lipidleri sıvı-katı fazında olduğundan daha az kinetik enerji ile lateral ve rotasyonel harekete sahiptir. Su kaybına bağlı olarak hücre hacmi de azalır ve plazma membranı hücre çeperinden ayrılarak

plazmodesmolar aracılığıyla ilişkisini sürdürür. Gerilim altındaki plazma membranı ve tonoplastta gerçekleşen çökme, yırtılmalara yol açabilir (McKersie ve Lehsem, 1994) ve bu durum, zarlar üzerinde yerleşmiş olan hidrolitik enzimlerin serbest kalması ve dolayısıyla sitoplazmanın otolizi ile sonuçlanabilir (Salisbury ve Ross, 1992) Bu etki, normal hücrel metabolizmayı genelde kalıcı olarak bozar.

1.5.2. Metabolik Etki

Hücre içeriğinin büyük bir kısmını oluşturması, taşıyıcı olması, hücrel reaksiyonlar ve işlevler için çözücü rolü oynaması gibi fonksiyonel özelliklerinden dolayı suyun, hücreden kaybı durumunda, normal regülasyon devam edemez ve metabolizma bozulur. Su kaybına bağlı olarak gerçekleşen iyon birikimi, membran bütünlüğünün proteinlerinin yapısının bozulmasına yol açarak hücreye zarar verebilir. Su kaybı sonucunda, proteinlerin yapısında bulunan hidrofobik ve hidrofilik aminoasitlerin su ile etkileşimleri bozulur (Campbell, 1991) ve bu durum protein denatürasyonlarına neden olur (Bray, 1997; Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005). Proteinlerin parçalanmasıyla dokularda aminoasitler birikir ve enzim inhibisyonları ortaya çıkar. En önemlisi NH_3 gibi toksik bir bileşik ortaya çıkar. NH_3 bitkide metabolik dengenin bozulmasına neden olduğu gibi suyun yukarı doğru taşınmasına da engel olarak iki yönlü zarar verir. Kuraklık stresi sırasında hasar gören diğer yapılar DNA ve RNA gibi nükleik asitlerdir. Kessler (1961)'e göre kuraklık stresine maruz kalmış olan bitkilerde RNAaz aktivitesi artmakta ve bu da enzimin bağlı durumundan serbest duruma geçmesinden kaynaklanmaktadır. Kuraklık stresi altında bitkilerde hormonal dengelerde de bir takım değişiklikler meydana gelir. ABA miktarı artarken, sitokininlerin, GA'nın ve IAA'nın miktarları azalmaktadır (Çırak ve Esendal, 2006).

1.5.3. Oksidatif Etki

Bitkilerdeki oksidatif etki serbest radikallerin özellikle reaktif oksijen türlerinin oluşumunu içerir. Serbest radikaller eşleşmemiş elektron içeren moleküller olup oldukça reaktiftirler. Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron

bulunması serbest radikallerin reaktivitesini arttırdığı için, serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir. Bu radikaller plazma membranı, mitokondri, ER membranlarında da oluşabilir (McKersie ve Lehsem, 1994). Bununla birlikte, suyun kısıtlı olduğu durumlarda, bitki daha fazla su kaybetmemek için, genellikle stomalarını kapatır. Bu durum da fotosentezle fiksasyon için gerekli CO₂'nin alımının kısıtlanmasına neden olur ve böylece kuantum verimi azalır. Böylece fotosentezdeki elektron akseptörü NADP⁺ kısıtlı hale gelir ve ferrodoksin NADP yerine oksijeni redükler ve PS I'in elektronları O₂'ye transferi sonucunda reaktif süperoksit radikali (O₂^{•-}), üretilir (Mehler reaksiyonu) (Tambussi vd., 2000). Birçok türde kuraklık stresi altında artan süperoksit üretim hızı lipid peroksidasyonuna, yağ asidi doymunluğuna ve sonuç olarak membranların bütünüyle zarar görmesine neden olur (Sgherri vd., 1996). Süperoksit tek başına çok fazla reaktif olmayıp, H₂O₂ ve •OH radikallerini oluşturmak suretiyle etkili olur (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Süperoksit ve hidrojen peroksidin hidroksil radikalini oluşturmak üzere tepkimesi sırasında (Haber-Weiss reaksiyonu), artan demir ya da bakır gibi diğer geçiş metalleri, bu reaksiyonları hızlandırmak suretiyle oksidatif hasarı daha da artırabilir (Fenton reaksiyonu) (Smirnoff, 1993). Serbest radikaller hem indirgen hem de yükseltgen olarak bazen de her iki etkiyi birlikte göstererek hücre hasarına neden olurlar. Serbest radikallerin DNA, hücre proteinler ve lipidler üzerinde de zararlı etkileri vardır.

Serbest oksijen radikalleri genellikle hidroksil, peroksi, singlet oksijen, peroksinitrit ve hidrojen peroksid radikallerinden oluşur. Bu radikallerin yarılanma ömürleri birkaç mili saniye ile dakikalar hatta saatler arasında değişebilmektedir.

1.5.3.1. Serbest Radikaller

1.5.3.1.1. Süperoksit Radikali (O₂^{•-})

Süperoksit radikali (O₂^{•-}), oksijene bir elektronun aktarılmasıyla oluşur. Bu reaksiyon enzimatik olarak çeşitli organellerde meydana gelebilir. Moleküler oksijenin, oksidatif fosforilasyon esnasında NADPH-oksidadaz veya ksantin-oksidadaz gibi enzimlerin katalizörlüğünde süperoksit radikali meydana gelir. Süperoksit radikalinin yarılanma ömrü hücrelerin farklı yerlerinde bulunan süperoksit dismutaz enziminin varlığına bağlıdır (Stahl ve Sies, 2002). Ayrıca indirgeyici moleküler oksijene tek elektron verip kendileri

oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler gibi yüzlerce molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit oluşumuna neden olurlar. Çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında ürün olarak süperoksit radikali oluşabilir. Plazma membranlarında da süperoksit üreten NAD(P)H oksidaz enziminin varlığı belirlenmiştir (Vionella ve Macri, 1991). Ayrıca süperoksit enzimatik olmayan reaksiyonlarla, örneğin kloroplast, mitokondri ve plazma membranındaki elektron transport sisteminin yeterince düşük redoks potansiyeline sahip bileşenleri ve ferrodoksin tarafından da üretilebilir. Ayrıca kloroplastlarda PS I ve PS II tarafından süperoksitin üretildiği kaydedilmiştir (Elstner ve Osswald, 1994). Süperoksit radikali oldukça reaktiftir ve lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna sebep olur. Bu radikalın lipid peroksidasyonu, membran hasarı, hücrel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırıklarıyla ilişkisi olduğu belirtilmiştir (Fridovich, 1995). Ayrıca süperoksit radikali, hidrojen peroksitle reaksiyona girerek çok daha toksik bir molekül olan hidroksil radikalini üretebilir. Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinen bu reaksiyon demir ve bakır gibi metallerin katalizörlüğünde oldukça hızlı gerçekleşir. Süperoksit radikali, yüksek katalitik etkiye sahip süperoksit dismutaz (SOD) enziminin etkisiyle dismutasyona girerek konsantrasyonu azalır. SOD tarafından katalizlenen bu reaksiyon dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılır (Halliwell, 1984).

1.5.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur. Süperoksitin olduğu yerlerde önemli miktarda H₂O₂'de üretilir. Fotosentetik elektron transport zinciri H₂O₂'nin üretiminden sorumludur. H₂O₂'nin üretildiği başka bir kaynak fotorespirasyonla glikolatın oksidasyonunun meydana geldiği peroksizomlardır. Ayrıca biyokimyasal olarak oksijenin iki elektronlu indirgenmesinin gerçekleştiği solunum işlemleri sırasında ve genellikle flavoproteinlerle gerçekleştirilen reaksiyonlarla da oluşturulur. Diğer taraftan plazma membranı ve ekstrasellular matriks (ECM)'de H₂O₂'nin üretildiği diğer önemli kaynaklardır (Slesak vd., 2007). Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz. H₂O₂'nin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak

davranmasıdır. H_2O_2 özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz yerine getirir (Halliwell, 1984).

1.5.3.1.3. Hidroksil Radikali ($\bullet OH$)

Hidroksil radikali, en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun (x-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluştuğu gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilir (Stahl ve Sies, 2002). Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\bullet OH$, su dahil rastladığı her molekülle tepkimeye girebilir. Bütün bu tepkimeler $\bullet OH$ 'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell, 1984).

Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. $\bullet OH$ 'ın başlıca hedefi yağ asitleri olup zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama vd., 1998).

1.5.3.1.4. Singlet Oksijen (1O_2)

Singlet oksijen, moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formu olup biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında oluşur. Bitkilerde 1O_2 'nin başlıca kaynağı fotosentetik elektron transport sistemindeki klorofil pigmentleridir (Foyer vd., 1997). Ayrıca singlet oksijen çok çeşitli yollarla kimyasal veya fotokimyasal olarak da üretilebilir. Oksijenin bu formunun reaktivitesi çok yüksektir. Singlet oksijenin yarılanma ömrü 10^{-6} ile 10^{-5} saniye arasında olup karbon-karbon bağları ile tepkimeye girme eğilimi yüksektir (Stahl ve Sies, 2002).

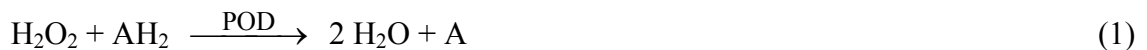
1.1.6. Antioksidan Sistem

Antioksidan terimi, zararlı bir forma dönüşmeksizin Reaktif oksijen türleri (ROS)'ni temizleyebilen bileşikler için kullanılmaktadır. Bitki dokuları stres koşullarında hücreleri ROS etkisinden korumak için, bazı enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz, peroksidazlar) ve düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar (glutatyon, askorbat, karotenoidler, tokoferoller) ihtiva ederler. Antioksidan enzimler koordineli bir şekilde ROS'ları temizlerler veya onları daha az toksik olan bileşiklere metabolize ederler. Bitkiler apoplastik boşluk dahil bütün hücre alt yapılarında antioksidan sisteme sahiptirler. Kuraklık stresine maruz kalan bitkiler antioksidan savunma sistemlerinin bazılarının ya da tamamının aktivasyonu ile oksidatif stresin üstesinden gelebilirler (Srivalli vd., 2003; Jung, 2004; Ramachandra vd., 2004; Pinheiro vd., 2004).

1.5.3.2. Antioksidan Enzimler

1.5.3.2.1. Peroksidaz (POD)

Peroksidazlar (POD, EC 1.11.1.17) bitkilerde yaygın olarak bulunan ve hem grubu ihtiva eden oksidaz grubu enzimlerdir. POD'lar çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahiptirler. Bitki hücrelerinde POD esas olarak, hücre çeperinde, vakuollerde, membrana bağlı ribozomlarda ve bitki dokularının ekstrasellular alanlarında bulunurlar. Hücre çeperine bağlı olan peroksidazlar çözünebilir, iyonik bağlı ve kovalent bağlı formlarda mevcuttur. Peroksidazların birçok fizyolojik olayla ilişkili olduğu ve metabolizmada aktif bir rol oynadığı belirlenmiştir. Bitki hücrelerindeki çeperin uzama kabiliyeti, lignin biyosentezi ve oksin katabolizmasıyla ilişkisinin olmasının yanı sıra en önemli fonksiyonu H_2O_2 'nin parçalanmasını katalizleyerek antioksidan savunma sistemine katkı sağlamalarıdır.



Stres altındaki bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Gaspar vd., 1991). Örneğin *Arabidopsis* bitkisinde yapılan bir çalışmada kuraklık stresine maruz

birakılan bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Peroksidaz aktivitesi, dış kaynaklı sinyallere ve zor çevre koşullarına cevap olarak hızlı bir şekilde değişebilir. Peroksidazlar hidrojen vericisi olarak birçok organik ve inorganik substratı kullanarak H_2O_2 'yi temizlerler ve H vericisi olarak kullandıkları substrata göre isimlendirilirler. Guaiakol peroksidazlar guaiakole olan yüksek spesifikliklerine rağmen başka birçok substratı elektron vericisi olarak kullanabilirler. Kuraklık stresi koşullarında mısır bitkisinde yapılan bir çalışmada guaiakol peroksidaz aktivitesinin arttığı kaydedilmiştir (Zhang vd., 1995). Benzer şekilde orta şiddette kuraklık stresine maruz bırakılan çeltik bitkisinde guaiakol peroksidaz aktivitesinin kontrole göre arttığı, fakat ağır kuraklık koşullarında aktivitenin azaldığı belirlenmiştir (Sharma ve Dubey, 2005).

1.5.3.2.2. Askorbat Peroksidaz (APX)

Hidrojen peroksiti parçalarken substrat olarak askorbatı kullanan enzimler askorbat peroksidazlar (APX, EC 1.11.1.11) olarak adlandırılırlar. APX'in bitki hücrelerinin sitoplazma ve kloroplastlarındaki H_2O_2 'nin temizlenmesinde etkili oldukları düşünülmektedir (Dalton vd., 1987; Asada, 1992). Bu enzimin kloroplastlarda tilakoid membrana bağlı ve stromada bulunan formları vardır (Chen ve Asada, 1989; Miyake ve Asada, 1992). Bu formlar elektron verici olarak askorbat için spesifik olup, askorbatın yokluğunda aşırı derecede kararsızdırlar (Miyake ve Asada, 1996). Sitoplazmada bulunan askorbat peroksidazlar, kloroplastakine benzer ancak askorbat yokluğunda daha fazla kararlı olup askorbattan başka elektron vericilerini de kullanabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar askorbat peroksidazın bazı bitki türlerinin apoplastik alanlarında var olduğunu göstermiştir (Castillo ve Greppin, 1986; Ranieri vd., 1996; Vanacker vd., 1998a). Su stresine maruz kalan duyarlı buğday çeşitlerinde askorbat peroksidaz aktivitesinin uyarıldığı, toleranslı buğdayda ise sadece yüksek stres yoğunluğunda arttığı kaydedilmiştir (Sgherri vd., 2000). Benzer şekilde orta şiddetli su stresine maruz bırakılan çeltik bitkisinde artan askorbat peroksidaz aktivitesinin H_2O_2 'nin detoksifikasyonunda anahtar bir rol oynadığı kaydedilmiştir (Sharma ve Dubey, 2005). Askorbat peroksidazlar yaygın şekilde çalışılan guaiakol peroksidazlara benzemesine rağmen H^+ vericisi olarak askorbata olan yüksek spesifikliklerinden dolayı aralarında farklılıklar vardır (Nakano ve Asada, 1987).

1.5.3.2.3. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (Fridovich, 1986; Elstner, 1987). SOD, ilk kez Mann ve Keilis (1938) tarafından izole edilmiş ve başlangıçta bir bakır depo proteini olduğu düşünülmüştür. Bu enzimin katalitik fonksiyonu keşfedilene kadar eritrokuprein, indofenol oksidaz ve tetrazolium oksidaz gibi isimlerle adlandırılmıştır. Canlı organizmalar SOD ile süperoksiti uzaklaştırır ve Haber-Weiss reaksiyonuyla hidroksil radikalının oluşum riskini azaltır. SOD, süperoksit anyonlarını uzaklaştırmasına rağmen toksik bir oksijen türevini ($O_2^{\bullet-}$) diğerine (H_2O_2) dönüştürür (Mehlhorn, 1996). Bu reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 , fotosentezin güçlü bir inhibitörüdür ve kloroplast fonksiyonu için risk oluşturur. Bu toksik ürün peroksidazlar tarafından temizlenebilir.



SOD bütün aerobik organizmalarda ve aktifleşmiş oksijen üreten bütün hücre alt yapılarında bulunduğu için oksidatif strese karşı savunmada merkezi bir rolünün olduğu düşünülmektedir (Bowler vd. 1992). Ayrıca SOD'un bazı bitki türlerinin apoplastik alanlarında da var olduğu rapor edilmiştir (Vanacker vd., 1998b; Lyons vd., 1999). SOD'un üç farklı izoenzimi vardır. Bunlar bakır/çinko (Cu/ZnSOD), mangan (MnSOD) ve demir (FeSOD) izoenzimleri olup KCN ve H_2O_2 'ye duyarlılıklarına bağlı olarak belirlenirler ve hücre alt yapılarındaki dağılımları farklıdır. MnSOD her iki inhibitöre dirençli olup prokaryotik organizmalar ve ökaryotik hücrelerin mitokondrisinde, Cu/ZnSOD her iki inhibitöre duyarlı olup yüksek bitkilerin hem sitoplazma hem de kloroplastlarında (Scandalios, 1993), FeSOD ise, KCN'ye dirençli, H_2O_2 'ye duyarlı olup, prokaryotik organizmalarda ve bazı bitki türlerinin kloroplastlarında bulunabilirler (Bowler vd., 1992).

SOD aktivitesinin su stresine cevabı türlere ve kuraklık süresine bağlı olarak değiştiği (Fu ve Huang, 2001) ve bu değişimlerin oksidatif strese dirençlilikle bağlantısı olduğu rapor edilmiştir (Foyer vd. 1994). Yapılan çalışmalarda kuraklık stresi esnasında bazı bitki türlerinde SOD aktivitesinin arttığı, ayçiçeği (*Helianthus annuus*) ve yonca (*Trifolium sp.*) bitkilerinde ise belirgin bir değişimin olmadığı rapor edilmiştir (Irigoyen vd., 1992;

Smirnoff, 1993). Bazı çalışmalarda ise SOD aktivitesinde tek başına meydana gelen artışların reaktif oksijen türlerine karşı yeterli koruma sağlayamayacağı ve oksidatif stresi tek başına engelleyemeyeceği ileri sürülmüştür (Pitcher vd., 1991). Diğer taraftan SOD'un hücre membran proteinleriyle ilişkisi olduğu düşünülmektedir (Ogawa vd., 1997). Ozona maruz bırakılan buğday bitkisinde yapılan bir çalışmada SOD aktivitesindeki artışın hücre çeperinin yapısında değişime neden olabileceği rapor edilmiştir (Padu vd., 1999).

1.5.3.2.4. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6), tabiatta çok yaygın dağılım göstermektedir. Bu enzim, aerobik mikroorganizmaların hepsinde, omurgalılarda, omurgasızlarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunmaktadır (Bergmeyer ve Grabl, 1983). Katalaz yüksek konsantrasyonlardaki H₂O₂'nin iki elektronunu kullanarak su ve oksijene indirgenmesini katalizleyen tetramerik demir porfirin içeren yüksek molekül ağırlığına sahip bir enzimdir. Aynı zamanda katalaz, düşük H₂O₂ konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite gösterebilir (Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999). Katalazın görev aldığı genel bir reaksiyon aşağıda gösterilmiştir.



Katalaz kararlı bir enzim değildir. Yüksek ışık yoğunluğu ve stresli bitki hücrelerinde oluşan H₂O₂'nin yüksek konsantrasyonlarıyla inhibe edilebilir (Feierabend vd., 1992; Streb vd., 1993). Siyanid, azid, süperoksit ve indirgenmiş glutatyon tarafından da katalaz aktivitesinin inhibe edildiği rapor edilmiştir (Fridovich, 1986). Ayrıca H₂O₂'ye olan zayıf affinitesi bu enzimin etkinliğini kısıtlamaktadır (Foyer vd., 1994). Katalazın büyük bir kısmı, peroksisomlarda çok az miktarda da mitokondri matriksinde bulunur. Son yıllarda yapılan çalışmalar bazı bitki türlerinin apoplastik alanlarında da katalaz aktivitesinin olduğunu göstermiştir (Edwards vd., 1990; Vanacker vd., 1998b). Katalazın bitki dokusunda H₂O₂'in uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Patykowski ve Urbanek, 2003). Katalazın temel fonksiyonu, moleküler oksijen mevcudiyetinde H₂O₂'in ve ROOH gibi bir peroksitin radikalliğini gidererek özellikle membranlarda

oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarları engellemektir (Chaudiere ve Ferrari-Ilioui, 1999).

1.5.3.2.5. Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) elektron verici olarak NADPH'ı kullanan oksitlenmiş glutasyonun (GSSG), indirgenmesini (GSH) katalizleyen bir enzimdir (Scruton vd., 1990; Creissen vd., 1994).



GR'nin hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunduğu belirlenmiş olup (Creissen vd., 1994) ilk defa eritrositlerde ve mayalarda tespit edilmiştir (Meldrum ve Tarr, 1935). GR hem gimnospermler hem de angiospermlerin dahil olduğu birçok bitkide çalışılmıştır (Creissen vd., 1994). GSH'ın antioksidan özelliğinden dolayı, glutasyon redüktaz hücrenin antioksidan kapasitesinin devamlılığı için önemlidir (Meister, 1983; Creissen vd., 1994). GR, 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). GR diğer enzimlerle birlikte H₂O₂'nin temizlenmesinde de görev alır. Hayvanlarda substrat olarak GSH'ı kullanan glutasyon peroksidazla birlikte GR, H₂O₂'in temizlenmesine katılır (Schirmer vd., 1989). Glutasyon peroksidaz H₂O₂'yi temizlerken substrat olarak GSH'ı kullanır ve reaksiyon sonucu GSSG oluşur. Oluşan GSSG, GR enzimiyle tekrardan GSH'a indirgenir ve böylece glutasyon peroksidaz enziminin substratı yeniden oluşur. GR'nin benzer bir fonksiyonu bitkilerde mevcuttur. Oksitlenmiş askorbik asiti (dehidroaskorbat) tekrardan askorbik asite indirgeyen dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzimi de GSH'ı kullanmakta ve reaksiyon sonucu GSSG oluşmaktadır. Ayrıca GR enzimi GSSG'yi GSH'a indirgerken, NADPH'ı kullanmakta ve böylece CO₂ fiksasyonu azaldığı zamanlarda, NADPH/NADP⁺ oranının ayarlanmasına yardımcı olmaktadır. Bu nedenle GR tarafından GSSG'nin GSH'a indirgenmesi, oksidan temizlenmesinde büyük bir adım olarak kabul edilmekte (Creissen vd., 1996) ve oksidatif strese karşı korunmada GR'nin önemli bir enzim olduğu düşünülmektedir (Aono vd., 1995). Nitekim, yapılan çeşitli çalışmalarda oksidatif stres

durumunda bu enzim aktivitesinin arttığı kaydedilmiştir (Mehlhorn vd., 1987; Pastori ve Trippi, 1992; Edwards vd., 1994).

1.5.3.2.6. Monodehidroaskorbat Redüktaz (MDHAR)

Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR, EC 1.6.5.4), bitkilerde ilk kez 1951 yılında bulunmasına rağmen (Matthews, 1951), bu enzimin izolasyonu ve karakterizasyonu son yıllarda yapılmıştır (Arrigoni vd., 1981; Kow, 1982a, 1982b; Hossain vd., 1984; Hossain ve Asada, 1984). MDHAR, askorbik oksidaz ve L-askorbik asit veya askorbat peroksidaz ve L-askorbik asit gibi monodehidroaskorbat oluşumuna neden olan bir sistem varlığında NAD(P)H'in oksidasyonu ile belirlenir. MDHAR'ın NADH ile olan aktivitesi NADPH ile olan aktivitesinden iki kat daha fazladır (Hossain ve Asada, 1984; Sano vd., 1995) ve elektron vericisi olarak NADH'ı kullanır.

MDHAR, NAD(P)H aracılığıyla monodehidroaskorbatın (MDHA) askorbata indirgenmesini katalizler (Hossain ve Asada, 1984).



MDHAR, doğada geniş yayılım göstermekle beraber, birçok bitkide, hayvanda, mantar, alg ve tek hücreli canlılarda bulunmuştur (Arrigoni vd., 1981; Hossain ve Asada, 1984). Bitkilerde kloroplastlarda (Hossain vd., 1984), glioksizomlarda (Bowditch ve Donaldson, 1990), peroksizomlarda (Jimenez vd., 1997), mitokondri ve sitosolde (Yamanuchi vd., 1984) bulunduğu belirlenmiştir. Kloroplastlardaki MDHAR, stromaya yerleşik olarak bulunur ve yapısı tilakoid membrana bağlı APX'e çok benzerlik gösterir.

ROS'ları temizlemede ASC'nin antioksidan aktivitesinin sürmesi için MDHA'dan ASC'nin oluşumu önemlidir. MDHA ya kendiliğinden ya da NAD(P)H'ı indirgeyici ajan olarak MDHAR tarafından askorbata indirgenir. Birçok enzim MDHA tarafından inaktive edilir. Bu yüzden hücrelerde MDA radikalinin düşük konsantrasyonlarda tutulması gereklidir. MDHAR, ASC üretmek için MDA'nın indirgenmesini katalizleme kapasitesine sahip olan tek enzimdir.

MDHAR'ın ROS'ları temizlemedeki anahtar rolüne ek olarak, bitki hücrelerinin uzaması ve hücre bölünmesinde, tohum çimlenmesinde rol oynadığı rapor edilmiştir

(Cakmak vd., 1993; Arrigoni, 1994). Su stresi altındaki bitkilerde MDHAR sentezinin artması, oksidatif stresin etkisini azaltmak için bitkinin gösterdiği temel cevaplardan biridir. Örneğin, yapılan çalışmalarda kuraklık stresi esnasında çeltik bitkisinde MDHAR aktivitesinin arttığı kaydedilmiştir (Sharma ve Dubey, 2005). Benzer şekilde kuraklık koşullarında bezelye (*Pisum sativum*) yapraklarının mitokondri ve peroksizomlarında MDHAR aktivitesinin oldukça yüksek olduğu rapor edilmiştir (Jimenez vd., 1997).

1.5.3.2.7. Dehidroaskorbat Redüktaz (DHAR)

Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR, EC 1.8.5.1), ilk kez 1934'te tanımlanmasına rağmen yapısı tam olarak aydınlatılamamıştır. Pfankuch tarafından bir tiyol (sistein) aracılığıyla DHA'nın katalitik olarak indirgendiği belirlenmiş olup, 1941'de Crook, bitkilerde GSH bağlı DHAR'ı karakterize etmiştir (Youn, 2000).

DHAR, bütün canlılarda bulunan, tek bir polipeptid zincirinden oluşmuş bir tiyol enzim olup, glutatyon (GSH) aracılığıyla dehidroaskorbatın (DHA) askorbata (ASC) indirgenmesini katalizler. Dehidroaskorbat, 6'dan büyük pH'larda kararsızdır ve tartarat ile oksalata dönüşebilir. Bu dönüşümü önlemek için dehidroaskorbat indirgeyici olarak glutatyonu kullanan dehidroaskorbat redüktaz tarafından askorbata dönüşür ve bu reaksiyon sonucu oluşan GSSG, GR tarafından tekrardan GSH'a indirgenir (Foyer ve Halliwell, 1976).



DHAR'ın, MDHAR gibi oksidatif hasara karşı hücreleri korumada önemli olduğu ve çeşitli çevresel streslere cevap olarak arttığı kaydedilmiştir (Asada ve Takahashi, 1987; Elstner, 1987; Salin, 1988). Diğer taraftan, içsel askorbat ve onun okside ürünleri olan MDHA ve DHA'nın hücre büyümesi ve uzamasını etkilediği rapor edilmiştir (De Gara vd., 1991; Lin ve Varner 1991; Takahama ve Oniki, 1994; Gonzalez-Reyes vd., 1994). Ayrıca DHAR'ın askorbatın redoks durumunu veya konsantrasyonunu kontrol etmesiyle bitki hücrelerinin büyümesinde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Kato vd., 1997). Bununla beraber birçok enzimin DHAR aktivitesine sahip olduğu düşünülmektedir.

Örneğin, tiyoltransferaz (glutaredoksin) ve protein disülfid izomeraz (Wells vd., 1990) enzimlerinde DHAR aktivitesinin varlığı kanıtlanmıştır.

1.5.3.3. Antioksidan Bileşikler

1.5.3.3.1. Glutasyon

Glutasyon bütün canlı organizmalarda bulunan düşük moleküler ağırlıklı tiyol ihtiva eden bir bileşiktir. Tabiatta yaygın bir şekilde bulunan bu sülfürlü bileşik 1921 yılında Hopkins tarafından keşfedilmiş ve glutamil-sisteinden ibaret bir dipeptid olduğu zannedilmiştir. Ancak 1929 yılında kristal halde elde edildikten sonra yapısının tripeptid olduğu anlaşılmış ve 1935 yılında δ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin (Glu- Cys- Gly) halinde sentezlenmiştir (Gözükara, 1997). GSH iki peptid bağı, iki karboksilik asit grubu, bir amino grubu ve bir tiol grubundan oluşmuş bir moleküldür.

GSH, hayvan hücrelerinin hemen hemen hepsinde yüksek konsantrasyonlarda bitkilerde özellikle yapraklarda ise milimolar konsantrasyonlarda bulunan genel bir indirgeyicidir (Rennenberg ve Lamourex, 1990). Glutasyonun metabolizmada ve metabolizmanın düzenlenmesinde önemli rolü olduğu belirlenmiştir. GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır. Glutasyonun özellikle lignin ve fitoaleksinin biyosentezi ile bağlantılı savunucu gen ürünlerinin miktarlarını yükselttiği belirlenmiştir (Wingate vd., 1988). Glutasyonun bitki ve hayvan hücrelerinde gerekli olduğu ve bazı legümenlerin bir homolog tripeptid olan homoglutasyon (Glu-Cys-Ala) ihtiva ettikleri tespit edilmiştir (Klapheck, 1988).

GSH, bitki yapraklarının hem sitoplazması hem de kloroplastlarında enzimatik olarak sentezlenir (Meister, 1988; Hausladen ve Alscher, 1993). Diğer taraftan glutasyonun bitki dokularının apoplastik alanlarında ya çok az veya hiç bulunmadığı rapor edilmiştir (Polle vd., 1990; Vanacker vd., 1998b). GSH seviyesi doku yaşıyla birlikte azalır (Rennenberg ve Lamourex, 1990) ve bitkinin bulunduğu çevreye göre değişir. Örneğin ışıklı ortamdaki bitkilerin glutasyon miktarı karanlıktakinden daha yüksektir. Ayrıca mevsimlere ve türlere göre de GSH içeriğinin değiştiği belirlenmiştir (Schupp vd., 1992). Hücre altı seviyede, GSH konsantrasyonunun en yüksek olduğu organel kloroplastlardır. Burada glutasyon

miktarının, ortalama olarak 1 ve 4 mM arasında olduğu kaydedilmiştir (Law vd., 1983). Bununla beraber, sitoplazmada da önemli miktarda GSH'ın bulunduğu belirlenmiştir. Glutasyon, daha çok indirgenmiş form olan GSH formunda bulunur.

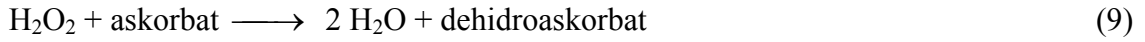
GSH birçok farklı yolla antioksidan rolünü gerçekleştirir ve GSH'ın antioksidan fonksiyonunda yapısında bulunan sisteinin sülfidril grubu etkilidir. GSH'daki tiyol grubunun oksitlenmesi oluşan GSSG, antioksidan özelliğini kaybeder. GSH, kimyasal olarak singlet oksijen, süperoksit, hidroksil radikalleri ile reaksiyona girer ve böylece direkt olarak serbest radikal temizleyicisi olarak görev yapar (Foyer vd., 1994; Creissen vd., 1996). Lipid peroksidasyon reaksiyonlarıyla oluşan açıl peroksitlerini uzaklaştırarak membran yapısını kararlı kılar (Price vd., 1990). Ayrıca GSH, dehidroaskorbat molekülünün dehidroaskorbat redüktaz enzimi katalizörlüğünde indirgenmesi reaksiyonuna katılmaktadır. Bu tepkime iyi bilinen bir antioksidan olan askorbatın meydana gelmesini sağlar (Zhao, 2001).

GSH'ın hücre metabolizmasında antioksidan özelliklerinden başka fonksiyonları da vardır. Bunlardan biri indirgenmiş sülfürün depo ve taşınma şekli olarak rol oynamasıdır (May vd., 1998). Örneğin, GSH'ın yapraklardan kök gibi depo organlarına indirgenmiş sülfürün aktarılmasında önemli bir rolü vardır (Rennenberg, 1982).

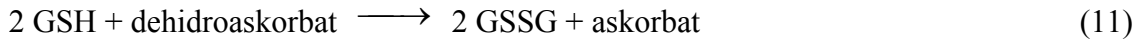
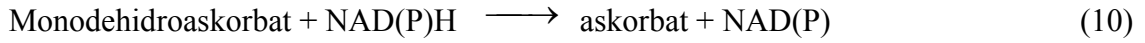
1.5.3.3.2. Askorbat (L-Askorbik Asit, C Vitamini)

Askorbat (ASC) yeşil sebze ve meyvelerin besin değerine katkı sağlayan en iyi karakterize edilmiş bileşiklerden biri olup, insan beslenmesinde önemli olduğu kadar bitki dokularında da bol miktarda bulunur. Son yıllarda askorbatın bitki büyüme ve gelişmesi ve çevresel stres olaylarında da önemli role sahip olduğu gösterilmiştir (Foyer, 1993; Conklin, 2001). Ayrıca bitkilerde oksidatif hasara karşı korunmada da önemli bir role sahiptir ve süperoksit, singlet oksijen ve H₂O₂ gibi radikalleri temizleme özelliği vardır. Bunun yanında bitki hücre çeperi bileşenlerinden hidroksprolin bakımından zengin proteinlerin sentezinde görev alır. Askorbat özellikle kloroplastlarda fotosentez boyunca üretilen ROS'ları temizleyerek, kloroplastın oksitleyici ortamında fotosentezin karbon asimilasyonu fonksiyonunun korunmasını sağlar. Kloroplastlarda üretilen süperoksit ve hidrojen peroksidin temizlenmesi askorbat peroksidaz ve stromal ve tilakoid bağlı süperoksit dismutaz tarafından katalizlenir. Askorbatın süperoksitle olan reaksiyonunda

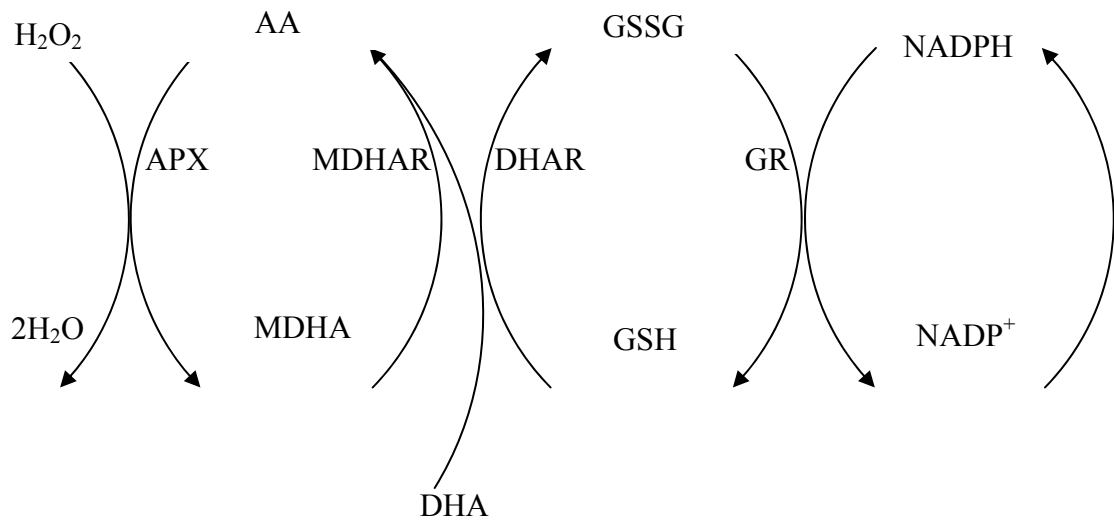
SOD'un rolüne benzer fonksiyonu vardır. Diğer taraftan hidrojen peroksitle olan reaksiyonu askorbat peroksidaz tarafından katalizlenir.



Bu reaksiyonlar sonucunda askorbat dehidroaskorbat ve monodehidroaskorbata oksitlenir. ROS temizleme sisteminin fonksiyonunun devamı için askorbatın okside formlarının indirgenmesi gerekir. Oluşan bu ürünlerden monodehidroaskorbat (MDHA) monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) (Hossain ve Asada, 1984), dehidroaskorbat ise dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) tarafından askorbata indirgenir ve oluşan GSSG, GR tarafından tekrar GSH'a indirgenir (Foyer ve Halliwell, 1976).



Bu reaksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli olan enzimler aracılığıyla oksitlenmiş askorbat ürünlerinden (DHA ve MDHA) indirgenmiş askorbat (ASC) üretilmektedir.



Şekil 2. Askorbat-glutatyon siklusu (Asada-Halliwell yolu), May vd. 1998.

Askorbat-glutasyon siklusu veya Asada-Halliwell yolu olarak adlandırılan sistem (Şekil 2) enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenleri kullanarak ROS'ların toksikliğine karşı koyar (Foyer ve Halliwell, 1976; Nakano ve Asada, 1981). Bu sistemin en önemli özelliklerinden biri H₂O₂ inaktivasyonundan karbon fiksasyonu enzimlerini korumasıdır. Bu özelliğinin yanı sıra NADPH/NADP⁺ oranını düşürerek elektronların PS I'den moleküler oksijene verilme potansiyelini azaltır ve ROS oluşumunu önler. Ayrıca bu sistem bitkileri oksijenin toksikliğinden korumak için gereklidir.

Askorbat suda çözünebilir antioksidan bir bileşik olduğu için aktifleşmiş oksijenle sulu fazda bulunan diğer bileşenlerden daha kolay reaksiyona girer ve oksidatif hasardan makromolekülleri korur. Askorbat sadece büyük bir antioksidan bileşik olarak fonksiyon görmeyip aynı zamanda α -tokoferol ve karotenoid gibi membrana bağlı antioksidanları indirgenmiş formuna dönüştürür (Horemans vd., 2000).

Askorbat çoğu bitki dokularında milimolar konsantrasyonlarda bulunmaktadır ve askorbat içeriği çevresel faktörlerin yanı sıra bitki dokusuna ve bitkilerin fizyolojik durumuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Loewus, 1988; Smirnoff, 1996) Fotosentetik dokular, meyveler ve diğer depo organları yüksek askorbat konsantrasyonuna sahiptirler (Loewus ve Loewus, 1987). Askorbat, genellikle genç dokularda yaşlı olanlara kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve daha çok meristem gibi büyüyen dokularda birikir (Luwe vd., 1993; De Gara ve Tommasi, 1999). Ayrıca askorbatın önemli miktarda apoplast (Vanacker vd., 1998a; 1998b), sitosol ve vakuollerde (Rautenkranz vd., 1994) bulunduğu rapor edilmiştir.

1.6. Polifenol Oksidaz (PPO)

Polifenol oksidaz (PPO, EC 1.14.18.1), yapısında prostetik grup olarak bakır (Cu⁺⁺) bulunduran oksidoredüktaz grubu enzimlerden birisidir. PPO, *o*-monofenollerin *o*-difenollere (kresolaz aktivitesi) ve *o*-difenollerin *o*-kinonlara (katekolaz aktivitesi) oksidasyonunu katalizler. PPO birden fazla substrata etki ettiği için bir enzim grubunun ortak adıdır. Örneğin, monofenollerden tirozine etki edene tirozinaz, difenollerden dopa, katekol ve kafeik asite etki edenlere de dopa oksidaz, katekol oksidaz ve kafeik asit oksidaz adı verilir (Vamos-Vigyazo, 1981). PPO aktivitesi, bitki türüne veya çeşidine bağlı olarak farklılık gösterir. Genellikle tüm bitkilerde mevcut olmakla birlikte özellikle mantarlarda, patates yumrularında ve meyvelerde bol miktarda bulunur (Kocaçalışkan,

1986). PPO'nun bitki hücrelerindeki konumu değişebilir. Bitkilerde sitosolde ve plastidlerde lokalize olmalarına rağmen, fenolik substratları (katekol gibi) vakuolde bulunur. PPO enzimatik esmerleşmeye neden olmaktadır. Bu türden bir işlemin meydana gelebilmesi için ortamda enzim, enzime bağlı bakır iyonları, fenolik substrat ve oksijen bulunmalıdır. Oksijen varlığında, fenollerin *o*-kinonlara enzimatik oksidasyonundan dolayı hızlı bir şekilde meydana gelir.

PPO'nun bitkilerdeki en önemli fonksiyonu, hastalıklara karşı koruma ve fenolleri kinonlara okside ederek bitkilerin proteinlerini ve besinsel değerlerini kısıtlamasıyla bitki yiyen böceklere karşı savunmada rol oynamasıdır. Bitkilerde PPO'nun kloroplastlarda bulunması bu enzimin fotosentez olayı ile ilişkili olabileceğini ve fotosentetik dokularda radikal oksijen temizleyicisi olarak rol oynayabileceğini göstermiştir (Marbach ve Mayer, 1975; Mayer, 1987). Ayrıca PPO'nun diğer antioksidan enzimler (SOD, POD, APX ve CAT) gibi bitkilerde çeşitli stres şartlarına karşı direnç ve dayanıklılık özelliği kazandırdığı rapor edilmiştir (Sofu vd., 2005; Fazeli vd., 2007). Örneğin kışa dayanıklı bitki dokuları, dayanıksız olanlara nazaran daha fazla PPO aktivitesine sahiptirler (Markeis, 1974).

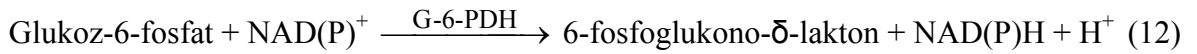
1.7. NAD(P)H Oksidaz

Bitkilerde ekstrasellular ROS'ların üretimi apoplastta veya plazma membranında yerleşik olan enzim aktiviteleri aracılığıyla olur. Peroksidazlar, lipoksigenazlar ve NAD(P)H oksidazlar gibi farklı sınıflardan oluşan enzimlerin bu olaya katkı sağladığı düşünülür (Baker ve Orlandi, 1995). NAD(P)H oksidaz (NADPH:dioksijen oksidoredüktaz, EC 1.6.3.1), plazma membranına bağlı bir enzim olup hücre dışı boşlukta aktif olan süperoksit radikallerini üretir (Bolwell vd., 1998). Bilindiği gibi süperoksit radikalleri süperoksit dismutaz enzimi aracılığıyla H_2O_2 'ye dönüştürülür. Böylece NAD(P)H oksidaz enzimi hücreler arası boşlukta dolaylı olarak H_2O_2 artışına ve hücre çeperi lignifikasyonuna katkı sağlar. Ayrıca NAD(P)H oksidaz aktivitesi apoplastın alkalizasyonuna da neden olur ve bu durum SOD gibi belli apoplastik enzimlerin katalizi için gerekli olan optimal şartları sağlar. NAD(P)H oksidazların patojen saldırılarına hassasiyet, programlanmış hücre ölümü ve ksilem kalınlaşması gibi olaylarda önemli rol oynayabileceği rapor edilmiştir (Levine vd., 1994; Mehdy vd., 1996; Barcelo, 1998). NAD(P)H oksidazlar bitkiler dışında hayvan plazma membranında da bulunmaktadır (Berczi ve Moller, 2000).

1.8. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G-6-PDH)

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PDH, EC 1.1.1.49) pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve kontrol enzimidir (Mehta vd., 2000). Spesifik olarak NADP⁺'nin koenzim olarak kullanıldığı reaksiyonları katalizler. Pentoz fosfat yolu oksidatif ve monooksidatif olmak üzere iki kısma ayrılır. Hücrede RNA, DNA ve nükleotid sentezi için gerekli riboz-5-fosfat ve redüktif biyosentezlerde indirgeyici güç olan NADPH'ları sentezlemek için başlıca iki fonksiyonu vardır (Krebs ve Eggleston, 1978). Ayrıca, aromatik aminoasit ve vitamin sentezinde gerekli eritroz-4-fosfat, bakteri hücre çeperinin bir bileşeni sedoheptuloz-7-fosfat gibi fosforile karbohidratların sentezinde rol alır (Wood, 1986). Pentoz fosfat metabolik yolu ve diğer sentez yolları ile bağlantısı vardır (Tandoğan, 2004). Azalmış G-6-PDH aktivitesi hücre içinde oluşan serbest radikallerin ve peroksitlerin detoksifikasyonu için gerekli olan NADP oluşumunu bozar. NADPH ise normal hücrelerde ara metabolizma ve oksidatif hasara karşı korunmada görevlidir.

G-6-PDH çoğunlukla sitoplazmada ayrıca peroksizom, endoplazmik retikulum, lizozom, kloroplast ve mitokondri gibi çeşitli organellerde de bulunmaktadır (Zaheer vd., 1967; Antonenkov, 1989). Birçok mikroorganizma, bitki ve hayvan hücrelerinde bulunan enzim aşağıdaki tepkimeyi katalizler (Scott, 1975).



G-6-PDH ile katalizlenen reaksiyon termodinamik açıdan geri dönüşümlü olmasına rağmen, D-G-6-P oksidasyonunun ürünü olan D-glukonolaktonun hızlı bir şekilde hidroliziyle geri dönüşümsüz hale gelmektedir. Bu hidroliz pH bağımlıdır, pH 6,4 ve 28°C'de laktonun yarı ömrü 24 dakika, pH 7,4'te ise yaklaşık 1,5 dakikadır (Levy, 1979).

1.9. Kuraklık Stresinin Etkili Olduğu Bazı Bitkisel Faktörler

1.9.1. Yaprak Su Potansiyeli

Yaprak su potansiyelinin bitkilerin su stresine cevabını ölçmek için iyi bir parametre olduğu düşünülür. Singh vd. (1990), kuraklık stresi boyunca buğday genotipleri arasında

yaprak su potansiyel değerlerinde önemli farklılıkların olduğunu göstermiştir. Stresle ilgili çalışmalarda yaprak su potansiyelinin ölçülmesi önemlidir. Padurariu vd. (1969)'ye göre büyüme periyodundaki mısır bitkisinde yaprak su potansiyelinin -0,6 ile -0,7 MPa'dan düşük olmaması gerektiği ileri sürülmüştür. Şekerpancarında ise bu değer -0,5 MPa olarak kaydedilmiştir. Yaprak su potansiyeline en fazla etki eden olaylardan biri transpirasyondur. O'Toole vd. (1977) fasülye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisiyle yaptıkları çalışmada yaprak su potansiyeli -0,3 MPa olduğunda CO₂ alımının ve transpirasyon oranının yüksek olduğunu kaydetmişlerdir. Yaprak su potansiyeli -0,9 MPa kadar düşük bir değere ulaştığında ise CO₂ absorpsiyonunun ve transpirasyonun hemen hemen inhibe edildiğini rapor etmişlerdir. Yaprak su potansiyeli yaprak kıvrılması ile de yakından ilişkilidir (Dingkuhn vd., 1999). Yaprak kıvrılmasının mısırdaki yaprak su potansiyeli, çeltik bitkisinde yaprak sıcaklığı ve yaprak osmotik potansiyeli ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Ekanayake vd., 1993). Yaprak kıvrılmasının artması düşük yaprak su potansiyeline işaret eder. Mısır bitkisinin yaprak su potansiyeli -0,48 MPa'a ulaştığında yapraklarını kıvrıdığı gözlenmiştir. Ayrıca yaprak kıvrılmasının çeltik bitkisinde yaprak su potansiyeli için yararlı bir indikatör olabileceği kaydedilmiştir. Diğer taraftan çeltik ve buğday bitkilerinde yapılan çalışmalarda yaprak kıvrılmasıyla yaprak su potansiyeli arasında güçlü bir ilişkinin var olduğu görülmüştür (Dingkuhn vd., 1999).

1.9.2. Stoma İletkenliği

Stoma iletkenliği, belli bir zamanda yaprak alanından transport edilen su buharı ve CO₂ miktarının ölçümüdür (Von Willert vd., 1995). Stoma iletkenliğinin yüksek olması optimal su durumunu gösterir. Buna karşılık stoma iletkenliğinin düşük değerde olması kuraklık stresiyle ilişkilidir. Bu nedenle stoma iletkenliği bitki su durumu için iyi bir indikatördür. Kuraklığa karşı oluşturulan en erken tepkimelerden biri kloroplastlara CO₂ difüzyonunu kısıtlayan stoma kapanmasıdır. Kuraklık sırasında bitkilerin stomalarını kapatmalarına neden olan etkenler yaprak su potansiyeli, hücre turgoru ve ABA seviyesidir. Bitkilerin stomalarını kapatmasında yapraktaki su potansiyelinin ve hücre turgorunun azalmasının etkili olduğu düşünülürken, yaprak su potansiyelinde bir düşme olmaksızın stoma iletkenliğinin azaldığının görülmesi üzerine stoma kapanmasının yapraktaki su potansiyelinden çok toprağın su potansiyeline bağlı olduğu görülmüştür. Su stresi altındaki bitkilerde yaprak su durumunun stoma iletkenliği ve transpirasyon ile ilişkisi

bilinmektedir. Yaprak su potansiyeli ile stoma iletkenliği arasında iyi bir korelasyonun olduğu sık sık gözlenmiştir. Stoma iletkenliğinde meydana gelen değişimler transpirasyon oranının değişmesi ile yaprak su potansiyelinde değişime neden olur. Ayrıca birçok fotosentetik parametrenin stoma iletkenliğiyle güçlü bir korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (Medrano vd., 2002). Örneğin yaprak kıvrılması esnasında darı bitkisinde stoma iletkenliği ve net CO₂ asimilasyon oranının önemli derecede düştüğu kaydedilmiştir (Corlett vd., 1994).

1.9.3. 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 bitkideki su miktarının 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 kültürleri (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 kültürün hassas olanla karşılaştırıldığında, stres periyodu esnasında daha fazla NSİ'ye sahip olduğu görülmüştür (Sgherri vd., 2000). Soğan (*Allium cepa*) bitkisinde yapılan başka bir çalışmada ise NSİ'nin kontrol ile karşılaştırıldığında % 25 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Egert ve Tevini, 2002).

1.10. Apoplastın Yapısı ve Fonksiyonu

Apoplast hücre çeperini de içine alan bitki hücrelerinin ekstraprotoplastik matriksi olarak tanımlanır (Dietz, 1997). Bu yüzden apoplast sadece hücrelerin fiziksel yapısını

stabilize eden ekstrasellular matriks değil, aynı zamanda bitki hücrelerinin plazma membranı ve intersellular hava boşlukları arasındaki bir sıvı fazı içerir. Son yüzyılın ilk yarısında, apoplastın simplastik alandaki su ve çözünebilir maddelerin taşınmasında bir köprü vazifesi gördüğü düşünülüyordu. Fakat daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar apoplastın ölü bir yapı olmaktan uzak, hücre büyümesi, bitki savunma mekanizması, mineral beslenme ve sinyal iletiminde hayati rol oynadığını göstermiştir. Bu önemli fonksiyonlara ek olarak, birçok hücrel reaksiyon ve olaylarla da dolaylı olarak ilişkilidir. Sadece normal büyüme şartlarında değil aynı zamanda stres gibi bitkinin büyüme ve gelişmesini ve canlılığını olumsuz etkileyen durumlarla da ilişkilidir. Apoplastın hücrenin ayrılmaz bir parçası ya da hücrenin dışında hücrel bir kompartman olup olmadığı hala tartışma halindedir. Hala apoplastın hücrel çevreden simplasta bir köprü vazifesi gördüğü düşünülmektedir. Fakat hücreyi çevreleyen biyotik ve abiyotik çevreyle ilişkili metabolik bilgilerin temel kaynağı olarak davrandığı muhtemeldir. Bu bilgi sürekli olarak plazmalemmaya iletilir ve bu durum apoplast ve simplast (sitoplazma) arasında farklı amaçlar yaratır. Stres durumunda ve hücrel hasarda bu farklılık ve ortaya çıkan cevaplar canlılık ve hücre ölümü arasında fark olduğu anlamına gelir.

Apoplastik matriks birçok enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenleri içerir (Dietz, 1997). Bunlar iyonlar, şekerler, aminoasitler, fenolik bileşikler ve organik asitler, proteinler (peroksidazlar ve hidrolazlar gibi) ve hücre çeperi bileşenlerini (sellulaz, pektin ve glikoproteinler gibi) içine alır. Apoplastik enzim aktiviteleri büyüme şartlarına bağlı olarak değişir (Brune vd., 1994; Blinda vd., 1997; Ramanjulu vd., 1999). Apoplastın bitkinin intrasellular alanından (simplast) çok daha düşük miktarda çözünebilir protein ve enzim içeriğine (Dietz, 1997) ve oldukça düşük pH'ya sahip olduğu düşünülür (pH 5-6; Grignon ve Sentenac, 1991). Apoplastik pH ekstrasellular matriksten sinyal iletimini tetiklemede önemli bir faktördür. Apoplastik pH iç ve dış uyarılara ve sinyallere cevapta değişebilir fakat meydana gelen büyük değişimlere rağmen kolaylıkla düzenlenebilir. Apoplastik alanda iç dengede meydana gelebilecek bir değişiklik simplasta zarar verebilir sonuç olarak hücre ölümüne sebep olabilir. Apoplastik alanda stres etkisiyle bazı iyonların da değişebileceği saptanmıştır (Wilkinson ve Davies, 1997; Bahrin vd., 2002; Felle ve Hanstein, 2002). Bu değişimlerin osmotik ayarlama rol oynayarak, enzimleri korudukları ve böylece dokunun canlılığını sürdürmesine yardımcı oldukları belirlenmiştir (Hsiao, 1984). Yaprak apoplastında iyonlar genellikle düşük konsantrasyonlarda olup çoğunlukla inorganik anyon ve katyon olarak K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cl^- , NO_3^- ve $H_2PO_4^-$ bulunur. Apoplastik

iyon konsantrasyonları tuzlu olmayan alanlarda düşüktür fakat tuzluluk stresiyle bu oran artar (Speer ve Kaiser, 1994). Örneğin tuz konsantrasyonunun fazla olduğu alanlarda yetişen bitkilerde genellikle apoplastta Na^+ un biriktiği gözlenmiştir. Apoplastta inorganik iyonların birikiminin glikofitik türlerin hasar görmesinde önemli rol oynadığı sanılmaktadır (Speer vd., 1994). Apoplastın bitki hücre turgorunu ayarladığını ve bu durumun strese adaptasyonda ve hücre osmotik basıncını artırmada önemli olabileceği gösterilmiştir (Cram, 1999). Mekanizması tam olarak belli olmamakla birlikte K^+ iyonunun bu olayla ilişkili olabileceği saptanmıştır (Tomos ve Leigh, 1999). Ayrıca sitoplazmik serbest Ca^{2+} konsantrasyonunun birçok hücresel olayda merkezi bir rol oynadığı, aynı şekilde proton (H^+) aktivitesinin de özellikle önemli bir faktör olduğu kaydedilmiştir. H^+ in ya direkt olarak ya da bitki hormonları veya Ca^{2+} ile ilişki içerisinde olacak şekilde hücrenin sinyal oluşturmaya karıştığı bilinmektedir. Apoplast çevresel signalleri çevreleyen ilk bitki bölümü olmasından dolayı, plazma membranı ile birlikte çeşitli çevresel signallerin fark edilmesine ve uyum sağlanmasına, aynı zamanda cevabın oluşmasına da karıştığı ileri sürülmüştür (Gao vd., 2004). Şekerler, aminoasitler, askorbik asit ve dehidroaskorbat, fenolik bileşikler ve organik asitler gibi diğer bileşenlerin ise apoplastta düşük fakat önemli miktarlarda olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda apoplastta fenolik madde içeriğinin strese bağlı olarak değiştiği ve bunun bitki savunma mekanizması için önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Atmosferik ozon, sülfürdioksit, besin eksikliği ya da fazlalığı, toksik konsantrasyonlarda ağır metaller gibi abiyotik faktörler veya biyotik stres oluşturucu etkenler apoplastik fonksiyonları değiştirir. Ayrıca apoplastın redoks kimyasını belirleyen bileşikler reaktif oksijen türleri (ROS)'dir (süperoksit, hidrojen peroksit, askorbik asit havuzu). ROS'lar savunma reaksiyonlarında ve hücre çeperi elemanlarının çapraz bağlanmasıyla ilişkilidir.

Son yıllarda ekstrasellular alanla ilişkisi karakterize edilmiş birçok proteinin devamlı olarak arttığı bilinmektedir. Apoplastik proteinler, çözünebilir, iyonik bağlı ve kovalent bağlı fraksiyonlardan oluşur ve bu yüzden apoplastın protein içeriğini güvenilir bir şekilde ölçmek zordur. Hücre çeperi fraksiyonu yaklaşık % 10 oranında protein içerir. Hücre çeperine bağlı proteinlere ek olarak, basit ekstraksiyon yöntemleri ile çözünebilir ve kısmi olarak iyonik bağlı proteinlerin izolasyonları sağlanabilir. Tuzlu ortamlarda büyüme şartları, ağır metaller, soğuk stresi, hava kirliliği, patojen saldırıları ve diğer stres faktörlerinin apoplastın protein kompozisyonunu değiştirdiğini göstermiştir. Tuz ve ağır metal streslerinin apoplastik protein içeriğinde bir artışa, aşırı solma periyodunda ise

azalışa neden olduğu rapor edilmiştir (Brune vd., 1994; Ramanjulu vd., 1999). En iyi çalışılan yapısal proteinler ekstensinlerdir. Diğer taraftan hücre çeperi peroksidazları en fazla araştırılan apoplastik enzimdir. Bunun dışında defensin, hidrolazlar, malat dehidrogenaz, kitinaz, fosfataz, proteaz ve süperoksit dismutaz gibi proteinlerin yaprak apoplastında bulunduğu rapor edilmiştir (Dietz, 1997). Ayrıca apoplastik sıvının hormonları düşük fakat fizyolojik olarak önemli konsantrasyonlarda içerdiği bilinmektedir. Apoplasttaki indolasetik asit ve absisik asit gibi bitki büyüme düzenleyicileri büyüme şartlarına ve strese artarak cevap verir.

1.11. 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 ve 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 (Terzi, 2005). Soğuğa hassastırlar ve minimum 15°C'de yaşayabilirler. Nemli ortamları, yarı gölgeli alanları ve iyi drenajlı toprakları tercih ederler. Üretilmesi ilkbaharda 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 (Terzi, 2005). Bu bitkinin kuraklığa ve hava sıcaklığının artmasına cevap olarak yapraklarını rulo şeklinde kıvrıma yeteneğinde olduğu ve yaprak kıvrılma mekanizmasını açıklamak için model bir bitki olduğu 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) dikilerek vejetatif olarak çoğaltıldı. Bitkilerin 25°C'de, laboratuvar koşullarında (yaklaşık 250-300 µmol (foton) m⁻²s⁻¹ ışık yoğunluğunda) büyümeleri sağlandı. Her bir analiz için biri kuraklık diğeri kontrol olmak üzere 2 adet bitki (saksı) kullanıldı. Kontrol bitkileri gün aşırı sulanırken, yapraklarını kıvrması amacıyla diğeri gruptaki bitkiler 56 gün kuraklık periyoduna maruz bırakıldı. Kontrol bitkileri de dahil olmak üzere kuraklık periyodunun 35, 47, 56. günlerinde yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca (% 20-30, % 50-60 ve % 70 ve üzeri) bitkilerin yaprak ve petiyolünden (yaprak sapı) örnekler alınarak simplast ve apoplastik sıvı elde edildi.

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 +4°C'de 24 saat deiyonize suda bekletilerek turgid ağırlıkları alındı. Daha sonra örnekler 65°C'ye ayarlı fırında 48 saat 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. Yaprak Su Potansiyelinin Belirlenmesi

Kuraklık boyunca *C. setosa*'nın yaprak su potansiyeli C52 termocouple psikometre cihazı ile belirlendi (Wescor, Inc., Logan, UT USA). Bitkilerin en geç yaprağının geniş yüzeyinden 6 mm çapında alınan diskler, cihazın C52 sensörüne yerleştirildi. Numunelerin yaprak su potansiyelleri belirlenmeden önce cihaz 45 dakika kalibre edildi.

2.5. Stoma İletkenliğinin Belirlenmesi

C. setosa'da kuraklık boyunca stoma iletkenlik derecesi porometre cihazı ile belirlendi (AP4, Delta-T Devices, Burwell, Cambridge, UK).

2.6. Yaprak ve Petiyolden Apoplastik Sıvının Ekstraksiyonu

Saksılardan rastgele hasat edilen yaprak ve petiyol, bir bistüri ile 1 cm uzunluğunda dikkatlice kesildi. Buradan alınan 2 g yaprak ve petiyol, en az 6 kez bol saf su ile yıkandı. Bu işlemle, yaprak ve petiyolün kesilen bölgelerinden gelebilecek hücresel bulaşma önlendi (Griffith vd., 1992). Daha sonra yaprak ve petiyol örnekleri 50 mM potasyum fosfat (pH 6,5), 0,2 M KCl 0,1 mM CaCl₂ tamponu içerisine alınarak vakumlanabilir bir desikatöre konuldu. Bu düzenek bir vakum pompası ile 20 dakika vakumlandı. Bu yöntemle, hücreleri parçalamaksızın tamponun yaprak ve petiyol kesitlerinin apoplastik bölgelerine ulaşması sağlandı. Vakum işlemi sonrası yaprak ve petiyol kesitleri kurutma kağıdında hızlı bir şekilde kurulandıktan sonra ayrı ayrı 25 ml'lik enjektörlere dikkatlice yerleştirildi. Enjektörler santrifüj tüplerine yerleştirilip +4°C'de yaprak için 1466 g'de petiyol için 825 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjlemenin bitiminde yaprak ve petiyolün apoplastik ekstraktı tüplerin dip kısmında elde edildi (Hernandez vd., 2001). Elde edilen apoplastik ekstrakt kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Glutasyon ve askorbat miktarlarını belirlemek için yaprak ve petiyol örnekleri 10 mM KCl (pH 6,8) tamponu içerisine alınarak vakumlandı ve yukarıda belirtilen işlemlerden geçirilerek apoplastik sıvı eldesi sağlandı.

Yaprak ve petiyolden apoplastik ekstrakt elde edildikten sonra geriye kalan yaprak ve petiyol kısımları simplastı oluşturdu. Simplast örnekleri, kullanılmak üzere -20°C 'de saklandı.

2.7. Enzimler İçin Ekstrakt Hazırlanması

Hüresel ekstraksiyon (simplast) için, yaprak ve petiyolden kıvrılma boyunca alınan numunelerden 0,5 g tartıldı ve sıvı azot içerisinde toz haline getirildi. Daha sonra 5 ml ekstraksiyon tamponu (50mM K_2HPO_4 , 1 mM EDTA pH 7,0, % 1 PVPP) içerisinde ekstrakte edildi. Ekstrakt $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20.000xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant enzim aktivitesinin tayini için kullanıldı.

2.7.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini

SOD aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich (1971) metodunun Dhinsa 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 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 riboflavin içeren karışıma 50 μl enzim ekstraktı ilave edildi. Son olarak riboflavin eklendi ve tüplerin floransans lamba altına yerleştirilmesiyle reaksiyon başlatıldı. Işık kaynağının 10 dakika 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.

2.7.2. Guaiakol Peroksidaz (GPX) Aktivitesinin Tayini

Guaiakol peroksidaz aktivitesi, Urbanek vd., (1991)'in yöntemine göre belirlendi. Enzim aktivitesi, 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 0,1mM EDTA, 5 mM guaiakol, 15 mM H_2O_2 ve 50 μl enzim ekstraktı içeren 2 ml'lik reaksiyon karışımının 470

nm'de 1 dak. süreyle ölçülmesiyle belirlendi. Guaiakol peroksidaz (GPX) aktivitesi 26,6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı ve sonuçlar g taze ağırlık başına verildi.

2.7.3. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini

Katalaz aktivitesi, Aebi (1983)'nin yöntemine göre belirlendi. Enzim aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 30 mM H_2O_2 ve 20 μl enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının 240 nm'de 5 dakika süreyle ölçülmesiyle belirlendi. Katalaz aktivitesi, H_2O_2 için 39,4 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı ve sonuçlar g taze ağırlık başına verildi

2.7.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Tayini

Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de absorbansdaki azalışa bağlı olarak belirlendi (Nakano ve Asada, 1981). Enzim aktivitesi, 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 250 μM ASC, 5 mM H_2O_2 ve 20 μl enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlendi. Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de ASC için 2,8 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı ve sonuçlar g taze ağırlık başına verildi.

2.7.5. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Tayini

Glutasyon redüktaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Foyer ve Halliwell (1976)'e göre belirlendi. Substrat olarak 0,25 mM NADPH ve 1 mM oksitlenmiş glutasyon (GSSG) kullanıldı.

Yükseltgenmiş 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.

2.7.6. Monodehidroaskorbat Redüktaz (MDHAR) Aktivitesinin Tayini

Monodehidroaskorbat redüktaz aktivitesi, Hossain vd., (1984)'nın tanımladığı gibi ölçüldü. Monodehidroaskorbat (MDHA), askorbat oksidaz vasıtasıyla askorbattan oluşur. Enzim aktivitesi, 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 7,8), 150 μ M NADH, 500 μ M ASC ve 100 μ l enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlendi. Ölçülen değerler AO'ın yokluğunda elde edilen verilerden çıkarıldı. MDHAR aktivitesi, 340 nm'de NADH için 6,22 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı ve sonuçlar g taze ağırlık başına verildi.

2.7.7. Dehidroaskorbat Redüktaz (DHAR) Aktivitesinin Tayini

2.7.7.1. Enzim Ekstraktının Hazırlanması

Yaprak ve petiyolden kıvrılma boyunca alınan simplast numuneleri (0,5 g) 50 mM Tris-HCl, (pH 7,4), 100 mM NaCl, 2 mM EDTA ve 1 mM MgCl_2 içeren ekstraksiyon tamponunda homojenize edildi. Ekstrakt +4°C'de 20.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant enzim aktivitesinin tayini için kullanıldı.

2.7.7.2. Enzim Aktivitesinin Tayini

Dehidroaskorbat redüktaz aktivitesi, Hossain ve Asada (1984)'nın tanımladığı gibi ölçüldü. Enzim aktivitesi, 50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 6,5), 0,5 mM DHA, 1 mM GSH ve 100 μ l enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlendi. DHAR aktivitesi, 265 nm'de absorbansdaki artışa bağlı olarak belirlendi ve 7 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı ve sonuçlar g taze ağırlık başına verildi.

2.8. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G-6-PDH) Aktivitesinin Tayini

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi, apoplastın sitoplazmik kontaminasyon derecesini belirlemek için kullanıldı. Enzim aktivitesi, 66 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,6), 10 mM MgCl_2 , 300 μ M NADP, 2 mM glukoz-6-fosfat (G-6-PDH) ve 50 μ l enzim ekstraktı

içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının 340 nm'de NADP'nin indirgenmesini takiben ölçüldü (Kornberg ve Horecker, 1955). Enzim aktivitesi " ΔA_{340} /dk/g taze ağırlık" cinsinden ifade edildi.

2.9. NAD(P)H Oksidaz Aktivitesinin Tayini

2.9.1. Enzim Ekstraktının Hazırlanması

Yaprak ve petiyolden kıvrılma boyunca alınan numuneler (1 g) 5 ml ekstraksiyon tamponunda (100 mM K-fosfat (pH 7,0), 0,01 mM EDTA ve % 0,1 Triton) ekstrakte edildi. Ekstrakt 15.000xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant NAD(P)H oksidaz aktivitesini belirlemek için kullanıldı.

2.9.2. Enzim Aktivitesinin Tayini

NAD(P)H oksidaz aktivitesi Cakmak ve Marshner (1988)'e göre belirlendi. 0,1 M potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 0,1 mM EDTA ve 0,5 μ M NADPH ya da NADH içeren 1,5 ml'lik reaksiyon karışımı kullanıldı. Reaksiyon enzim ekstraksiyonun ilave edilmesiyle başlatıldı. NADPH veya NADH oksidasyonu 340 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi.

2.10. Polifenol Oksidaz (PPO) Aktivitesinin Tayini

2.10.1. Enzim Ekstraktının Hazırlanması

Kıvrılma boyunca yaprak ve petiyolden alınan 0,5 g simplast numuneleri 2,5 ml ekstraksiyon tamponunda homojenize edildi. Ekstraksiyon tamponu olarak % 6 (w/v) TX-114 deterjanı, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF ve 1 mM askorbik asit içeren 50 mM K₂HPO₄ (pH 7,0) tamponu kullanıldı. Ekstrakt 20.000xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant enzim aktivitesi tayini için kullanıldı.

2.10.2. Enzim Aktivitesinin Tayini

PPO aktivitesi spektrofotometrik olarak 4-Metil katekol (4-MK) için 494 nm'de absorbanstaki artışın ölçülmesiyle belirlendi (Espin, 1995). Belli hacimlerdeki substrat çözeltisi (100 mM stok substrat çözeltisi-4-MK), aynı hacimde MBTH çözeltisi (stok 10 mM) ve % 2 DMF içeren reaksiyon karışımı 50 mM K₂HPO₄ (pH 7,0) tampon çözeltisi ile 970 µl'ye tamamlandıktan sonra bu karışıma 30 µl enzim özütü ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Oluşan üründen dolayı reaksiyon değişimi 1 dakika boyunca belirtilen dalga boyunca izlendi. Sonuçlar g taze ağırlık başına verildi.

2.11. Antioksidan Maddelerin Analizi

2.11.1. Glutasyon Ekstraksiyonu

Hüresel ekstraksiyon (simplast) için, yaprak ve petiyolden kıvrılma boyunca alınan numunelerden 0,5 g tartıldı ve sıvı azot içerisinde toz haline getirildi. Daha sonra 5 ml, 1 mM EDTA içeren % 5'lik metafosforik asit içerisinde ekstrakte edildi. Ekstrakt +4°C'de 10.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant glutasyon içeriğinin belirlenmesi için kullanıldı.

2.11.2. Glutasyon (GSH) İçeriğinin Belirlenmesi

Glutasyon içeriği spektrofotometrik olarak Griffith (1980) yöntemine göre belirlendi. Glutasyon (GSH+GSSG) 250 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 7,5), 200 µM NADPH, 600 µM DTNB, 25 µl ekstrakt ve 0,3 U GR içeren reaksiyon karışımının kullanılmasıyla ölçüldü. 412 nm'de absorbanstaki değişim 3 dakika boyunca ölçüldü. GSSG içeriğini belirlemek için 25 µl ekstrakt 2-vinylpyridine ile 25°C'de 1,5 saat boyunca inkübe edildi. Glutasyon konsantrasyonu 0-5 µM konsantrasyonlarda GSH'ın kullanılmasıyla elde edilen standart grafik üzerinden hesaplandı.

2.11.3. Askorbat (ASC) İçeriğinin Belirlenmesi

Yaprak ve petiyoldeki askorbat içeriğini belirlemek için kıvrılma boyunca alınan 2 g yaprak % 5'lik metafosforik asit içerisinde ekstrakte edildi. Daha sonra homojenat 7000 rpm'de +4°C'de 15 dakika suresince santrifu edildi. Elde edilen supernatant biriktirildi ve liyofilize edildi. Liyofilize edilen numuneler aynı ekstraksiyon tamponunda ozld ve 10.000 rpm'de 10 dakika sureyle santrifu edildi. Daha sonra numuneler filtreden (0.45µm Milipore filter) geçirilerek direkt olarak HPLC'ye enjekte edildi (10 µl).

Apoplastik ve simplastik askorbat içeriği, kuarternary HPLC pompası, mikro vakum degasser'ı (MVD), termostadlı kolon bölümü (TTC), UV-dedektörlü, standart mikro ve preparatif otomatik numune yükleyici modüler sistemden kurulu Agilent 1100 Series (Palo Alto, CA) marka Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı kullanılarak yapıldı (Ayaz vd., yayınlanmadı). Askorbat ve dehidroaskorbatın tanımlanması ve ayrımı, Ace 5 C18 (25 cm x 4.6 mm i.d., ACE Scotland) analitik kolon kullanılarak, 0.02 M KH₂PO₄ (pH 2.04) mobil fazında izokritik olarak 0.6 ml/dk akış hızında 210 nm'de belirledi. Otomatik enjeksiyon sistemi 5-10 µl arasında tercih edildi. Askorbat ve dehidroaskorbat yukarıda belirtilen şartlarda autentik standartlar yardımıyla onların alıkonma zamanları kullanılarak karşılaştırma yoluyla tanımlandı. Askorbat ve dehidroaskorbatın uygun konsantrasyonları hazırlanıp sulandırma yoluyla belirlenen beş adet konsantrasyonları kolona enjekte edilerek kalibrasyon eğrisi hazırlanmış olup asitlerin pik alanları HP ChemStations software yardımıyla yapıldı.

2.12. Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE) ile İzoenzimlerin Belirlenmesi

Elektrofrez çalışmalarında enzim kaynağı olarak -20°C'de dondurularak saklanan kontrol ve % 26, 54 ve 74 kıvrılma derecelerine sahip bitkilerin enzim ekstraktları kullanıldı. Çalışmalarda % 8'lik ayırma jeli kullanıldı. Numuneler % 80 gliserol ve % 0,1'lik bromofenol boyası ve 1 M Tris HCl (pH 6,8) içerisinde 50-300 µg protein olacak şekilde hazırlandı ve enjektör yardımıyla jeldeki kuyucuklara yüklendi. Yürütme tamponu (18,76 glisin ve 3,02 g Tris, 1 L, pH 8,3) kullanılarak +4°C'de, 15 mA akımda 3-4 saat yürütüldü. Askorbat peroksidaz için yürütme tamponuna 2 mM askorbik asit ilave edildi.

2.12.1. Guaiakol Peroksidaz (GPX) İzoenzimlerinin Belirlenmesi

GPX izoenzimleri Liu (1973) tarafından tanımlanan yöntemle belirlendi. Elektroforez sonucunda çıkarılan jel dikkatli bir şekilde 0,2 M sodyum asetat (pH 5,0), 30 mM H₂O₂ ve 10 mM guaiakol içeren çözeltiliye alınarak yarım saat inkübe edildi ve daha sonra % 30'luk etil alkolde muhafaza edildi.

2.12.2 Süperoksit Dismutaz (SOD) İzoenzimlerinin Belirlenmesi

Beauchamp ve Fridovich (1971) tarafından tanımlanan poliakrilamid jel elektroforezi ile SOD izoenzimleri belirlendi. Elektroforezden sonra çıkarılan jel 0,24 mM NBT, 33,2 µM riboflavin, % 0,2 TEMED ve 1 mM EDTA ihtiva eden 0,05 M potasyum fosfat tamponunda (pH 7,8) 37°C'ye ayarlı etüvde karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra jel, 1 mM EDTA ihtiva eden 0,05 M potasyum fosfat tamponuna (pH 7,8) alındı ve ışıklı bir ortamda izoenzimlerin görülebilmesi için 10-30 dakika bekletildi. İzoenzimler belirlendikten sonra jel saf su ile yıkandıktan sonra % 30'luk etil alkolde muhafaza edildi.

2.12.3. Katalaz (CAT) İzoenzimlerinin Belirlenmesi

Poliakrilamid jel elektroforezi ile katalaz izoenzimleri (Woodbury, 1971) tarafından tanımlanan yöntemle belirlendi. Elektroforezden sonra jel, 3 kez 10'ar dakika saf suda bekletildikten sonra H₂O₂ çözeltisinde (10 µl % 30'luk H₂O₂ 100 ml'ye saf su ile seyreltildi) 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi dolar dolmaz jelden H₂O₂ uzaklaştırıldı. Doğal boyama için taze hazırlanmış % 2'lik FeCl₃, % 2'lik K₃FeCN₆ çözeltilerin karışımı kullanıldı. Jelde yeşil rengin görüldüğü an, jel saf su ile yıkandı. Jelde boyanmayan yerler katalaz aktivitesi olarak belirlendi.

2.12.4. Glutasyon Redüktaz (GR) İzoenzimlerinin Belirlenmesi

Poliakrilamid jel elektroforezi ile glutasyon redüktaz izoenzimleri Laemmli (1970) tarafından tanımlanan yöntemle belirlendi. Elektroforez sonucunda çıkarılan jel, 4 mM GSSG, 1,5 mM NADPH, 2 mM DTNB içeren 0,25 M Tris-HCl (pH 8,4) tamponunda 10

dakika inkübe edildi. Daha sonra aynı tampona 0,04 mM DCIP ilave edilerek jel oda sıcaklığında karanlıkta 1 gece bekletilerek izoenzimler belirlendi.

2.12.5. Askorbat Peroksidaz (APX) İzoenzimlerinin Belirlenmesi

Poliakrilamid jel elektroforezi ile askorbat peroksidaz izoenzimleri Lee ve Lee (2000) tarafından tanımlanan yöntemle belirlendi. Elektroforezden sonra jel dikkatli bir şekilde çıkarılıp 2 mM askorbik asit içeren sodyum fosfat tamponuna (pH 7,0) alınarak 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra jel, 4 mM askorbik asit ve 2 mM H₂O₂ içeren aynı tampon içerisinde 20 dakika inkübe edildi. Bundan sonra, 28 mM TEMED, 2,4 mM NBT içeren 50 mM sodyum-fosfat (pH 7,8) tamponu içerisine alınarak 10-20 dakika bekletilen jel son olarak saf su ile yıkandı ve izoenzim bantlarının yerleri belirlendi.

2.12.6. Monodehidroaskorbat Redüktaz (MDHAR) İzoenzimlerinin Belirlenmesi

Poliakrilamid jel elektroforezi ile monodehidroaskorbat redüktaz izoenzimleri Kaplan ve Beutler (1967) tarafından tanımlanan yöntemle belirlendi. Elektroforezden sonra çıkarılan jel, 1 mM NADH, 1,2 mM MTT ve 0,06 mM DCPI içeren 0,25 M Tris-HCl (pH 8,4) tamponunda 10 dakika 37°C'de karanlıkta mor bantlar gözlenene kadar inkübe edildi. Bantlar yeterli yoğunluğa ulaştığında jel 1 M HCl içerisine alınarak mavi arka zeminin temizlenmesi sağlandı. Son olarak jel suyla yıkandı ve % 50'lik etanolde muhafaza edildi.

2.12.7. Polifenol Oksidaz (PPO) İzoenzimlerinin Belirlenmesi

Poliakrilamid jel elektroforezi ile polifenol oksidaz izoenzimleri Constantinides ve Bedford (1967) tarafından tanımlanan yöntemle belirlendi. Elektroforezden sonra çıkarılan jel, 15 mM L-DOPA ve 0,1 M fosfat tamponu içeren çözeltide 37°C'de 1 saat bekletildi. İzoenzim bantları belirginleşince jel, 1 mM askorbik asit çözeltisi içerisinde 5 dakika çalkalandı. % 30'luk etil alkol içinde bekletildi.

2.13. Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi

2.13.1. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) İçeriğinin Belirlenmesi

Hidrojen peroksit içeriği Capaldi ve Taylor (1983)'a göre ölçüldü. Yaprak ve petiyolden alınan numuneler aktif kömür kullanılarak % 5 trikloroasetik asit içerisinde ekstre edildikten sonra 20.000xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın pH'sı 4 N KOH kullanılarak 3,6'ya ayarlandı. Numuneler üzerine 0,1 ml 3,32 mM formaldehid içeren 3,4 mM 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) solüsyonu ilave edildi. Reaksiyon 0,5 ml (0,5 U) 0,2 M sodyum asetat tamponu (pH 3,5) içinde hazırlanmış horseradish peroksidaz solüsyonunun ilave edilmesi ile başlatıldı ve 2 dakika sonra 1,4 ml 1 N HCl ilave edilerek reaksiyon durduruldu. 15 dakika sonra 630 nm'de absorbans ölçüldü. H₂O₂ içeriği standart eğri kullanılarak hesaplandı ve nmol g⁻¹ taze ağırlık olarak ifade edildi.

Apoplastik sıvı, yaprak ve petiyol numunelerinin 100 mM KCl (pH 5,5) tamponunda 15 dakika süresince vakumlanması ile elde edildi (Takahama ve Oniki, 1992). Apoplastik sıvıdaki H₂O₂ konsantrasyonu Jiang vd. (1990)'nın metoduna göre belirlendi. H₂O₂, 500 µl reaksiyon karışımına (500 µM amonyum ferro sülfat, 50 mM H₂SO₄, 200 µM xilenol orange, and 200 mM sorbitol) 200 µl AWF ve 300 µl H₂O₂ ilave edildikten 45 dakika sonra 560 nm'de ölçüldü. Standart H₂O₂ eğrisi 500 µl reaksiyon karışımına çeşitli miktarlarda H₂O₂ ilave edilmesiyle belirlendi.

2.13.2. Süperoksit (O₂^{•-}) İçeriğinin Belirlenmesi

Süperoksit içeriği XTT {(2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl] -2H-tetrazolium hydroxide} kullanılarak Frahry and Schopfer (2001)'a göre belirlendi. Yaprak ve petiyol simplastik numunelerinden 0,5 g alınarak küçük parçalara ayrıldı ve 3,5 unite ml⁻¹ süperoksit dismutaz (SOD) içeren ve içermeyen 5 ml 500 µM XTT içeren, 10 mM Na-sitrat tamponunda (pH 7,0) karanlıkta vakum infiltrasyonu yapıldı. Numuneler 2 saat bu tamponda bekletildi. Apoplastik alandaki süperoksit radikalini belirlemek için yaprak ve petiyolden apoplastik sıvı elde edildi. Daha sonra apoplast ve simplastta XTT indirgenmesindeki artış 470 nm'de spektrofotometrede okundu.

Süperoksitten kaynaklanacak spesifik absorpsiyon, 470 nm’de SOD’lu ve SOD’suz numuneler arasındaki fark olarak hesaplandı ve bu değer etki faktörü olarak $2,16 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak molar konsantrasyona dönüştürüldü.

2.13.3. Apoplastik H_2O_2 and $\text{O}_2^{\bullet-}$ İçin Sulandırma Katsayısının Belirlenmesi

Apoplastik hava ve su hacmi, apoplastik H_2O_2 ve $\text{O}_2^{\bullet-}$ ’nin sulandırma faktörünü (F_{dil}) hesaplamak için belirlendi. Apoplastik hava hacmini belirlemek için yaprak ve petiyol numuneleri tartıldı ve yüksek viskoziteye sahip silikon çözeltisiyle infiltre edildi. İnfiltrasyondan sonra yaprak ve petiyol numuneleri kurulandı ve tartıldı. Ağırlık artışı hava hacmini belirlemek için kullanıldı.

Apoplastik su hacmi Husted ve Schjoerring (1995)’in tanımladığı gibi belirlendi. Yaprak ve petiyol numuneleri $0,05 \text{ mol m}^{-3}$ indigo carmine (indigo-5,5’-disulphonic acid) çözeltisiyle infiltre edildi. İnfiltrasyondan sonra yaprak ve petiyol numuneleri sırasıyla $1466 \times \text{g}$ ve $825 \times \text{g}$ ’de 4°C ’de 15 dakika santrifüj edildi. İnfiltrasyondan önce (E_{inf}) ve apoplastik sıvıdaki (E_{AWF}) boyanın ekstinksiyonu 610 nm ’de ölçüldü. Apoplastik su hacmi (V_{apo} , $\text{cm}^3 \text{ H}_2\text{O cm}^{-3}$) aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$V_{apo} = (E_{inf} \times V_{air} / E_{AWF}) - V_{air} \quad (13)$$

$$F_{dil} = (V_{apo} + V_{air}) / V_{apo} \quad (14)$$

2.14. Reaktif Oksijen Türlerinin Histokimyasal Olarak Belirlenmesi

C. setosa yapraklarındaki H_2O_2 radikalinin dokusal yerleşimi Schraudner vd.(1998) tanımladığı metoda göre belirlendi. Yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca yaprak ve orta damardan alınan enine kesitler, $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ 3,3’-diaminobenzidin içeren 50 mM Tris-asetat tamponunda (pH 5,0) vakum infiltrasyon metoduna göre infiltre edildi ve 25°C ‘de karanlıkta 24 saat inkübe edildi. Kontrol, 10 mM askorbik asit varlığında belirlendi. Kesitler % 80’lik alkolde 70°C ’de 10 dakika bekletildi.

C. setosa yapraklarındaki süperoksit üretimi ise kesitlerin, 120 dakika süresince $0,25 \text{ mM}$ nitro blue tetrazolium (NBT) ve içeren 10 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,8)

inkübe edildikten sonra mavi formazonun oluşumu ile belirlendi. İnhibitörün etkisinin belirlemek için çözeltiliye 1 mM *N,N*-diethylthiocarbamate (DDC) ilave edildi. NBT ile inkübasyondan sonra kesitler kısa bir süre vakum infiltrasyon metoduna göre infiltre edildikten sonra oksidasyonu engellemek için azot gazı uygulandı. Kesitler incelenmeden önce alkolle yıkandı (Ogawa vd., 1997).

Hazırlanan preparatların fotoğrafları Olympus BX51 marka araştırma mikroskobu ve Bs200ProP Görüntü İşleme ve Analiz Sistemi kullanılarak çekildi.

2.17. İstatistik Analizler

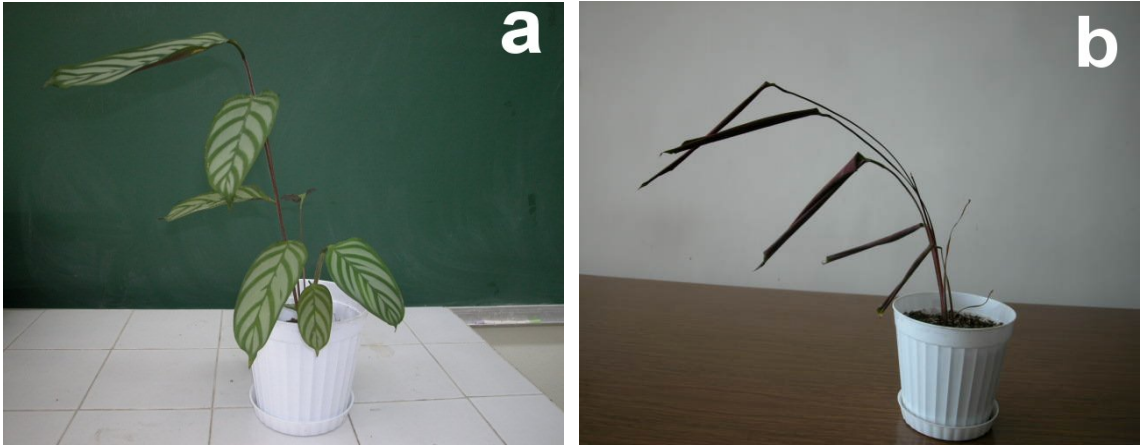
Üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilen ekstraksiyon ve analizlerin sonucunda elde edilen verilerin varyans analizi Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows 10.0) paket programı içerisinde yer alan Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. Kuraklığın Yaprak Kıvrılma Derecesi Üzerine Etkisi

Ctenanthe setosa bitkilerinin laboratuvar koşullarında kuraklık periyodunun 35. gününde kıvrılmaya başlayarak 56 gün sonunda maksimum kıvrılmaya ulaştıkları saptandı. Kuraklık periyodu arttıkça yaprak kıvrılma derecelerinin arttığı belirlendi. Gün aşırı sulanan kontrol bitkilerinin normal görünüşlü (yapraklar yere paralel) olduğu, kuraklığa maruz bırakılmış bitkilerin (stresli) ise yapraklarını silindir (veya rulo) şeklinde kıvrıldığı gözlemlendi.

Stressiz ve stresli bitkilerin genel görünüşleri Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. *C. setosa*'nın kuraklık stresine maruz bırakılmamış (a) ve strese maruz bırakılmış (b) görünümü

3.2. Kuraklığın Nispi Su İçeriği, Yaprak Su Potansiyeli ve Stoma İletkenliği Üzerine Etkisi

Kuraklığa maruz bırakılan bitkilerde, kuraklık periyodunun artmasına paralel olarak hem yaprak hem de petiyollerin nispi su içeriğinin (NSİ) kontrole göre istatistiki bakımdan önemli ölçüde ($P \leq 0,05$) azaldığı kaydedildi. Kontrol yapraklarında % 95 olan NSİ'nin kuraklık periyodu sonunda % 78, petiyollerde ise yapraklardan daha fazla azalarak % 68 değerine düştüğü belirlendi (Tablo 1).

Kuraklık periyodunun artmasına paralel olarak yaprak kıvrılma derecesi artarken yaprak su potansiyelinin (Ψ) istatistiki açıdan ($P \leq 0,05$) önemli derecede azaldığı belirlendi. Kontrolde -0,15 MPa olan yaprak su potansiyelinin, % 26 oranında kıvrılan yapraklarda -0,18 MPa, % 54 oranında kıvrılan yapraklarda -0,50 MPa ve % 74 oranında kıvrılan yapraklarda ise -1,18 MPa'ya düştüğü kaydedildi.

Kıvrılma derecesinin artmasına paralel olarak stoma iletkenliğinin de stres boyunca önemli derecede ($P \leq 0,05$) azaldığı bulundu. Bitkilerin % 26, % 54 ve % 74 yaprak kıvrılma derecelerindeki stoma iletkenliklerinin kontrole oranla sırasıyla % 55, % 57 ve % 66 oranında azaldıkları saptandı (Tablo 1).

Tablo 1. Kuraklık stresine maruz bırakılmış *C. setosa* bitkisindeki yaprak kıvrılma derecesi, nispi su içeriği (%), yaprak su potansiyeli ve stoma iletkenliği. Stoma iletkenliği kıvrılmış ve kıvrılmamış yaprakların açık alanlarında ölçüldü.

Kuraklık Periyodu	Yaprak		Yaprak Su Potansiyeli (MPa)	Stoma İletkenliği (cm s^{-1})	
	Kıvrılma Derecesi (%)	Nispi Su İçeriği (%)			
		Yaprak	Petiyol		
0	0	95,00±0,70 d	97,37±0,54 d	-0,15 ± 0,05 a	0,020±0,002 c*
35	26±2,99	91,21±2,51 c	93,61±0,90 c	-0,18 ± 0,05 a	0,009±0,001 b
47	54±3,16	82,03±0,39 b	79,05±0,07 b	-0,50 ± 0,06 b	0,009±0,001 b
56	74±2,82	78,85±0,27 a	68,26±2,17 a	-1,18 ± 0,11 c	0,007±0,001 a

*Üç tekerrürlü ortalamanın standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

3.3. Glukoz-6-Fosfat-Dehidrogenaz (G-6-PDH) Aktivitesi

Bu çalışmada, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PDH) apoplastik sıvının, simplastik sıvıdan bulaşmama işareti olarak kabul edilen sitoplazmik belirleyici enzim olarak kullanıldı. Apoplastik sıvıdaki söz konusu enzim aktivitesinin %1'den fazla olmadığı sonucuna varıldı. Yapılan analizlerde G-6-PDH aktivitesi 0'a yakın bir değerde bulundu. Böylece apoplastik sıvı çok saf bir yüzdede elde edildi (Tablo 2).

Tablo 2. Kuraklık stresine maruz bırakılmış *C. setosa* bitkisinde Glukoz-6-fosfat-dehidrogenaz (G-6-PDH, ΔA_{340} /dk/g taze ağırlık) aktivitesindeki değişimler

Yaprak Kıvrılma Derecesi(%)	G-6-PDH (Yaprak)			G-6-PDH (Petirol)		
	Apoplast	Simplast	Apo/Simp (%)	Apoplast	Simplast	Apo/Simp (%)
0	0,069±0,028	92±2,82	0,075	0,058±0,011	30±2,12	0,19
26	0,114±0,053	162±4,24	0,070	0,060±0,007	38±1,41	0,15
54	0,130±0,071	212±6,36	0,061	0,150±0,021	46±4,24	0,32
74	0,158±0,014	182±5,65	0,086	0,133±0,032	28±0,70	0,47

*Üç tekerrürlü ortalamının standart sapması.

3.4. Kuraklık Stresinin Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Üzerine Etkisi

Apoplastik hava ve su hacmi apoplastik hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) hesaplamalarında önemli parametrelerdir. Apoplastik hava boşluğunun infiltrasyonu apoplastik sıvının sulanmasına neden olduğu için apoplastik sıvıdaki çözünen konsantrasyonu sulandırma faktörü ile doğrulanmak zorundadır. H_2O_2 'nin hesaplanmasında kullanılan sulandırma faktörü yaprak ve petiyol için 1,8 ve 2,2, süperoksit için sırasıyla 1,2 ve 1,5 olarak bulundu.

3.4.1. Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Üzerine Etkisi

Kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerin yaprak ve petiyollerinde yapılan analizler sonucunda apoplastik ve simplastik H_2O_2 içeriğinin kontrolle kıyaslandığında % 54 yaprak kıvrılma derecesine kadar arttığı fakat daha sonra % 74 maksimum kıvrılma derecesinde azaldığı bulundu. H_2O_2 içeriğinin apoplast ile kıyaslandığında yaprak ve petiyol simplastik alanlarında daha yüksek olduğu belirlendi. Yaprak ve petiyol simplastik alanlarında sırasıyla 1,4 ve 2,1 katlık, apoplastik alanda ise 2,1 ve 2 katlık artışların olduğu tespit edildi. H_2O_2 içeriğindeki bu artışların istatistiki bakımdan önemli olduğu ($P \leq 0,05$) saptandı (Tablo 3).

Tablo 3. *C. setosa*'da yaprak kıvrılması boyunca H_2O_2 ($\mu\text{mol g}^{-1}$ taze ağırlık) içeriğinde meydana gelen değişimler

Yaprak Kıvrılma Derecesi(%)	Yaprak		Petiyol	
	Simplast	Apoplast	Simplast	Apoplast
0	$3,8 \pm 0,6$ a*	$1,5 \pm 0,4$ a	$6,7 \pm 0,1$ a	$1,3 \pm 0,4$ a
26	$4,8 \pm 0,4$ ab	$1,6 \pm 0,2$ a	$9,7 \pm 0,1$ b	$1,4 \pm 0,3$ a
54	$5,5 \pm 0,7$ b	$3,1 \pm 0,3$ b	$14,3 \pm 0,6$ c	$2,6 \pm 0,3$ b
74	$4,7 \pm 0,3$ ab	$1,7 \pm 0,4$ a	$9,4 \pm 0,3$ b	$1,7 \pm 0,3$ a

*Üç tekerrürlü ortalamının standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

3.4.2. Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) Üzerine Etkisi

Kuraklık periyodu boyunca yaprak ve petiyolde yapılan analizler sonucunda simplastik $O_2^{\bullet-}$ üretiminin önemli derecede arttığı belirlendi. Yaprak ve petiyol simplastik alanlarında sırasıyla 2,1 ve 1,3 katlık artışların olduğu bulundu. Apoplastik alanda ise $O_2^{\bullet-}$ üretiminde kontrolle kıyaslandığında yaprak ve petiyolde % 54 kıvrılma derecesine kadar sırasıyla 5,0 ve 4,6 katlık artışların olduğu fakat daha sonra azaldığı (% 74 kıvrılma derecesinde) saptandı. Ayrıca yaprak ve petiyol apoplastik alanındaki $O_2^{\bullet-}$ miktarının simplastik alandakinden daha yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 4).

Tablo 4. *C. setosa*'da yaprak kıvrılması boyunca $O_2^{\bullet-}$ ($\text{nmol min}^{-1}\text{g}$ taze ağırlık) içeriğinde meydana gelen değişimler

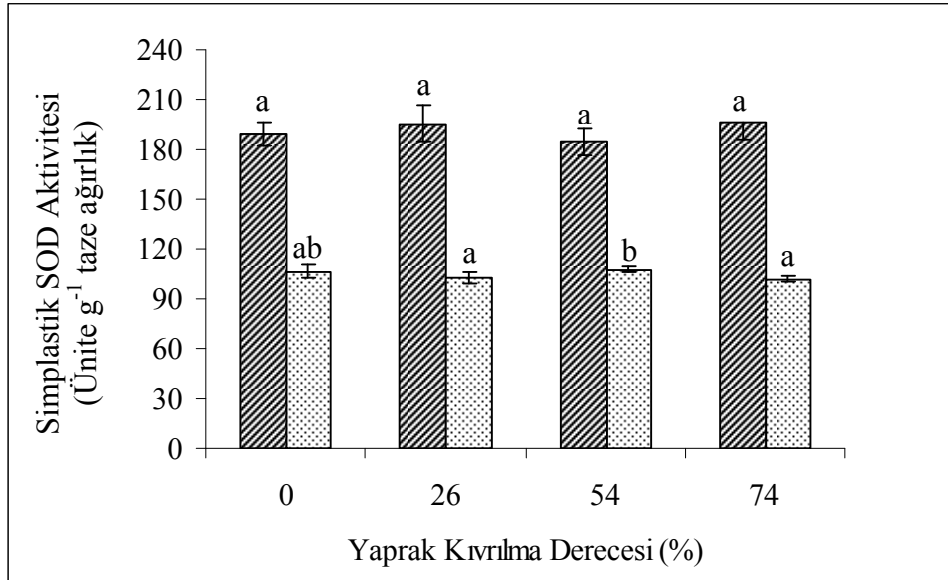
Yaprak Kıvrılma Derecesi(%)	Yaprak		Petiyol	
	Simplast	Apoplast	Simplast	Apoplast
0	$31,8 \pm 1,6$ a	$101,6 \pm 30,9$ a	$27,3 \pm 4,4$ a	$24,0 \pm 22,3$ a
26	$37,3 \pm 0,9$ b	$246,0 \pm 14,8$ b	$32,9 \pm 1,2$ b	$71,6 \pm 15,5$ b
54	$41,1 \pm 1,2$ b	$504,2 \pm 13,7$ c	$31,4 \pm 0,4$ ab	$110,2 \pm 15,6$ c
74	$67,9 \pm 5,1$ c	$284,2 \pm 26,2$ b	$35,5 \pm 0,8$ b	$61,4 \pm 10,2$ b

*Üç tekerrürlü ortalamının standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

3.5. Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Üzerine Etkisi

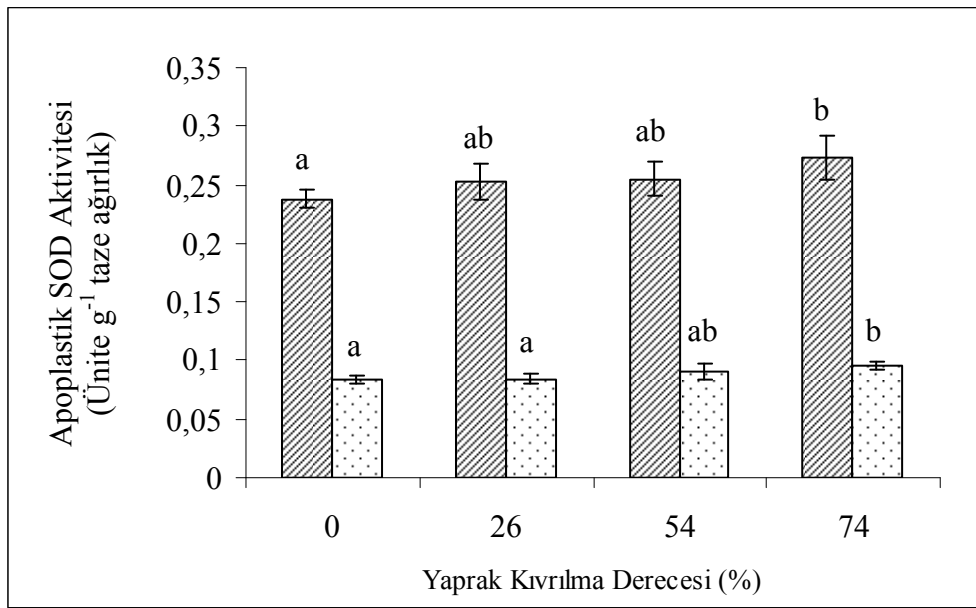
Kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerin yaprak ve petiyollerinde yapılan analizler sonucunda, kıvrılma derecesinin artmasıyla beraber apoplastik ve simplastik süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin önemli derecede değişmediği belirlendi. Apoplastik alandaki SOD aktivitesinin simplasta oranla çok daha düşük olduğu bulundu. Örneğin, yaprak simplastik alanında g taze ağırlık başına 189 ünite enzim olarak hesaplanan SOD aktivitesinin, yaprak apoplastik alanında ise 0,240 ünite enzim olduğu belirlendi.

Yaprak simplastik alanındaki SOD aktivitesinin, kontrolle kıyaslandığında istatistiki bakımdan ($P \leq 0,05$) önemli ölçüde değişmediği bulundu. Kontrol bitkilerinin yapraklarında g taze ağırlık başına 189 ünite enzim olarak hesaplanan aktivitenin % 26 kıvrılma derecesinde 195 ünite, % 54 kıvrılma derecesinde 184 ünite ve % 74 kıvrılma derecesinde ise 196 üniteye kadar arttığı belirlendi. Bununla beraber kıvrılma derecesi artarken bu artışların istatistiki bakımdan önemli olmadığı tespit edildi. Petiyol simplastik alanında ise, aktivitenin sadece % 54 kıvrılma derecesinde istatistiki bakımdan ($P \leq 0,05$) önemli olduğu, % 26 ve % 74 kıvrılma dereceleri arasındaki farkın önemli olmadığı belirlendi (Şekil 4).



Şekil 4. *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında 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 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir) ▨ Yaprak ▩ Petiyol

Apoplastik SOD aktivitesinin hem yaprak hem de petiyolde kuraklığın başlangıcında önemli ölçüde değişmediği fakat % 74 yaprak kıvrılma derecesinde her iki bitkisel yapıda da aktivitenin arttığı belirlendi. Kontrol bitkilerinin yaprak apoplastik alanındaki g taze ağırlık başına 0,238 ünite enzim olarak bulunan aktivitenin % 26 kıvrılma derecesinde 0,253 üniteye % 54 kıvrılma derecesinde 0,255 üniteye ve % 74 kıvrılma derecesinde 0,273 üniteye arttığı kaydedildi. Petiyol apoplastik alanındaki SOD aktivitesi ise kontrol, % 26 ve % 54 yaprak kıvrılma derecelerinde sırasıyla 0,084, 0,084 ve 0,089 ünite enzim olarak hesaplanırken, % 74 kıvrılma derecesinde 0,096 üniteye arttığı bulundu (Şekil 5).

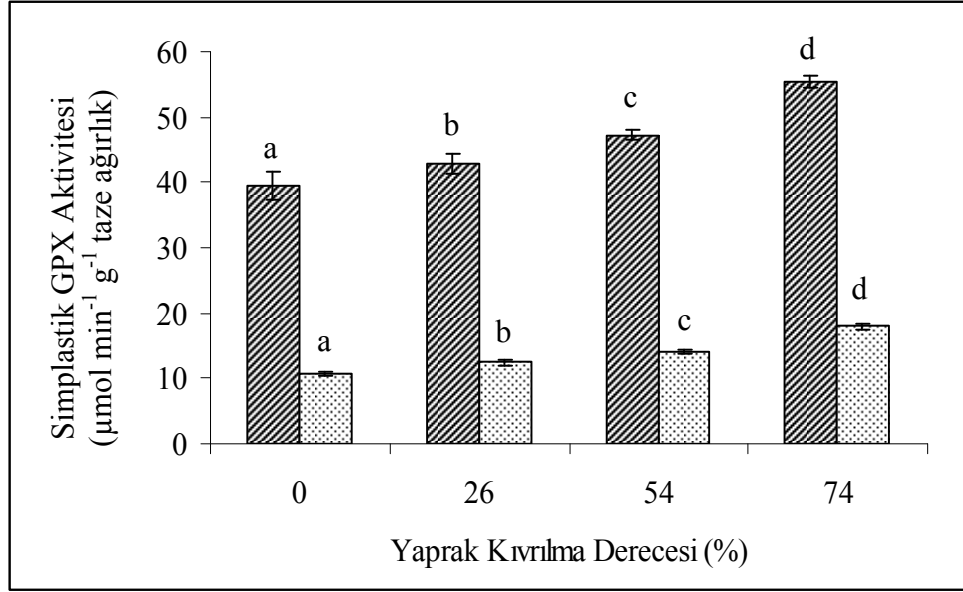


Şekil 5. *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca SOD aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir) ▨ Yaprak ▩ Petiyol

3.6. Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Guaiakol Peroksidaz (GPX) Aktivitesi Üzerine Etkisi

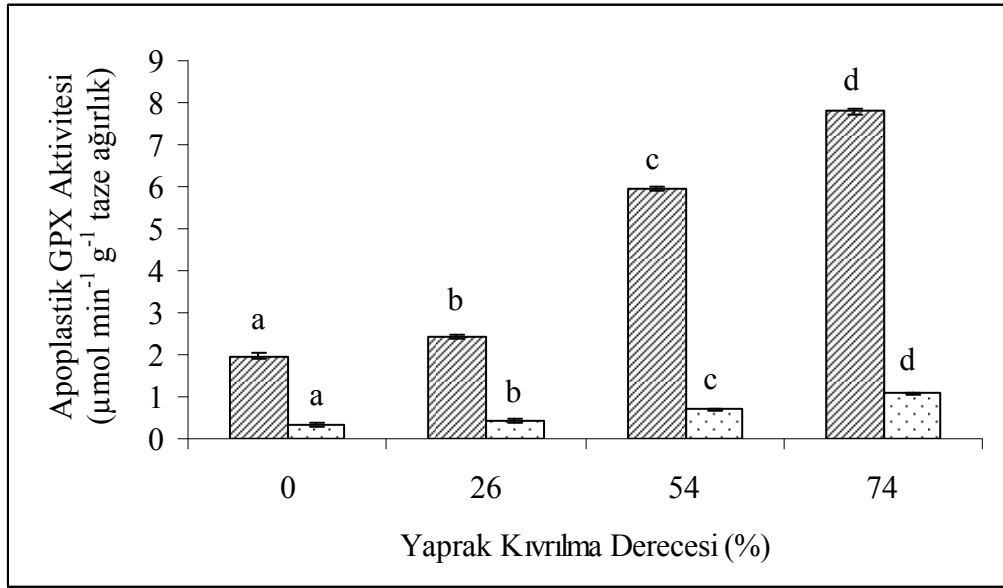
Kuraklık periyodu boyunca kıvrılma derecesi artarken, apoplastik ve simplastik guaiakol peroksidaz (GPX) aktivitesinin kontrolle kıyaslandığında yaprak ve petiyolde önemli derecede arttığı belirlendi. En yüksek GPX aktivitesi yaprak simplastik alanında bulundu. Yaprak simplastik alanındaki enzim aktivitesinin, % 26, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde sırasıyla % 9, % 19,5 ve % 41, petiyolde ise % 16, % 32 ve % 67 oranında



arttığı kaydedildi. Ayrıca kıvrılmanın bütün aşamalarında GPX aktivitesinde meydana gelen bu artışların istatistiki bakımdan önemli olduğu ($P \leq 0,05$) tespit edildi (Şekil 6).



Şekil 6. *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca GPX aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir) ▨ Yaprak ▩ Petiyol

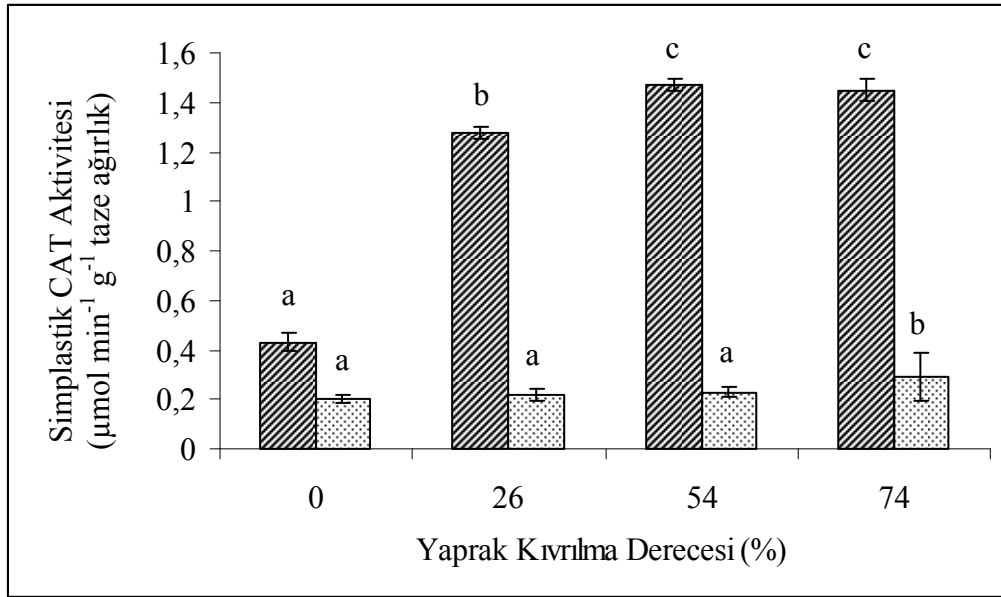
Yaprak apoplastik alanındaki GPX aktivitesinin petiyoldekenden daha yüksek olduğu bulundu. Yaprakta apoplasttaki aktivitenin % 26, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde sırasıyla % 23, % 203 ve % 296, petiyolde ise % 29, % 100 ve % 214 oranında arttığı belirlendi. Ayrıca her iki bitkisel yapının simplastik alanlarındaki GPX aktivitesinin apoplastakinden çok daha yüksek olduğu kaydedildi (Şekil 7).



Şekil 7. *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca GPX aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir)  Yaprak  Petiyol

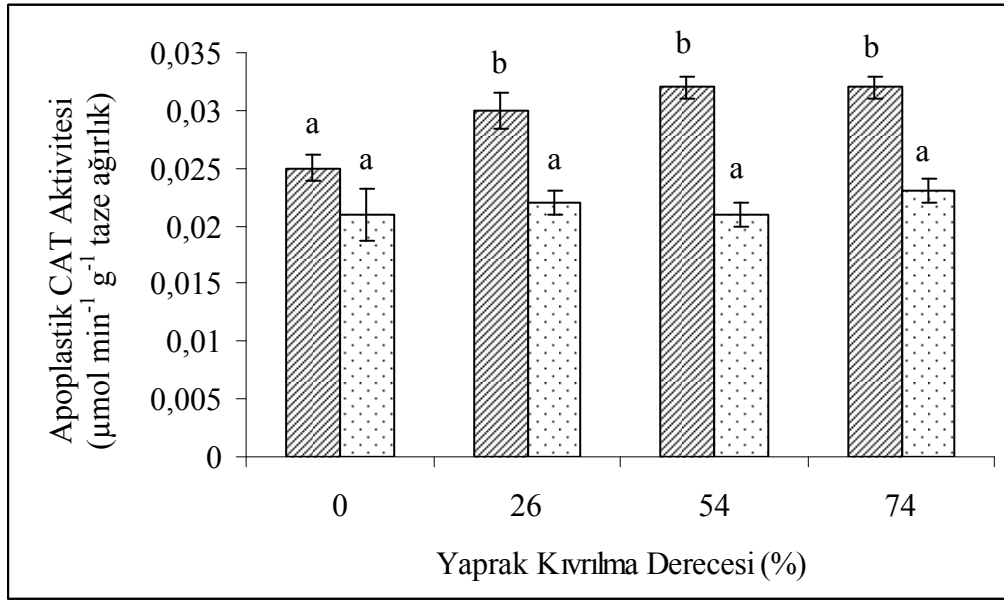
3.7. Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Katalaz (CAT) Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kıvrılma derecesinin artmasıyla beraber bitkilerin yaprak ve petiyollerinde yapılan analizler sonucunda simplastik ve apoplastik katalaz aktivitesinin istatistiki açıdan önemli derecede arttığı ($P \leq 0,05$) kaydedildi. Yaprak ve petiyoldeki simplastik katalaz aktivitesinin kontrolle kıyaslandığında arttığı saptandı. Aktivitedeki bu artışın yaprakta kıvrılma periyodu boyunca, petiyolde ise sadece % 74 kıvrılma derecesinde olduğu belirlendi. Yapraktaki simplastik katalaz aktivitesinin, % 26, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde sırasıyla % 198, % 242 ve % 237, petiyolde ise % 10, % 15 ve % 45 oranında arttığı görüldü (Şekil 8).



Şekil 8. *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca CAT aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir) ▨ Yaprak ▩ Petiyol

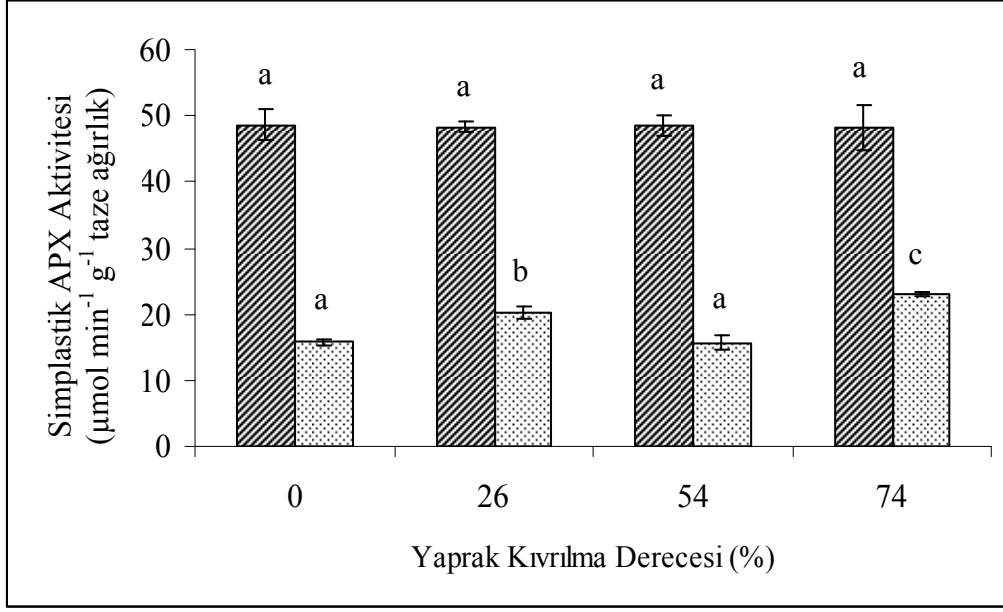
Apoplastik katalaz aktivitesinin yaprakta kıvrılma boyunca arttığı, petiyolde ise önemli derecede değişmediği belirlendi. Yaprak apoplastik alanındaki katalaz aktivitesinin % 26, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde sırasıyla % 20, % 28 ve % 28 oranında arttığı bulundu. En düşük katalaz aktivitesi petiyol apoplastında bulunurken, en yüksek aktivite yaprak simplastında kaydedildi (Şekil 9).



Şekil 9. *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca CAT aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir) ▨ Yaprak ▩ Petiyol

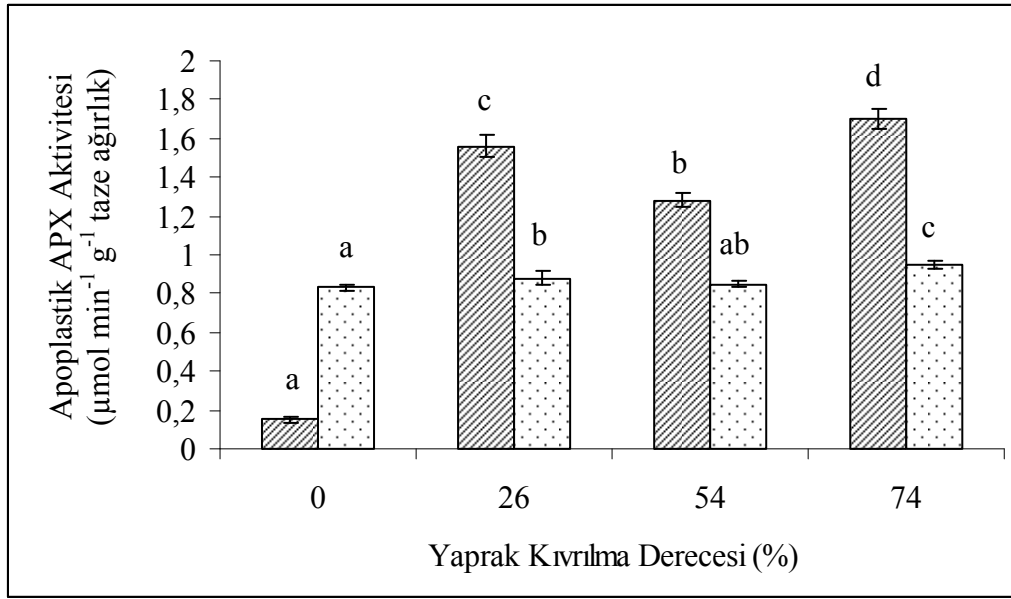
3.8. Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kuraklık periyodu boyunca bitkilerin yaprak ve petiyollerinde yapılan analizler sonucunda en yüksek apoplastik ve simplastik APX aktivitesinin yaprakta olduğu görüldü. Bununla birlikte, simplasttaki aktivite apoplasttaki aktiviteden daha yüksekti. Kuraklık periyodu esnasında yaprakta simplastik APX aktivitesinin kontrolle kıyaslandığında önemli ölçüde değişmediği fakat petiyolde % 26 ve % 74 kıvrılma derecelerinde arttığı belirlendi. Petiyoldeki aktivitenin kontrolde taze ağırlık başına 15,70 µmol iken, % 26 kıvrılma derecesinde % 29 oranında artarak 20,23 µmol'e yükseldiği daha sonra % 54 kıvrılma derecesinde 15,63 µmol'e düştüğü ve % 74 kıvrılma derecesinde ise % 46,5 oranında artarak 23,01 µmol'e yükseldiği görüldü. Aktivitedeki artışlarının istatistiki bakımdan önemli olduğu ($P \leq 0,05$) tespit edildi (Şekil 10).



Şekil 10. *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca APX aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir) █ Yaprak █ Petiyol

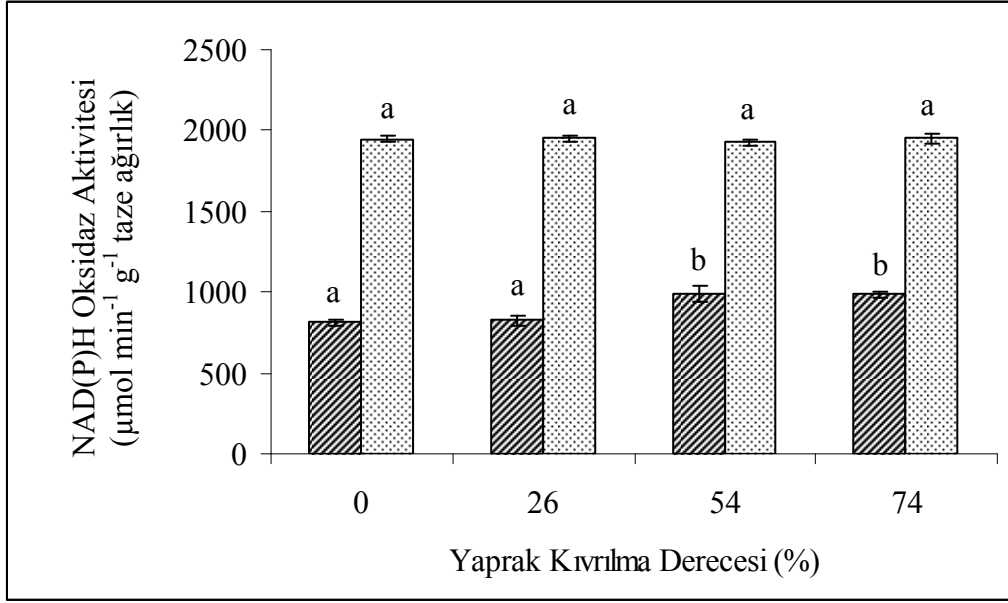
Kıvrılma arttıkça yaprak ve petiyoldeki apoplastik APX aktivitesinin kontrolle kıyaslandığında arttığı, petiyolde sadece % 54 kıvrılma derecesinde aktivitenin değişmediği belirlendi. Kontrol bitki grubunda yaprakta taze ağırlık başına 0,15 µmol olan aktivite % 26 kıvrılma derecesinde 1,56 µmol, % 54 kıvrılma derecesinde 1,28 µmol ve % 74 maksimum kıvrılma derecesinde 1,70 µmol'e yükseldiği saptandı. Petiyol apoplastında ise kontrolde 0,83 µmol olan aktivite % 26 kıvrılma derecesinde 0,88 µmol, % 54 kıvrılma derecesinde 0,85 µmol ve % 74 kıvrılma derecesinde ise, % 14,5 oranında artarak 0,95 µmol'e yükseldiği bulundu. Apoplasttaki en yüksek APX aktivitesi % 74 kıvrılma derecesinde görüldü (Şekil 11).



Şekil 11. *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca APOX aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir) ▨ Yaprak ▤ Petiyol

3.9. Kuraklık Stresinin NAD(P)H Oksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

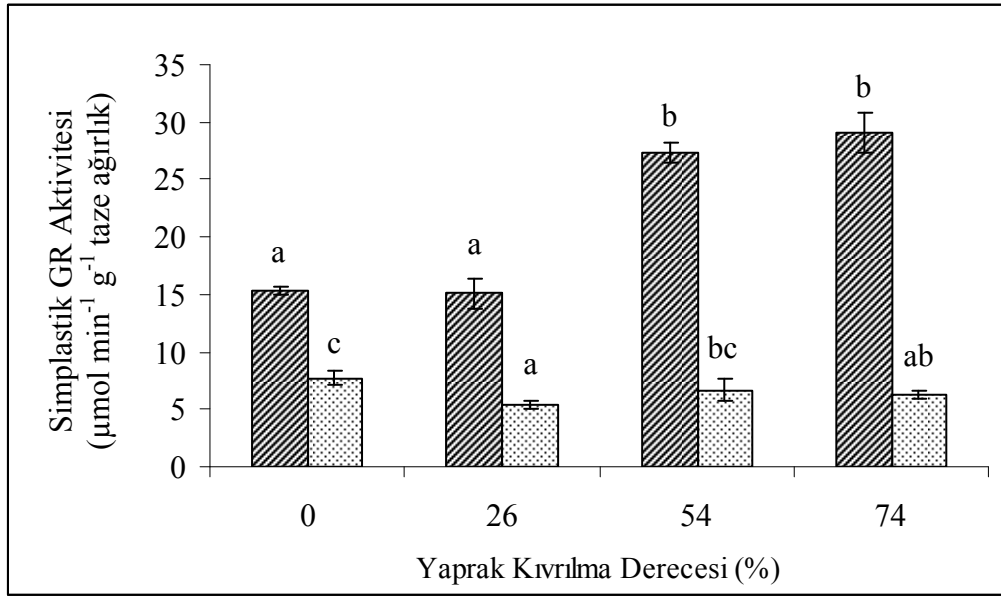
NAD(P)H oksidaz aktivitesi yaprakta kontrolle kıyaslandığında arttığı saptandı. Bu artışların % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde istatistiki bakımdan önemli olduğu ($P \leq 0,05$) tespit edildi. Yapraktaki bu aktivitedeki artışın yaklaşık olarak 1,2 kat olduğu görüldü. Buna karşılık petiyolde tüm kıvrılma periyotlarında aktivitede değişim olmadığı bulundu (Şekil 12).



Şekil 12. *C. setosa*'nın yaprak ve petiyolde kıvrılma derecesinin artışı boyunca NAD(P)H Oksidaz aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir) ▨ Yaprak ▩ Petiyol

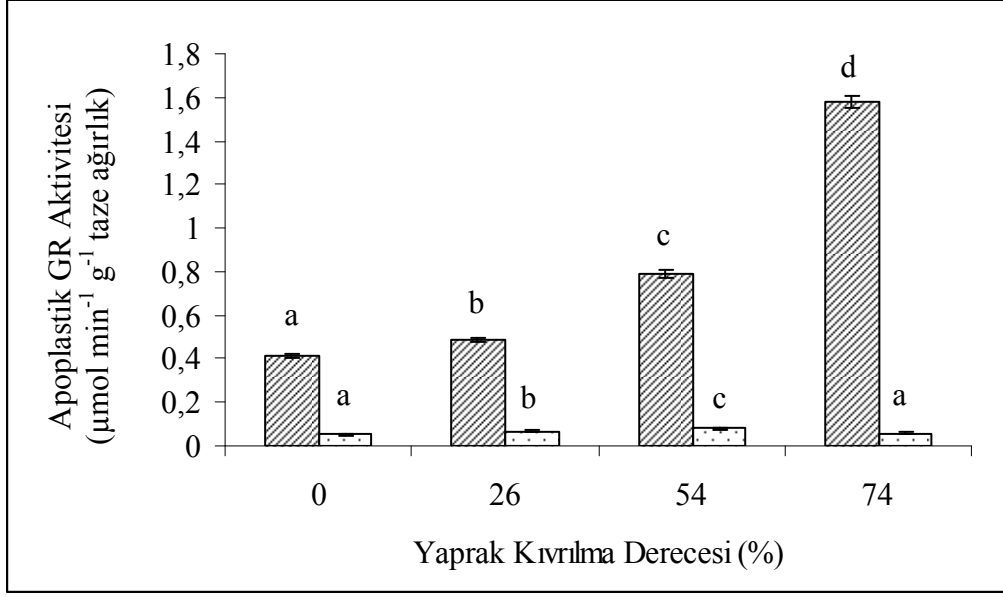
3.10. Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kıvrılma derecesinin artmasıyla beraber kuraklık periyodu arttıkça yaprak simplastik alanındaki glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin kontrolle kıyaslandığında arttığı ve bu artışın istatistikî bakımdan önemli olduğu ($P \leq 0,05$) belirlendi. Enzim aktivitesinin % 26 kıvrılma derecesinde % 1 oranında azaldığı, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde ise sırasıyla, % 79 ve % 93 oranında arttığı görüldü. Petiyolde ise GR aktivitesinin kontrolle kıyaslandığında azaldığı ve bu azalışın % 26, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde sırasıyla, % 31, % 14 ve % 19,5 oranında olduğu bulundu (Şekil 13)



Şekil 13. *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca GR aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir) ▨ Yaprak ▩ Petiyol

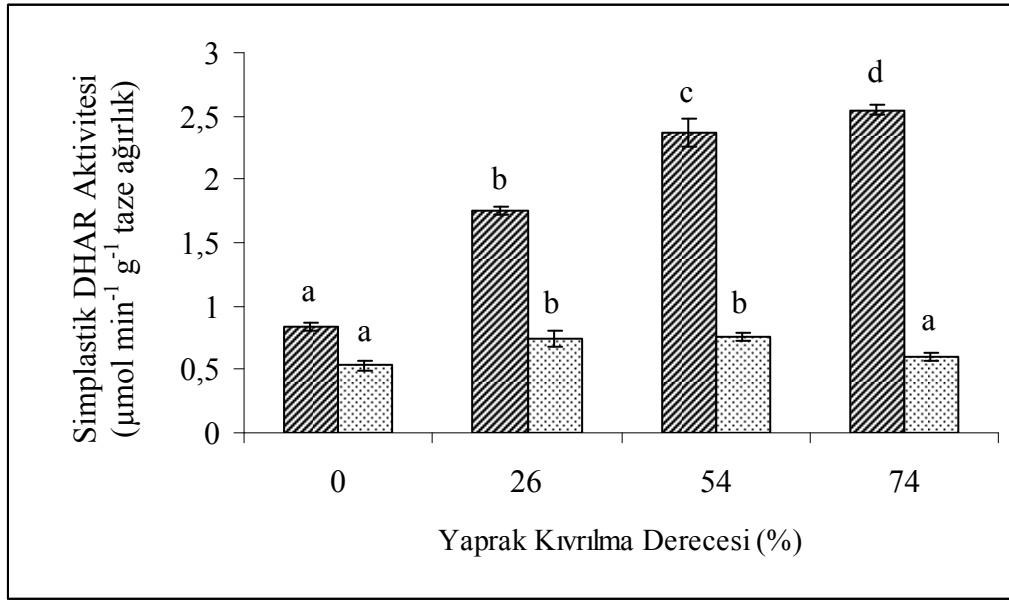
Kuraklık periyodu boyunca yaprakta apoplastik GR aktivitesinin simplastik GR aktivitesinde olduğu gibi kontrolle kıyaslandığında arttığı, petiyolde ise aktivitenin % 26 ve % 54 kıvrılma derecelerinde arttığı daha sonra azaldığı görüldü. Apoplasttaki aktivitenin % 26, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde sırasıyla, yaprakta % 19,5 % 93 ve % 285, petiyolde ise, % 26, % 46 ve % 5,5 oranında arttığı kaydedildi. Yapraktaki artışların tüm kıvrılma derecelerinde petiyolde ise sadece % 26 ve % 54 kıvrılma derecelerinde istatistiki bakımdan önemli olduğu ($P \leq 0,05$) tespit edildi. Ayrıca, en yüksek GR aktivitesi yaprak simplastında belirlenirken, en düşük aktivitenin petiyol apoplastında olduğu görüldü (Şekil 14).



Şekil 14. *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca GR aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir) ▨ Yaprak □ Petiyol

3.11. Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Dehidroaskorbat Redüktaz (DHAR) Aktivitesi Üzerine Etkisi

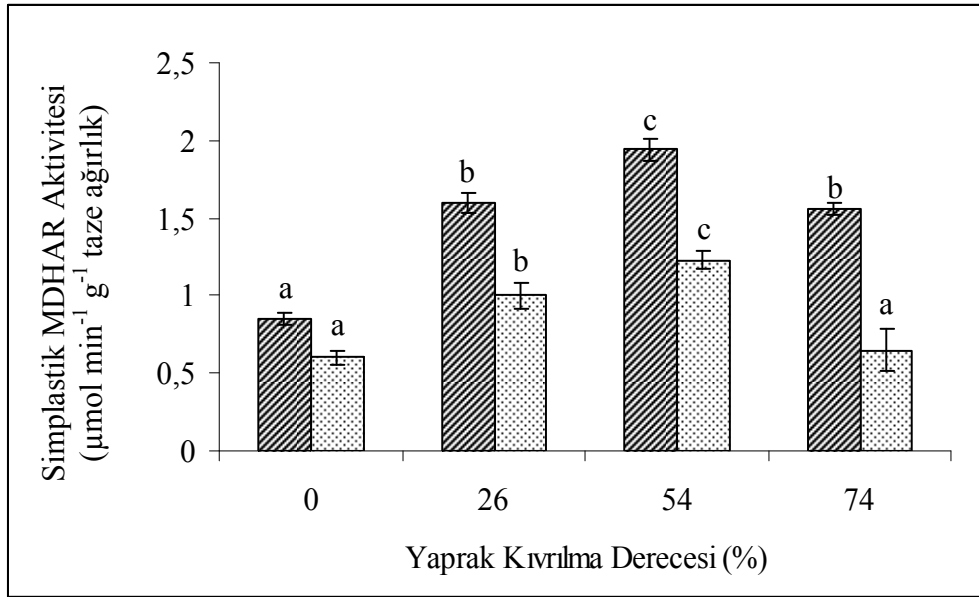
Kuraklık periyodu boyunca yaprak ve petiyolde yapılan analizler sonucunda dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) aktivitesinin sadece yaprak ve petiyol simplastik alanında var olduğu apoplastik alanda ise aktivitenin olmadığı görüldü. Yaprak simplastik alanındaki DHAR aktivitesinin kontrolle kıyaslandığında önemli ölçüde arttığı ve bu artışın istatistikî açıdan önemli olduğu ($P \leq 0,05$) belirlendi. Yapraktaki bu artışların % 26, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde sırasıyla, % 101, % 172 ve % 193 oranında olduğu görüldü. Petiyol simplastında ise aktivitenin, % 26 kıvrılma derecesinde % 40 ve % 54 kıvrılma derecesinde % 43 oranında arttığı bulundu. Ancak % 74 kıvrılma derecesinde ise aktivitenin değişmediği kaydedildi (Şekil 15).



Şekil 15. *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca DHAR aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir) ▨ Yaprak ▩ Petiyol

3.12. Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Monodehidroaskorbat Redüktaz (MDHAR) Aktivitesi Üzerine Etkisi

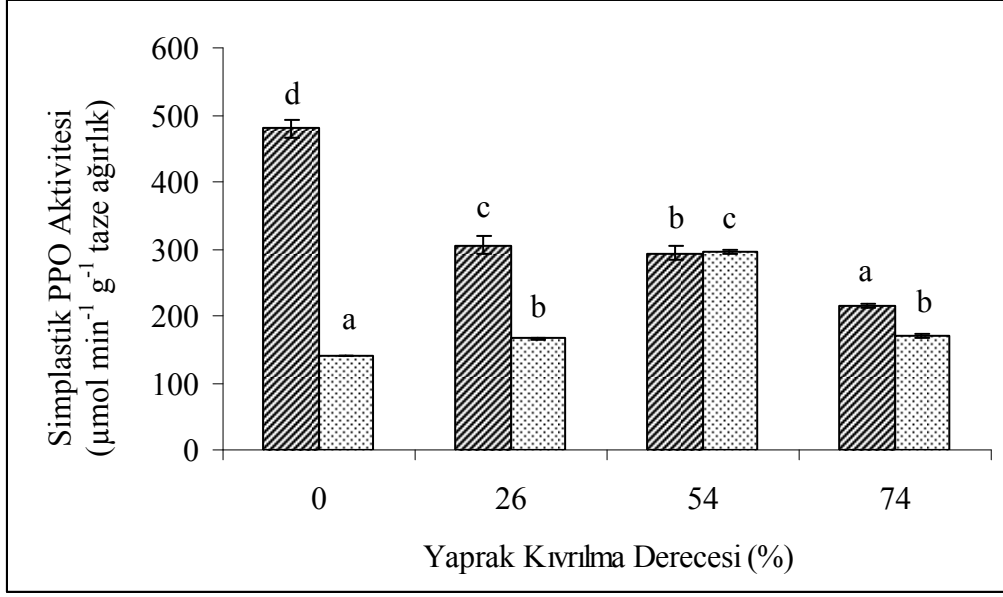
Yaprak ve petiyollerde yapılan analizler sonucunda, monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) aktivitesinin DHAR aktivitesinde olduğu gibi sadece yaprak ve petiyol simplastik alanında var olduğu her iki bitkisel yapının apoplastik alanında ise olmadığı görüldü. Simplasttaki MDHAR aktivitesinin hem yaprak hem de petiyolde kontrolle kıyaslandığında arttığı bulundu. Yapraktaki aktivite artışının tüm kıvrılma derecelerinde istatistiki bakımdan önemli olduğu ($P \leq 0,05$) belirlendi. Ancak petiyolde aktivitedeki artışın sadece % 26 ve % 54 kıvrılma derecelerinde önemli olduğu, % 74 maksimum kıvrılma derecesinde ise aktivitenin kontrol seviyesine düştüğü kaydedildi. Simplasttaki aktivitenin yaprakta, % 26, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde sırasıyla, % 88, % 128 ve % 83,5 petiyolde ise % 67, % 105 ve % 8 oranında arttığı görüldü (Şekil 16).



Şekil 16. *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca MDHAR aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir) ▨ Yaprak ▩ Petiyol

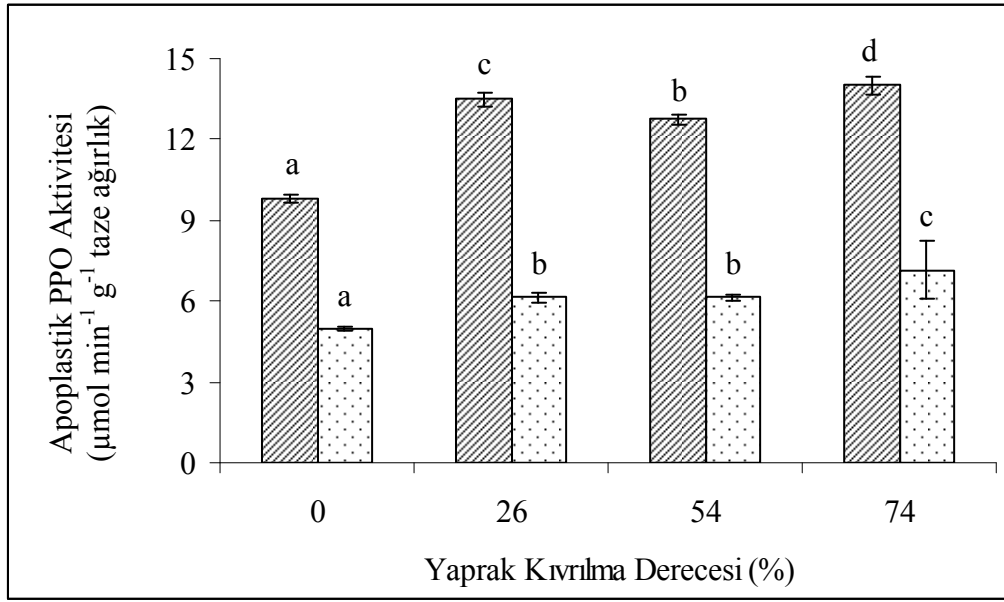
3.13. Kuraklık Stresinin Apoplastik ve Simplastik Polifenol Oksidaz (PPO) Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kuraklık periyodu boyunca kıvrılma derecesinin artmasına paralel olarak yaprak simplastik polifenol oksidaz aktivitesinin kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan ($P \leq 0,05$) önemli derecede azaldığı bulundu. Enzim aktivitesinde % 26, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde sırasıyla % 36,20, % 38,68 ve % 55,11 oranında azalış olduğu görüldü. Petiyolde ise simplastik PPO aktivitesinin % 26 ve % 54 kıvrılma derecelerinde kontrole kıyasla arttığı % 74 maksimum kıvrılma derecesinde ise tekrar azaldığı belirlendi. % 74 kıvrılma derecesindeki aktivitenin % 26 kıvrılma derecesindeki aktivite arasında istatistiki açıdan fark olmadığı görüldü (Şekil 17).



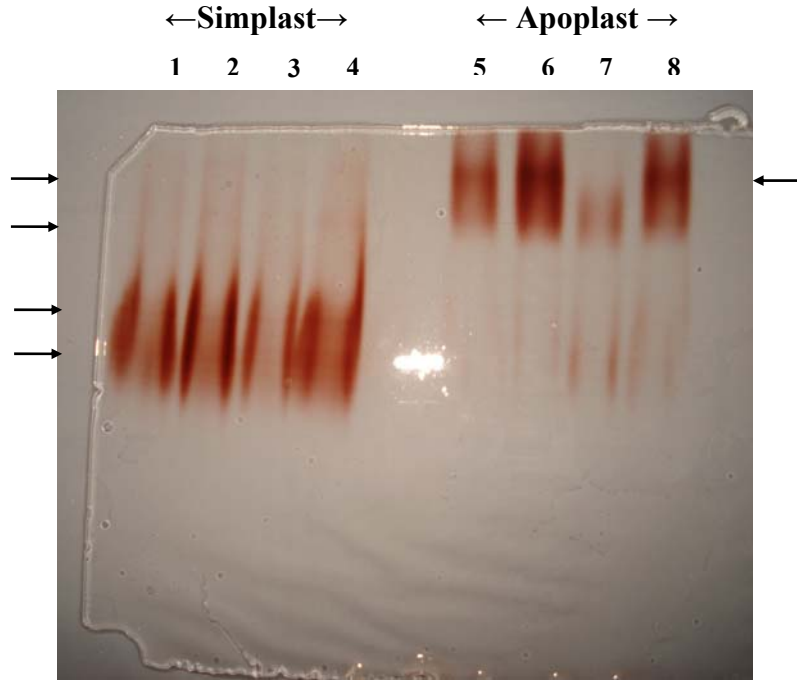
Şekil 17. *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol simplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca PPO aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir) ▨ Yaprak ▩ Petiyol

Yaprak ve petiyol apoplastik alanlarındaki PPO aktivitesinin kuraklık periyodu arttıkça arttığı bulundu. Yaprak apoplastik PPO aktivitesinin % 26, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde sırasıyla, % 37,69, % 30,23 ve % 43,20 petiyolde ise % 23,04, % 22,84 ve % 43,48 oranında arttığı görüldü. Yaprak apoplastındaki aktivitenin tüm kıvrılma derecelerinde istatistik açıdan önemli olduğu, petiyolde ise % 26 ve % 54 kıvrılma dereceleri arasındaki farkın önemli olmadığı diğer kıvrılma dereceleri arasındaki farkın önemli olduğu kaydedildi (Şekil 18).



Şekil 18. *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin artışı boyunca PPO aktivitesindeki değişiklikler (Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Her bir yaprak kıvrılma derecesinde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir) ▨ Yaprak ▩ Petiyol

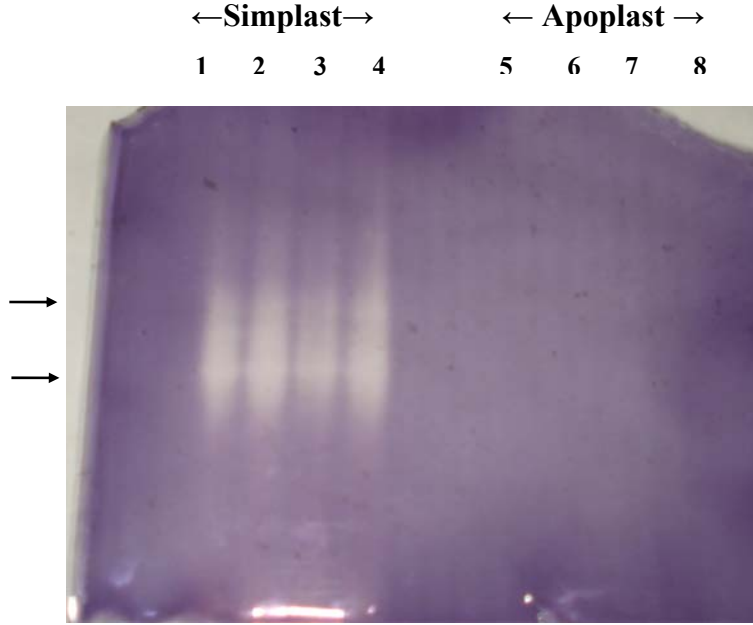
3.14. Kuraklık Stresinin Guaiakol Peroksidaz (GPX) İzoenzimleri Üzerine Etkisi



Şekil 19. *C. setosa*'nın yaprak simplast ve apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin GPX izoenzimleri üzerine etkisi (Simplast-1: Kontrol, 2: % 26, 3: % 54, 4: % 74; Apoplast-5: Kontrol, 6: % 26, 7: % 54, 8: % 74 kıvrılma derecesi).

GPX izoenzimleri ile yapılan poliakrilamid jel elektroforezi analizlerine göre *C. setosa* yaprak simplastında 4 tane peroksidaz izoenzim bandının olduğu tespit edildi. Apoplastta ise sadece bir tane izoenzim bandı görüldü (Şekil 19). Simplastta var olan 4 battan 2 bandın apoplastta olmadığı belirlendi.

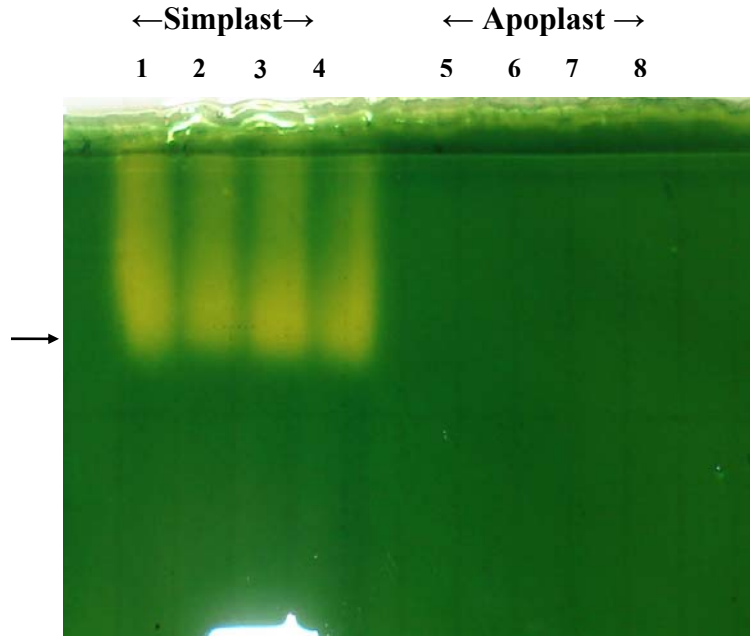
3.15. Kuraklık Stresinin Süperoksit Dismutaz (SOD) İzoenzimleri Üzerine Etkisi



Şekil 20. *C. setosa*'nın yaprak simplast ve apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin SOD izoenzimleri üzerine etkisi (Simplast-1: Kontrol, 2: % 26, 3: % 54, 4: % 74; Apoplast-5: Kontrol, 6: % 26, 7: % 54, 8: % 74 kıvrılma derecesi).

SOD izoenzimleri ile yapılan elektroforez çalışmaları sonucu sadece simplastik alanda 2 izoenzim bandının varlığı belirlendi. Bu izoenzim bandlarının tüm kıvrılma derecelerinde var olduğu gözlemlendi. Spektrofotometrik ölçümler sonucu SOD'un çok düşük aktivite göstermesinden dolayı yaprak apoplastında SOD izoenzimi belirlenemedi (Şekil 20).

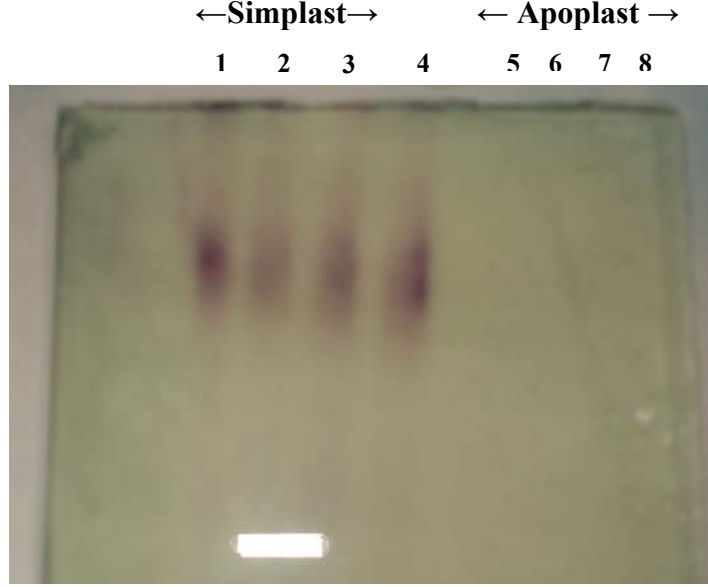
3.16. Kuraklık Stresinin Katalaz (CAT) İzoenzimleri Üzerine Etkisi



Şekil 21. *C. setosa*'nın yaprak simplast ve apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin CAT izoenzimleri üzerine etkisi (Simplast-1: Kontrol, 2: % 26, 3: % 54, 4: % 74; Apoplast-5: Kontrol, 6: % 26, 7: % 54, 8: % 74 kıvrılma derecesi).

CAT izoenzimleri ile yapılan elektroforez çalışmaları sonucunda simplastik alanda sadece tek bir izoenzim bandının varlığı belirlendi. Bu izoenzim bandının tüm kıvrılma derecelerinde var olduğu gözlemlendi. Spektrofotometrik ölçümler sonucu CAT'ın çok düşük aktivite göstermesinden dolayı yaprak apoplastında herhangi bir CAT izoenzimi belirlenemedi (Şekil 21).

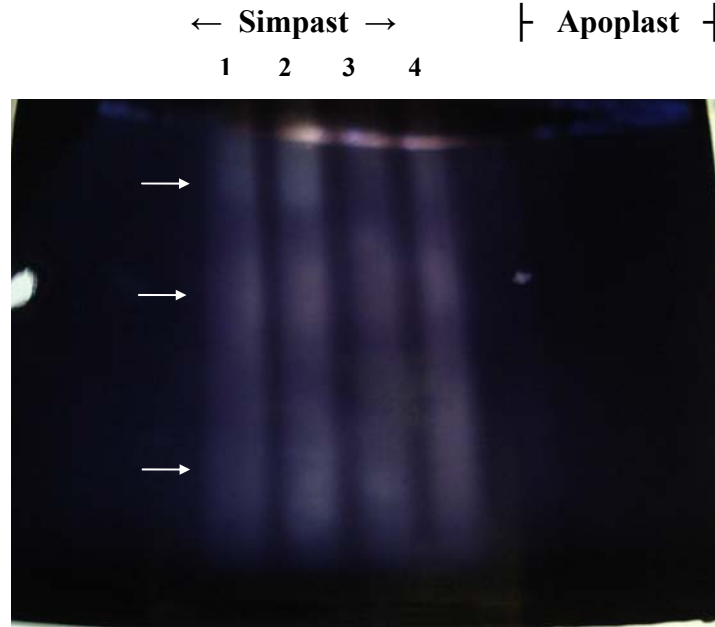
3.17. Kuraklığın Glutatyon Redüktaz (GR) İzoenzimleri Üzerine Etkisi



Şekil 22. *C. setosa*'nın yaprak simplast ve apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin GR izoenzimleri üzerine etkisi (Simplast-1: Kontrol, 2: % 26, 3: % 54, 4: % 74; Apoplast-5: Kontrol, 6: % 26, 7: % 54, 8: % 74 kıvrılma derecesi).

GR izoenzimleri ile ilgili yapılan elektroforez çalışmaları sonucuna göre simplastik alanda kıvrılma derecesinin artışına bağlı olarak izoenzim bantlarının sayısında herhangi bir değişimin olmadığı sadece bantların koyuluklarında farklılık olduğu görüldü. Spektrofotometrik ölçümler sonucu GR'nin çok düşük aktivite göstermesinden dolayı yaprak apoplastında GR izoenzimi belirlenemedi (Şekil 22).

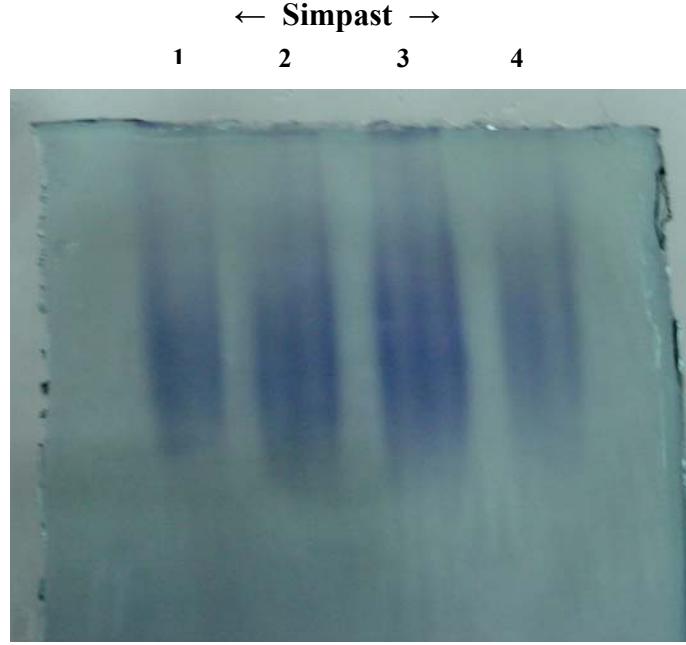
3.18. Kuraklık Stresinin Askorbat Peroksidaz (APX) İzoenzimleri Üzerine Etkisi



Şekil 23. *C. setosa*'nın yaprak simplast ve apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin APX izoenzimleri üzerine etkisi (Simplast-1: Kontrol, 2: % 26, 3: % 54, 4: % 74; Apoplast-5: Kontrol, 6: % 26, 7: % 54, 8: % 74 kıvrılma derecesi).

APX izoenzimleri ile ilgili yapılan jel elektroforezi çalışmaları sonucuna göre simplastik alanda kıvrılma derecesinin artışına bağlı olarak 3 izoenzim bandının olduğu fakat kıvrılma derecesi boyunca bantların sayısında herhangi bir değişimin olmadığı, sadece bantların yoğunluklarında farklılık olduğu görüldü. Spektrofotometrik ölçümler sonucu APX'nin çok düşük aktivite göstermesinden dolayı yaprak apoplastında APX izoenzimi belirlenemedi (Şekil 23).

3.19. Kuraklık Stresinin Monodehidroaskorbat Peroksidaz (MDHAR) İzoenzimleri Üzerine Etkisi



Şekil 24. *C. setosa*'nın yaprak simplast alanındaki kıvrılma derecesinin MDHAR izoenzimleri üzerine etkisi (Simplast-1: Kontrol, 2: % 26, 3: % 54, 4: % 74 kıvrılma derecesi)

MDHAR izoenzimleri ile ilgili yapılan jel elektroforezi çalışmaları sonucuna göre simplastik alanda kıvrılma derecesinin artışına bağlı olarak farklı bir izoenzim bandının olmadığı sadece bantların yoğunluklarında farklılıklar olduğu görüldü. Spektrofotometrik ölçümler sonucu MDHAR aktivitesinin apoplastta yer almadığı belirlendi (Şekil 24).

3.20. Kuraklık Stresinin Polifenol Oksidaz (PPO) İzoenzimleri Üzerine Etkisi

←Simplast→ ← Apoplast →
 1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 25. *C.setosa*'nın yaprak simplast ve apoplastik alanlarında kıvrılma derecesinin PPO izoenzimleri üzerine etkisi (Simplast-1: Kontrol, 2: % 26, 3: % 54, 4: % 74; Apoplast-5: Kontrol, 6: % 26, 7: % 54, 8: % 74 kıvrılma derecesi).

PPO izoenzimleri ile ilgili yapılan jel elektroforezi çalışmaları sonucuna göre simplastik alanda kıvrılma derecesinin artışına bağlı olarak farklı bir izoenzim bandının olmadığı sadece bantların yoğunluklarında farklılıklar olduğu saptandı. Spektrofotometrik ölçümlerde belirlenen aktiviteyle paralel olarak kontrole göre % 74 kıvrılma derecesinde bantların daha az yoğun olduğu görüldü. Apoplastta ise PPO aktivitesi simplasttaki aktiviteye göre çok daha düşük olduğundan sadece varlığı belirlendi (Şekil 25).

3.21. Kuraklık Stresinin İndirgenmiş Glutatyon (GSH) İçeriği Üzerine Etkisi

Kuraklık stresine maruz bırakılan *C. setosa* bitkisinin yaprak ve petiyollerinde yapılan analizler sonucunda glutatyon içeriğinin (GSH+GSSG) yaprak ve petiyol simplastik alanında var olduğu, her iki bitkisel yapının apoplastik alanlarında bulunmadığı saptandı. Simplastik alanda yapraktaki glutatyon içeriğinin petiyoldekinden daha yüksek olduğu belirlendi. Simplastik GSH içeriği kuraklık periyodu arttıkça arttı. GSH içeriği yaprakta %

26, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde % 99, % 195 ve % 54 oranında arttı. Petiyolde ise % 26 kıvrılma derecesinde % 20 oranında azalırken, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde % 46 ve % 48 oranında arttığı kaydedildi. Kuraklık, yaprak simplastik alanında okside glutasyon (GSSG) içeriğinde önemli bir azalışa neden oldu. Buna karşılık GSSG petiyolde kuraklığın başlangıcında (% 26 kıvrılma derecesinde) artarken, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde değişmedi (Tablo 5).

Kuraklık periyodunun artmasıyla GSH/GSSG oranı her iki bitkisel yapının simplastik alanında arttığı bulundu. Kontrol bitkilerinde yaprakta GSH/GSSG oranı g taze ağırlık başına 2,12 nmol iken, % 26 kıvrılma derecesinde 6,58 nmol'e, % 54 kıvrılma derecesinde 10,30 nmol'e ve % 74 maksimum kıvrılma derecesinde ise 12 nmol'e kadar yükseldiği saptandı. Petiyolde ise kontrolde 3,6 nmol olan GSH/GSSG oranının, % 26 kıvrılma derecesinde 1.65 nmol'e düştüğü % 54 kıvrılma derecesinde 6.07 nmol'e ve % 74 kıvrılma derecesinde 6.66 nmol'e yükseldiği bulundu (Tablo 5).

Tablo 5. Kuraklık stresine maruz bırakılmış *C. setosa* bitkisinde yaprak ve petiyol simplastik alanlarındaki indirgenmiş glutasyon (GSH, nmol g⁻¹ taze ağırlık) ve okside glutasyon (GSSG, nmol g⁻¹ taze ağırlık) içeriğindeki değişimler

Yaprak Kıvrılma Derecesi(%)	Yaprak			Petiyol		
	GSH	GSSG	GSH/GSSG	GSH	GSSG	GSH/GSSG
0	185±12 a*	87±1,7 c	2,12	54±0,9 b	15±1,1 a	3,60
26	369±17 b	56±0,5 b	6,58	43±0,8 a	26±1,8 b	1,65
54	546±17 d	53±3,6 b	10,30	79±1,7 c	13±3,5 a	6,07
74	468±24 c	39±1,2 a	12,00	80±3,5 c	12±0,5 a	6,66

*Üç tekerrürlü ortalamanın standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir (P≤0,05), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

3.22. Kuraklık Stresinin Askorbat (ASC) İçeriği Üzerine Etkisi

Kuraklık periyodu boyunca yaprak ve petiyolde yapılan analizler sonucunda askorbat (ASC) ve dehidroaskorbat (DHA) içeriklerinin *C. setosa* bitkisinin hem apoplastik hem de simplastik alanlarında var olduğu görüldü. Yaprak ve petiyolde apoplastik ASC içeriğinin kontrolle kıyaslandığında kıvrılma periyodu boyunca arttığı belirlendi ve bu artışların istatistiki olarak önemli olduğu (P≤0,05) kaydedildi. Apoplastik DHA içeriğinin yaprakta arttığı petiyolde ise azaldığı bulundu (Tablo 6).

Tablo 6. *C. setosa*'da yaprak kıvrılması boyunca yaprak ve petiyol apoplastik alanlarındaki askorbat (ASC, $\mu\text{g g}^{-1}$ taze ağırlık) ve dehidroaskorbat (DHA, $\mu\text{g g}^{-1}$ taze ağırlık) içeriğinde meydana gelen değişimler

Yaprak Kıvrılma Derecesi(%)	Apoplast Yaprak			Apoplast Petiyol		
	ASC	DHA	ASC/DHA	ASC	DHA	ASC/DHA
0	0,9±0,02 a*	2,8±0,07 a	0,32	0,4±0,01 a	1,80±0,03 c	0,22
26	1,5±0,02 d	7,4±0,04 c	0,20	0,6±0,02 c	1,21±0,10 a	0,49
54	1,4±0,02 c	6,8±0,08 b	0,20	0,5±0,04 b	1,60±0,03 b	0,31
74	1,2±0,08 b	6,9±0,10 b	0,17	0,7±0,10 c	1,30±0,02 a	0,53

*Üç tekerrürlü ortalamının standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

Simplastik ASC içeriğinin yaprakta % 26 ve % 54 kıvrılma derecelerinde artarken % 74 kıvrılma derecesinde azaldığı görüldü. Petiyolde ise kuraklığın başlangıcında (% 26 kıvrılma derecesinde) artan ASC içeriğinin % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde azaldığı belirlendi. Ayrıca simplastik DHA içeriğinin kontrolle kıyaslandığında kuraklık boyunca arttığı bulundu. Petiyolde ise % 26 kıvrılma derecesinde önemli bir değişimin olmadığı, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde ise DHA'nın azaldığı görüldü (Tablo 7).

Tablo 7. *C. setosa*'da yaprak kıvrılması boyunca yaprak ve petiyol simplastik alanlarındaki askorbat (ASC, $\mu\text{g g}^{-1}$ taze ağırlık) ve dehidroaskorbat (DHA, $\mu\text{g g}^{-1}$ taze ağırlık) içeriğinde meydana gelen değişimler

Yaprak Kıvrılma Derecesi(%)	Simplast Yaprak			Simplast Petiyol		
	ASC	DHA	ASC/DHA	ASC	DHA	ASC/DHA
0	51,1±0,8 b*	125,0±1,3 a	0,40	3,5±0,60 c	31±1,6 c	0,11
26	67,5±1,6 c	273,2±6,8 c	0,24	6,8±0,05 d	36±2,7 d	0,18
54	64,0±1,3 c	267,0±1,5 c	0,23	1,5±0,02 b	26±0,1 b	0,06
74	48,1±1,1 a	260,0±1,2 b	0,18	0,5±0,07 a	22±0,1 a	0,02

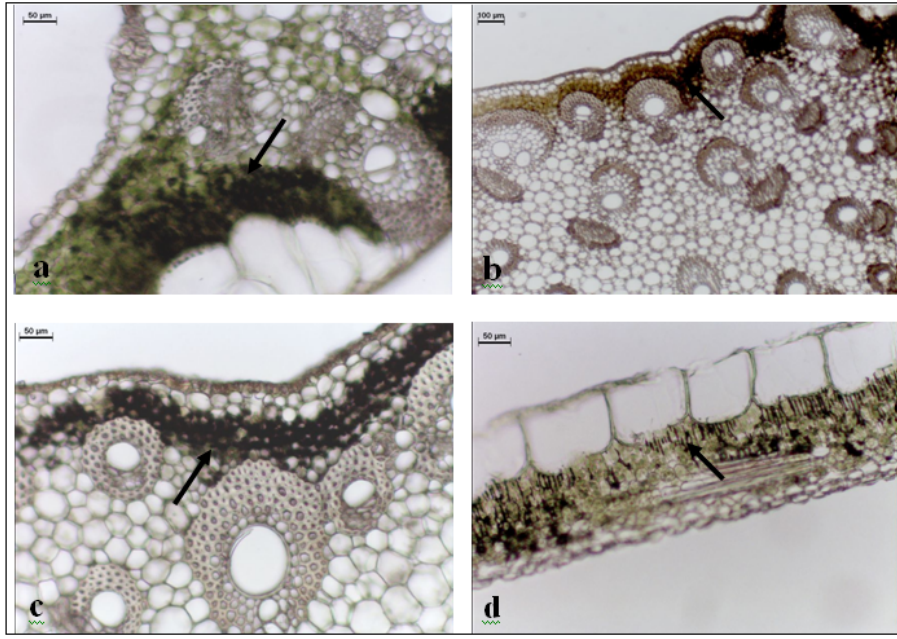
*Üç tekerrürlü ortalamının standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

ASC/DHA oranı stresin şiddetiyle yaprakta hem simplastik hem de apoplastik alanda azaldı. Örneğin, kontrol bitkilerinde yaprak apoplastik alanında g taze ağırlık başına 0,32 μmol olan ASC/DHA oranının, % 26 ve % 54 kıvrılma derecelerinde 0,20 μmol 'e, % 74 maksimum kıvrılma derecesinde ise 0,17 μmol 'e düştüğü bulundu. Yaprak simplastik

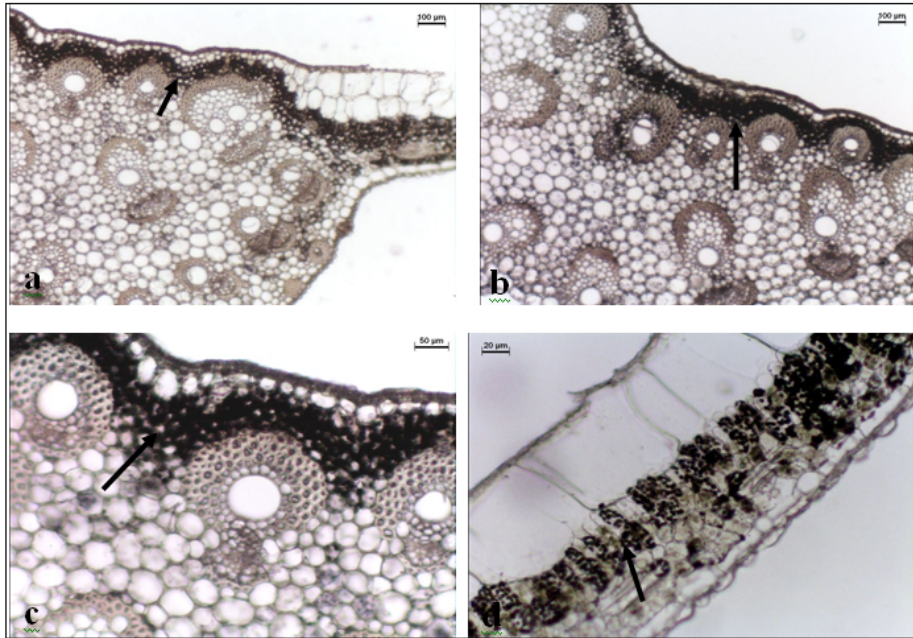
alanında ise bu oranın kontrol bitkilerinde 0,40 μmol iken, % 26, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde sırasıyla, 0,24, 0,23 ve 0,18 μmol 'e düştüğü belirlendi. Petiyolde, simplastik alanda ASC/DHA oranının kıvrılma periyodu boyunca azaldığı, apoplastta ise arttığı saptandı. Örneğin, apoplastta kontrol bitkilerinde g taze ağırlık başına 0,22 μmol olan bu oran % 26 kıvrılma derecesinde 0,50 μmol 'e yükseldi. % 54 kıvrılma derecesinde tekrar 0,31 μmol 'e düşerken % 74 kıvrılma derecesinde 0,53 μmol 'e yükseldi. Simplastta ise, kontrol bitkilerinde ASC/DHA oranının 0,11 μmol iken, % 26 kıvrılma derecesinde 0,18 μmol 'e yükseldiği, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde sırasıyla, 0,06 ve 0,02 μmol 'e düştüğü belirlendi.

3.23. Kuraklık Stresi Esnasında Reaktif Oksijen Türlerinin Dokusal Yerleşimi

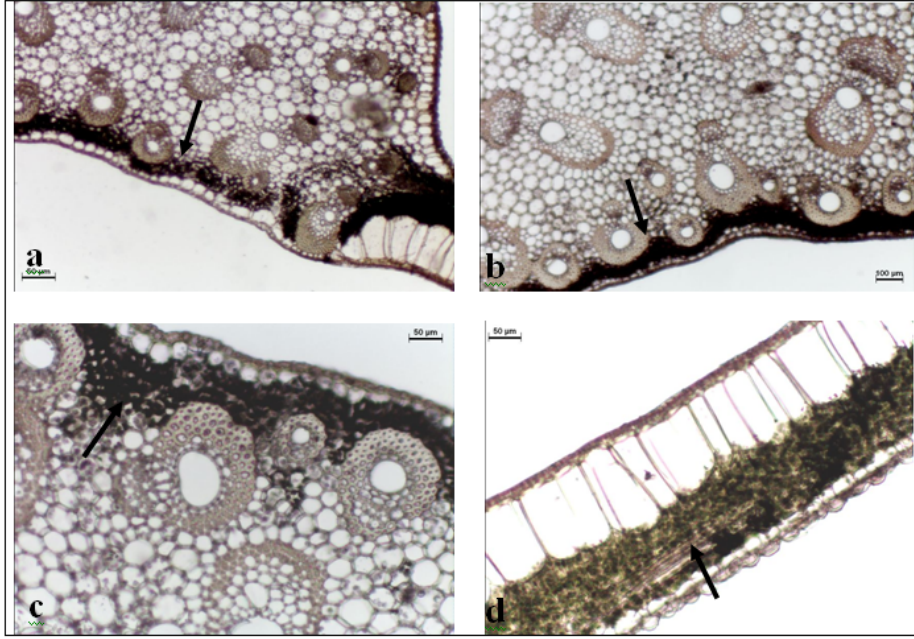
Süperoksit radikalinin dokusal yerleşimini belirlemek için yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca yapraktan alınan kesitler 120 dakika NBT ile inkübe edildikten sonra süperoksit tarafından NBT'nin indirgenmesi sonucu oluşan mavi formazonun çok az miktarda mezofil hücrelerinde ve yaprak orta damarının üst epidermisinin altındaki birkaç sıra halindeki hücrelerde biriktiği bulundu (Şekil 26). Kesitler CuZn-SOD inhibitörü olan DDC varlığında inkübe edildiğinde mezofil hücrelerinde formazonun daha yoğun şekilde oluştuğu belirlendi. Yaprak kıvrılma derecesi artıkça süperoksit üretiminin arttığı görüldü. Kontrolde ve % 26 kıvrılma derecelerinde sadece mezofil hücrelerinde ve üst epidermisin altındaki hücrelerde az miktarda olan mavi formazonun (Şekil 27, 28), % 54 ve özellikle % 74 yaprak kıvrılma derecelerinde çoğunlukla mezofil hücrelerinde daha az oranda da yaprak orta damarının korteksinde bulunduğu görüldü (Şekil 29, 30).



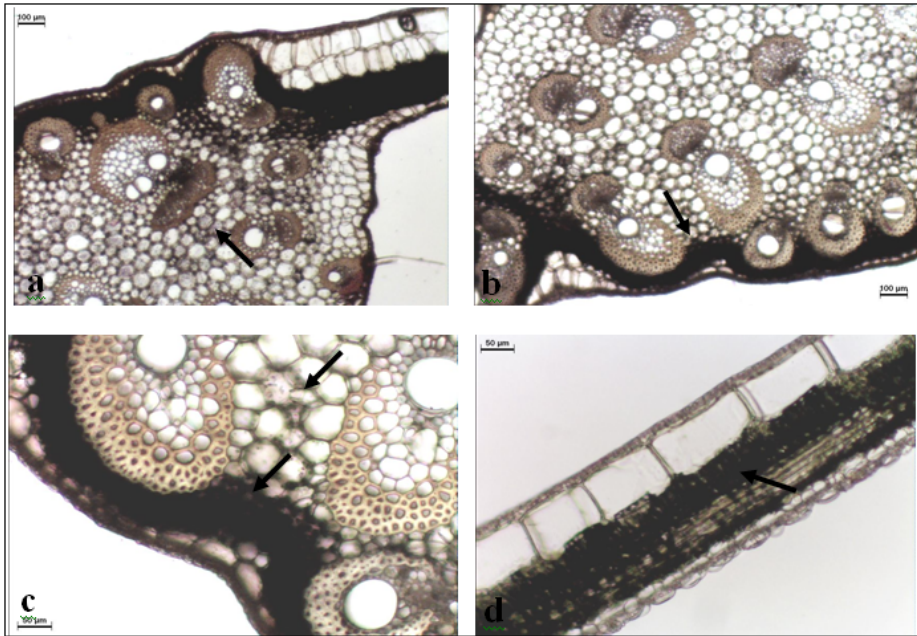
Şekil.26. *C. setosa*'da kuraklık stresi esnasında kontrol bitkilerinin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerde NBT indirgenmesi sonucu formazon oluşumu. (a,b,c; yaprak orta damarından enine kesit, d; yaprakta enine kesitte mezofil hücreleri).



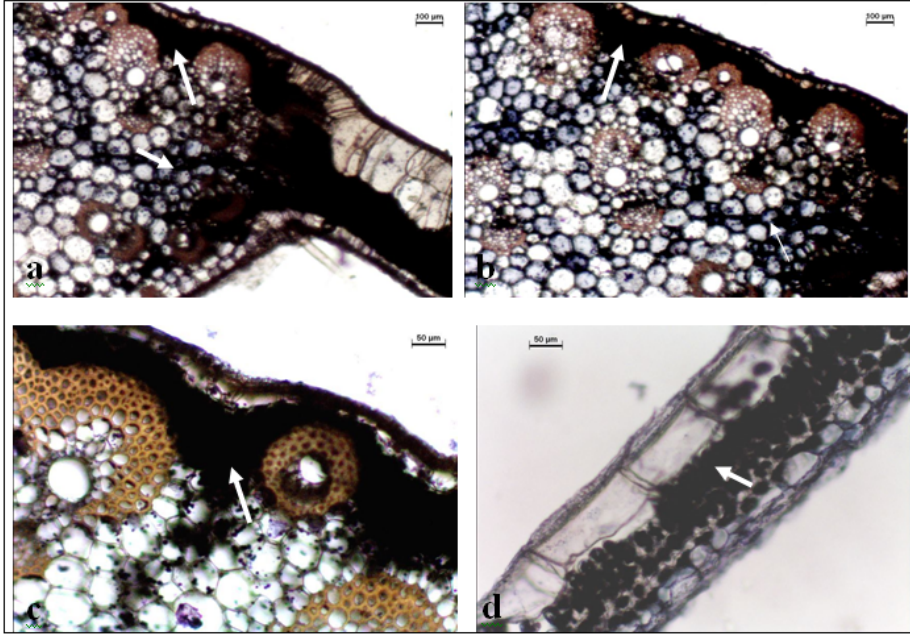
Şekil 27. *C. setosa*'da kuraklık stresi esnasında kontrol grubu bitkilerinin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerdeki formazon oluşumu üzerine inhibitörün (DDC) etkisi. (a,b,c; yaprak orta damarından enine kesit, d; yaprakta enine kesitte mezofil hücreleri).



Şekil. 28. *C. setosa*'da kuraklık stresi esnasında % 26 yaprak kıvrılma derecesine sahip bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerdeki formazon oluşumu üzerine inhibitörün (DDC) etkisi. (a,b,c; yaprak orta damarından enine kesit, d; yaprakta enine kesitte mezofil hücreleri).

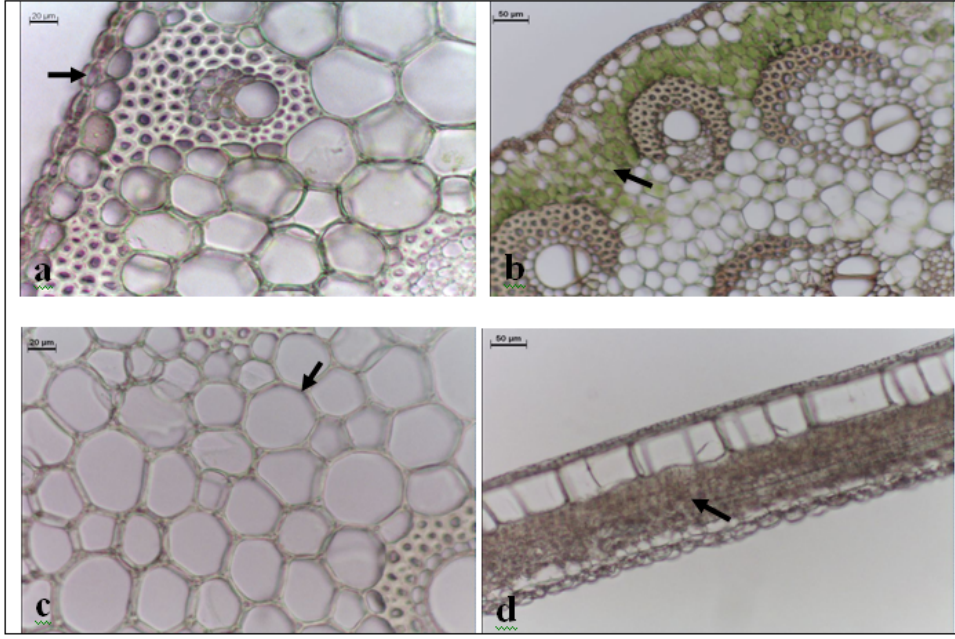


Şekil 29. *C. setosa*'da kuraklık stresi esnasında % 54 yaprak kıvrılma derecesine sahip bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerdeki formazon oluşumu üzerine inhibitörün (DDC) etkisi. (a,b,c; yaprak orta damarından enine kesit, d; yaprakta enine kesitte mezofil hücreleri).

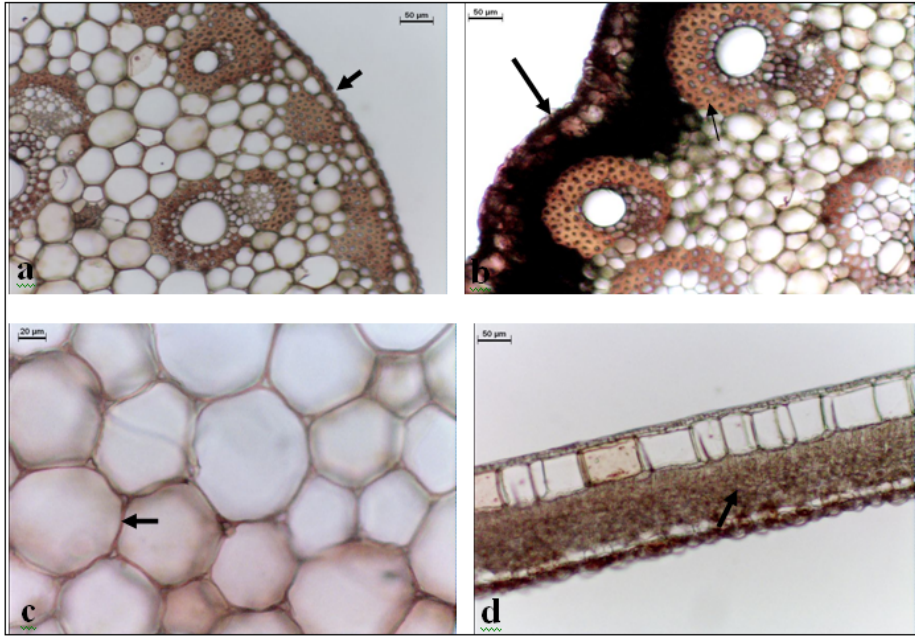


Şekil 30. *C. setosa*'da kuraklık stresi esnasında % 74 yaprak kıvrılma derecesine sahip bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerdeki formazon oluşumu üzerine inhibitörün (DDC) etkisi. (a,b,c; yaprak orta damarından enine kesit, d; yaprakta enine kesitte mezofil hücreleri).

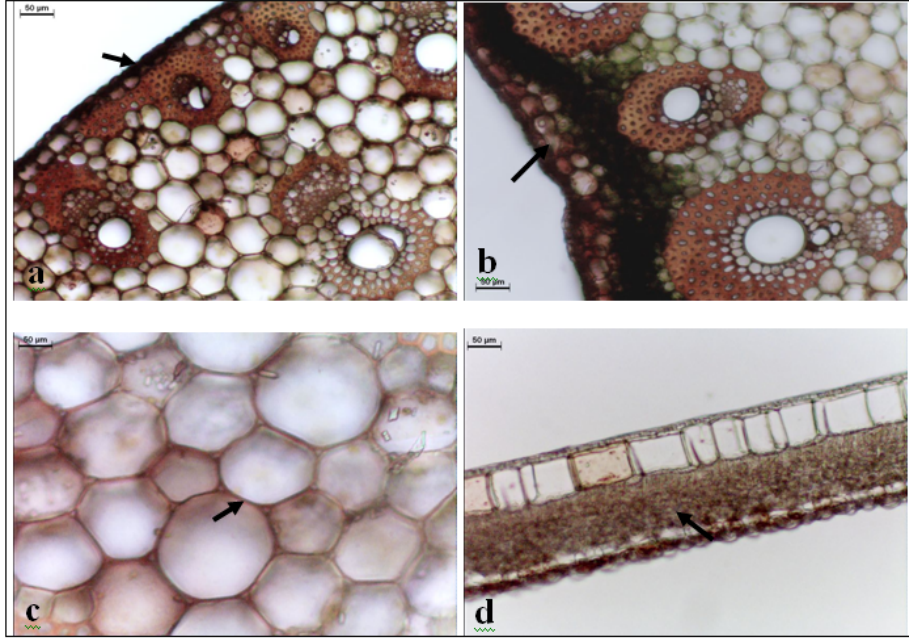
Hidrojen peroksitin dokusal yerleşimini belirlemek için yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca yaprak ve yaprak orta damarından alınan kesitler 24 saat karanlıkta 3,3'-diaminobenzidin (DAB) ile inkübe edildi. H_2O_2 'nin varlığı kırmızı-kahve karışımı rengin oluşumuyla anlaşıldı. H_2O_2 üretildiği alanların süperoksitin üretildiği alanlara benzer olduğu saptandı. H_2O_2 birikiminin mezofil hücrelerinin (palizat ve sünger parankiması) ve üst epidermal hücrelerinin çeperlerinde bulunduğu tespit edildi. Ayrıca yaprak orta damarının üst ve alt epidermal hücrelerinde ve parankima hücrelerinin çeperlerinde de H_2O_2 'nin biriktiği belirlendi. Kontrol, % 26 ve % 74 kıvrılma dereceleri arasında çok fazla değişimin olmadığı fakat % 54 kıvrılma derecesinde daha koyu rengin oluşumu ile H_2O_2 üretiminin arttığı gözlemlendi (Şekil 31). Diğer taraftan ASC ile muamele edilen kesitler DAB ile boyandığında ASC'nin H_2O_2 oluşumunu baskıladığı saptandı (Şekil 32, 33, 34, 35).



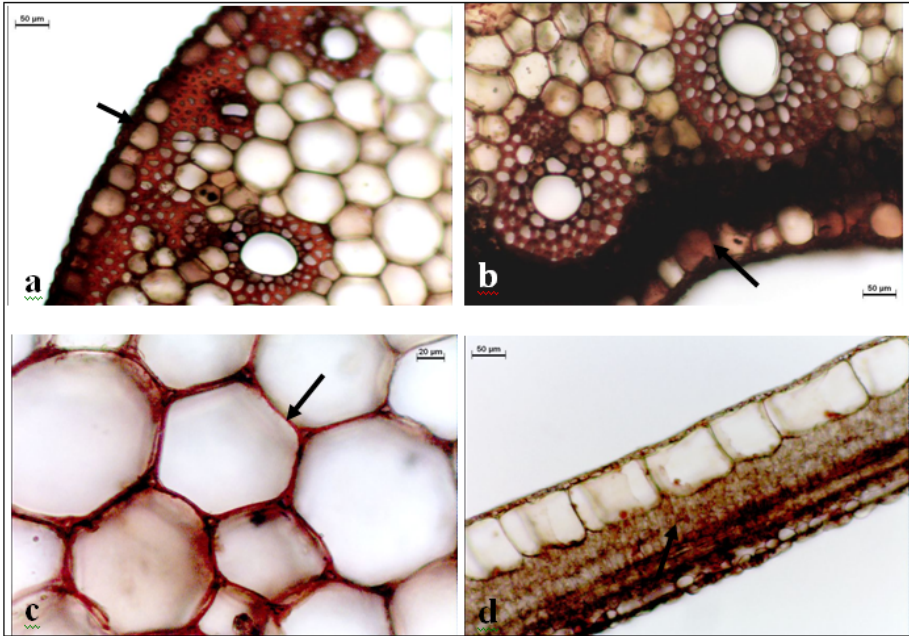
Şekil 31. *C. setosa*'da kuraklık stresi esnasında kontrol bitkilerinde 10 mM ASC varlığında DAB ile boyanan bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerde H_2O_2 birikimi. (a,b,c; yaprak orta damarından alınan enine kesit, d; yaprakta enine kesitte mezofil hücreleri).



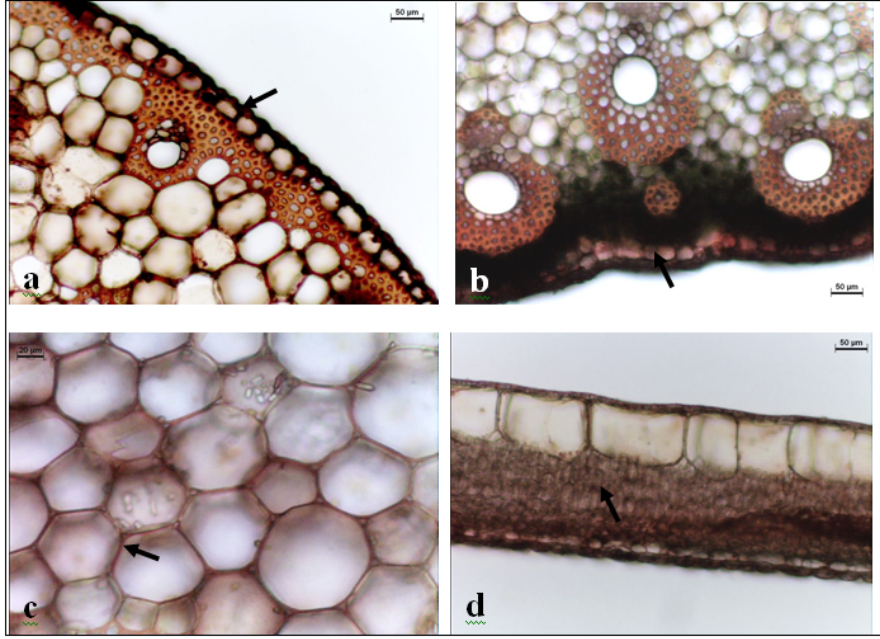
Şekil 32. *C. setosa*'da kuraklık stresi esnasında DAB varlığında kontrol grubu bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerde H_2O_2 birikimi. (a,b,c; yaprak orta damarından alınan enine kesit, d; yaprakta enine kesitte mezofil hücreleri).



Şekil 33. *C. setosa*'da kuraklık stresi esnasında DAB varlığında % 26 kıvrılma derecesine sahip bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerde H_2O_2 birikimi. (a,b,c; yaprak orta damarından enine kesit, d; yapraktan enine kesitte mezofil hücreleri).



Şekil 34. *C. setosa*'da kuraklık stresi esnasında DAB varlığında % 54 yaprak kıvrılmasına sahip bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerde H_2O_2 birikimi. (a,b,c; yaprak orta damarından enine kesit, d; yapraktan enine kesitte mezofil hücreleri).



Şekil 35. *C. setosa*'da kuraklık stresi esnasında DAB varlığında % 74 yaprak kıvrılmasına sahip bitkilerin yaprak ve yaprak orta damarından alınan enine kesitlerdeki H_2O_2 birikimi. (a,b,c; yaprak orta damarından enine kesit, d; yapraktan enine kesitte mezofil hücreleri).

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada *Ctenanthe setosa* bitkisinin yaprak ve petiyollerinde yapılan analizlerde bitkilerin kuraklık stresine dayanıklılık geliştirebilmesinde yaprak kıvrılma mekanizmasının yanı sıra bitkinin su durumuyla ilişkili olarak apoplastik ve simplastik alanlarda yer alan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların rolü araştırıldı. Ayrıca yaprak kıvrılmasıyla ilişkili olarak reaktif oksijen türleri yönünden dengenin nasıl değiştiği incelendi.

Bitkilerde stres koşullarında değişen ve bitkinin su durumunu gösteren parametrelerden biri nispi su içeriği (NSİ) olup, çalışmamızda öncelikle yaprak kıvrılma derecesinin artışı boyunca nispi su içeriğinde meydana gelen değişimler belirlenmiş ve böylece bitkinin strese maruz kalıp kalmadığı kalmışsa stresin derecesi tespit edilmiştir. Mevcut çalışmada *C. setosa*'da yaprak kıvrılma derecesinin artmasıyla nispi su içeriğinin azaldığı görülmüştür. 56 günlük kuraklık periyodu sonunda nispi su içeriğinin yaprakta % 95'ten % 78'e, petiyolde ise % 68'e düştüğü belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar stres esnasında bitkinin su durumunu gösteren çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Örneğin, mısır bitkisinde yapılan bir çalışmada kontrol bitkilerinin yapraklarındaki nispi su içeriği değişmezken kuraklığa maruz bırakılanlarda kuraklığın 3. gününden sonra azalmaya başladığı belirlenmiştir (Foyer vd., 1998). Yine yapılan bir çalışmada *Poa pratensis* (Poaceae) ve *Festuca arundinacea* bitkilerinde nispi su içeriğinin kuraklık periyodunun artmasıyla önemli derecede azaldığı rapor edilmiştir (Fu ve Huang, 2001). Benzer şekilde *Xerosicyos danguyi* (Cucurbitacea) bitkisinde nispi su içeriğinin % 92'den % 50'ye, *Olea europaea*'da ise % 84'ten % 74'e düştüğü kaydedilmiştir (Bastide vd., 1993; Giorio vd., 1999). Çalışmamızda *C. setosa* bitkisinde nispi su içeriğindeki düşüş kuraklık periyodunun 35. gününde başlamış olup, yukarıdaki değerlere kuraklığın 56. gününde ulaşılmıştır. *C. setosa*'nın ağır kuraklık stresi esnasında bile diğer bitkilerde orta seviyedeki su stresinde görülebilecek bir nispi su içeriğine sahip olması bu bitkinin yapraklarını kıvrarak kuraklığa dayanıklılık sağladığının bir göstergesidir.

Su stresinden etkilenen ve bitkinin su durumunu gösteren diğer bir parametrede yaprak su potansiyelidir (Ψ). Nispi su içeriği ve yaprak su potansiyelinin kuraklık stresi için iyi bir indikatör olduğu bilinmektedir (Shaw vd., 2002). Çalışmamızda yaprak su potansiyelinin

nispi su içeriğinde olduğu gibi kuraklık periyodu esnasında yaprak kıvrılma derecesi boyunca -0,15 MPa'dan -1,18 MPa'a düştüğü bulunmuştur. Benzer şekilde kuraklık stresi altındaki çeltik bitkisinin kültivarlarında yapılan bir çalışmada yaprak su potansiyelinin -0.5 MPa'dan -2 MPa'a düştüğü rapor edilmiştir (Sharma ve Dubey, 2005). Yine buğdayda yapılan bir çalışmada kuraklık stresinin yaprak su potansiyelini kontrol bitkilerinde -0.63 MPa'dan stres geçirmiş bitkilerde -2 MPa'a düşürdüğü kaydedilmiştir (Siddique vd., 2000). Pennypacker vd., (1990), üçgül bitkisinde kuraklığın bir sonucu olarak yaprak su potansiyelinde benzer bir azalışın olduğunu rapor etmişlerdir. Yaprak su potansiyelindeki değişiklikler bitkinin osmotik potansiyelinde değişimlere neden olabilir (Siddique vd., 2000). Daha önce *C. setosa* ile yapılan çalışmalardan bilindiği üzere, bu bitki yapraklarını kıvrırmak suretiyle su kaybını ve transpirasyonu en aza indirgeyen bir mekanizmaya sahip olduğu ifade edilmiştir (Kadıoğlu ve Terzi, 2007). Bitkilerde yaprak su potansiyeli ölçülerek stresin şiddeti belirlenebilir (Lawlor, 1983). Buna göre yaprak su potansiyeli ölçülerek elde edilen veriler 56 günlük kuraklık periyoduna maruz kalan *C. setosa*'da % 74 maksimum kıvrılma derecesinde bile orta şiddetli bir stresin (-1 ile -2 MPa) oluştuğunu göstermektedir. Ayrıca diğer bitki türleri ile karşılaştırıldığında kuraklık periyodu esnasında *C. setosa*'daki nispi su içeriğinin ve yaprak su potansiyelindeki düşüşün çok fazla olmaması bu bitkinin yapraklarını kıvrırmak suretiyle su kaybını azaltarak uzun bir süre kuraklığa dayanıklılık göstermesinin bir sonucudur. Diğer taraftan kıvrılma ile yaprak su potansiyeli ($r = -0.90$, $P < 0.05$) ve nispi su içeriği ($r = -0.99$, $P < 0.01$) arasında negatif bir korelasyonun olduğu bulunmuştur. Kuraklık periyodu esnasında nispi su içeriği ve yaprak su potansiyelinde fazlaca farklılığın olmaması bitkinin strese karşı bir adaptasyon cevabıyla ilişkilidir.

Su stresinden etkilenen ve bitkinin su durumunu gösteren parametrelerden bir diğeri ise stoma iletkenliği (g_s) olup kuraklık stresi için iyi bir indikatördür. Çalışmamızda kuraklık periyodu esnasında kıvrılma boyunca stoma iletkenliğinin azaldığı tespit edilmiştir. Örneğin, stres geçirmemiş (yapraklarını kıvrırmamış) *C. setosa* bitkisi çok düşük stoma iletkenliğine sahipken stres geçirmiş (yapraklarını kıvrırmış) yapraklarda stres geçirmemiş olanlara kıyasla yaklaşık olarak 2 katlık bir azalışın olduğu görülmüştür. Ayrıca yaprağın kıvrılmış bölümünün iç kısmının stoma iletkenliğinin kıvrılmış bölümünün açık kısmından daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar yaprak kıvrılmasının yaprağın iç kısmında nemli bir alan oluşturarak (Matthews vd., 1990) stomaların CO₂ alabilmesini ve böylece fotosentezin devam etmesine katkı sağlayabileceğini göstermektedir. Ayrıca stoma

iletkenliğindeki değişiklikler transpirasyon oranında meydana gelen değişimlerle yaprak su potansiyelinin değişmesine neden olur (Schulze vd., 1987). Bu sonuçlara göre stomaların, kıvrılma derecesinin artmasına paralel olarak kuraklık arttıkça aşamalı olarak kapandığı açıktır. Mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar literatürdeki kuraklık stresi esnasında stoma iletkenliği üzerine yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Örneğin, mısır bitkisinde su stresinin artmasıyla stoma iletkenliğinin, yaprak su potansiyelinin ve osmotik potansiyelin azaldığı ve stoma iletkenliği ile yaprak su potansiyeli ve osmotik potansiyel arasında pozitif bir korelasyonunun olduğu rapor edilmiştir (Premachandra vd., 1992). Benzer şekilde kuraklığın *Olea europaea*'da stoma iletkenliğini 0,190'dan 0,023 mol m⁻²s⁻¹'e, yaprak su potansiyelini -1,5'ten -3,4 MPa'a düşürdüğü ve stoma iletkenliği ile yaprak su potansiyeli arasında pozitif bir ilişkinin olduğu kaydedilmiştir (Giorio vd., 1999).

Çalışmamızda apoplastik ekstraktın kontaminasyon derecesini belirlemek için G-6-PDH aktivitesi ölçülmüş ve tüm yaprak kıvrılma derecelerinde aktivitenin 0'a yakın bir değerde olduğu görülmüştür (yaprakta % 74 kıvrılma derecesinde % 0,086; petiyolde % 0,47). Bu sonuç mevcut çalışmada apoplastın çok saf bir yüzde elde edildiğini göstermektedir. Literatürde apoplastik sıvıdaki söz konusu enzim aktivitesinin % 1'den fazla olmaması gerektiği belirtilmiştir (Dietz, 1997). Örneğin *Plantago major* (Lyons vd., 1999), *Prunus armeniaca* (Diaz-Vivancos vd., 2006), *Cucurbita pepo* (Ranieri vd., 1996) ve *Hordeum vulgare* (Padu vd., 1999) yapraklarının apoplastlarındaki G-6-PDH aktivitesinin belirlenen sınırın altında olduğu (% 0,3) rapor edilmiştir.

Strese maruz kalma aşırı reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur. ROS'lar genellikle normal hücrel aktivite tarafından üretilirler ve normal şartlarda hücrelerde düşük seviyede bulunurlar fakat biyotik veya abiyotik stres şartlarına maruz kaldıklarında seviyeleri artar. ROS'ların birikimi hücrelerin zarar görmesine neden olur (Mittler, 2002). ROS'ların sitotoksik etkilerinden hücre ve hücre alt yapılarını korumada ve bitkinin çevresel streslere dayanıklılığında antioksidan enzimlerdeki değişimlerin etkili olduğu bilinmektedir. Bitkinin strese dayanıklılığı ROS üretimi ve hücrenin antioksidan yeteneğiyle denge halindedir (Pastori ve Trippi, 1993). ROS'ların mitokondri, kloroplastlar ve peroksizomlar dışında bitkilerin apoplastik alanlarında da üretildiği bilinmektedir (Elstner, 1991; Alschler vd., 2002). Bu nedenle *C. setosa*'da artan yaprak kıvrılma derecesine bağlı olarak reaktif oksijen türleri yönünden dengenin nasıl değiştiğini belirlemek için bitkinin apoplastik ve simplastik alanlarında meydana gelen değişimler araştırılmıştır. Yapılan analizlerde yaprak ve petiyol apoplastik ve simplastik alanlarında

H_2O_2 içeriğinin % 54 kıvrılma derecesine kadar arttığı daha sonra azaldığı bulunmuştur. Hidrojen peroksit hücre çeperinde lignin oluşumu ya da kloroplastlarda fotorespirasyon olayı gibi farklı metabolik olaylar esnasında üretilir (Henzler ve Steudle, 2000). Diğer taraftan araştırmamızda süperoksit içeriğinin kıvrılma boyunca yaprak ve petiyolün simplastik alanında sırasıyla 2,1 ve 1,3 katlık artış gösterdiği tespit edilmiştir. Apoplasttaki süperoksit artışının simplasttakinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Apoplastik alanda artan süperoksitin dismutasyonla H_2O_2 'ye dönüşebileceği ve böylece hücre çeperinde lignifikasyonuna neden olabileceği rapor edilmiştir (Ogawa vd., 1997). Süperoksit, Fe-S merkezleri, indirgenmiş tiyoredoksin ve ferrodoksin gibi fotosistem I (PS I)'deki bir grup enzimi içeren elektron transport zincirinde üretilir. Bu elektron transport bileşenleri kendiliğinden okside olabilirler ve NADP'nin sınırlandığı durumda süperoksit üretebilirler (Dat vd., 2000; Foyer ve Noctor, 2000). Mevcut çalışmada ayrıca plazma membranına bağlı ve süperoksit radikali üreten bir enzim olan NAD(P)H oksidaz aktivitesindeki değişimler de araştırılmıştır. NAD(P)H oksidaz aktivitesinin kıvrılma boyunca yaprakta arttığı buna karşılık petiyolde değişmediği bulunmuştur. Yapraktaki enzim aktivitesindeki artış, apoplastik ve simplastik alanlardaki süperoksit üretiminin artmasıyla ilişkilidir. Bilindiği üzere NAD(P)H oksidaz enzimi aracılığıyla üretilen süperoksit radikalleri, süperoksit dismutaz enzimi aracılığıyla H_2O_2 'ye dönüştürülür. Böylece NAD(P)H oksidaz enzimi hücreler arası boşlukta H_2O_2 artışına ve dolaylı olarak hücre çeperinde lignifikasyona katkı sağlar. Diğer taraftan NAD(P)H oksidazın apoplastta süperoksit üretimini sağlayarak bu hücrel alt yapının alkalizasyonuna neden olduğu düşünülmektedir (Vanacker vd., 1998b). Ayrıca petiyolde enzim aktivitesinde bir değişimin olmaması, süperoksitin ksantin oksidaz gibi diğer enzimler veya diğer yollarla üretilebileceğini düşündürmektedir.

Reaktif oksijen türlerinin dokusal yerleşimini belirlemek için yapılan histokimyasal analizler sonucunda süperoksit tarafından NBT'nin indirgenmesi sonucu oluşan formazonun mezofil hücrelerinde ve yaprak orta damarının üst epidermisinin altında dizili olan birkaç sıra hücrede biriktiği belirlenmiştir. Spektrofotometrik olarak ölçülen reaktif oksijen türlerinin aktivitelerindeki artışların histokimyasal olarak belirlenen sonuçlarla paralellik gösterdiği saptanmıştır. Kıvrılma derecesi arttıkça özellikle % 74 maksimum kıvrılma derecesinde süperoksitin yoğun bir şekilde biriktiği bulunmuştur. Sonuçlarımıza benzer şekilde CuZn-SOD, DDC tarafından inhibe edildiğinde ıspanak hipokotillerindeki vaskular dokularda süperoksit anyonlarının oluştuğu rapor edilmiştir (Asada vd., 1975).

CuZn-SOD inhibitörü olan DDC varlığında NBT indirgenmesinin artması CuZn-SOD bloklandığında süperoksit tarafından formazon oluşumuna neden olan süperoksit anyonlarının konsantrasyonundaki artıştan kaynaklanabileceği rapor edilmiştir (Ogawa vd., 1997). Diğer taraftan mevcut çalışmada yapraktan alınan kesitler DAB ile muamele edildiğinde hidrojen peroksit birikimini gösteren kırmızı-kahverengi kompleksin mezofil hücrelerinde ve yaprak orta damarın epidermal hücre çeperinde ayrıca kortekste biriktiği bulunmuştur. Ayrıca DAB tarafından hidrojen peroksitin üretiminin ASC tarafından baskılandığı belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara benzer şekilde tuz stresine maruz bırakılan iki bezelye kütivarı DAB ile muamele edildikten sonra hidrojen peroksitin yaprağın küçük damarları boyunca nüfuz ettiği ve mezofil hücrelerinin hücre duvarlarında biriktiği rapor edilmiştir. Ayrıca kesitler ASC ile muamele edildiğinde hidrojen peroksit üretiminin baskılandığı kaydedilmiştir (Hernandez vd., 2001). Hidrojen peroksitin inaktive olması boyanan yerlerin ASC'ye duyarlı olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuçlar dokularda biriken hidrojen peroksitin yapraktaki NAD(P)H oksidaz tarafından üretilen süperoksit radikallerinden kaynaklandığına işaret etmektedir. Diğer bir deyişle DAB varlığında H₂O₂'nin birikimi yapraklarda NAD(P)H oksidazın aktivasyonunun bir sonucudur.

Bitkileri oksidatif hasardan korumak için apoplastik ve simplastik reaktif oksijen türlerinin (ROS) bitkinin apoplastik ve simplastik alanlarında yer alan antioksidan sistem tarafından kontrol altında tutulması gerekir (Ros Barcelo vd., 1987). Buradan anlaşılacağı üzere apoplastik alan yaprak kıvrılma periyodu esnasında önemli bir antioksidan sisteme sahiptir.

Çalışmamızda *C. setosa*'nın apoplastik alanında SOD, GPX, APX, CAT, GR, PPO enzim aktiviteleri ile ASC ve DHA'nın var olduğu fakat DHAR ve MDHAR enzim aktiviteleri ile GSH ve GSSG'nin bulunmadığı tespit edilmiştir. *C. setosa*'nın simplastik alanındaki tüm antioksidan enzim aktivitelerinin yaprak ve petiyol apoplastik alanındakinden çok daha yüksek olduğu bulunmuştur. Yaprak ve petiyolde yapılan analizler sonucunda apoplastik ve simplastik alanlarda GPX aktivitesinin en yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca simplast ve apoplasttaki APX ve CAT aktivitelerinin GPX aktivitesinden sonra en yüksek ikinci ve üçüncü enzim oldukları kaydedilmiştir. Bu nedenle araştırmamızda bu enzim aktivitelerindeki artışın her iki bitkisel yapının apoplast ve simplastında biriken H₂O₂ radikalini temizlemek için esas enzimler (aktif enzimler) olduğunu söyleyebiliriz. Bu sonuçlar literatürdeki diğer çalışmalarla da uygunluk

içerisindedir. Diaz-Vivancos vd., (2006) *Prunus persica* ve *Prunus armeniaca* yaprak apoplastındaki GPX ve APX aktivitelerinin H₂O₂ radikalini temizlemek için arttığını rapor etmişlerdir.

Mevcut çalışmada yaprak ve petiyol apoplastik ve simplastik alanlarında araştırılan antioksidan enzimlerden biri peroksidaz (POD)'lardır. Yaprak apoplastındaki POD'ların (GPX ve APX) kuraklık periyodu esnasında yaprak kıvrılması boyunca kontrolle kıyaslandığında önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Apoplastik alandaki POD aktivitesinin daha önce belirlenen toplam POD aktivitesiyle benzer olduğu saptanmıştır. Terzi ve Kadioğlu (2006), *C. setosa*'da yaptıkları çalışmada yaprak ve petiyolde kuraklık boyunca toplam POD aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir. Ayrıca elde edilen bulgular literatürdeki diğer çalışmalarla da uygunluk içerisindedir. Örneğin, *Cichorium intybus* bitkisinde apoplastik POD aktivitesinin ışıktan uyarılırken karanlıkta düştüğü kaydedilmiştir (Boeuf vd., 1999; Boeuf vd., 2001). Yine yapılan bir çalışmada *Fusarium culmorum* patojeni ile muamele edilen yulaf, arpa (Bishop, 2002) ve domates (Patykowski ve Urbanek, 2003) yapraklarındaki apoplastik POD aktivitesinin yüksek olduğu rapor edilmiştir. Mısır bitkisinde ise giberellik asitle muamele edilmiş yaprakların apoplastlarındaki POD aktivitesinin kontrolle kıyaslandığında daha yüksek olduğu bulunmuştur (Souza vd., 2001). Bu konuda yapılan çalışmalarda apoplastik alandaki POD'ların birçok çevresel strese karşı bitkileri korumada savunma mekanizmasının ilk basamağını oluşturduğu rapor edilmiştir (Klotz vd., 1998). Bu yüzden POD'ların oksidatif stres esnasında H₂O₂'nin zararlı etkilerine karşı hücreleri koruduğu düşünülür (Bolwell vd., 1999). Benzer şekilde mevcut çalışmada apoplastik POD aktivitesindeki artışın kıvrılma periyodu boyunca bitkinin kuraklık stresine tolerans kazanmasına katkı sağlayabileceği düşünülebilir. Ayrıca POD'ların sadece oksidatif strese karşı savunmada etkili olmadıkları (Zheng ve Van Huystee, 1992) aynı zamanda hücre çeperi lignifikasyonunda ve oksidatif çapraz bağlanmada önemli bir role sahip oldukları düşünülmektedir (Takahama ve Oniki, 1992; Lee vd., 2007). Çalışmamızda apoplastın dışında, her iki bitkisel yapının simplastik alanında da antioksidan enzimler arasında en fazla değişimi GPX aktivitesinin gösterdiği bulunmuştur. Diğer taraftan yaprakta APX aktivitesinin değişmediği, petiyolde ise arttığı tespit edilmiştir. Petiyolde aktivitedeki bu artışın yapraktaki H₂O₂ seviyesi ile kıyaslandığında petiyol simplastındaki H₂O₂ seviyesinin önemli ölçüde artmasından kaynaklandığı düşünülür. Yapraktaki H₂O₂, CAT ve GPX aktivitelerinin artması ile de temizlenebilir. Elde edilen sonuçlara göre POD enzimlerinin yaprak kıvrılması esnasında

hem apoplastik hem de simplastik alanda H_2O_2 'yi temizlemede önemli bir role sahip olduğu söylenebilir. Mevcut çalışmada yaprak ve petiyolün her iki alanında da H_2O_2 seviyesinin % 74 yaprak kıvrılma derecesinde azaldığı bulundu. H_2O_2 seviyesindeki bu azalış POD ve CAT enzimlerindeki artıştan kaynaklanıyor olabilir. Artan enzim aktivitelerinden dolayı bu enzimlerin hücre çeperi lignifikasyonunda ve oksidatif çapraz bağlanmada (Takahama ve Oniki, 1992) rol oynayabileceği ve olumsuz şartlara adaptasyon sağlayabileceği (Ranieri vd., 2001) düşünülebilir. Nitekim, *C. setosa*'nın yaprak kıvrılması esnasında bazı fenolik asitlerin arttığı ve bu artışların hücre çeperi lignifikasyonu ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Ayaz vd., 2000).

Çalışmamızda yaprak ve petiyolün apoplastik ve simplastik alanında yer alan antioksidan enzimlerden biri de SOD enzimidir. Yaptığımız analizler sonucunda yaprak kıvrılması arttıkça simplastik SOD aktivitesinin istatistiki açıdan önemli derecede değişmediği görülmüştür. Benzer şekilde, daha önce *C. setosa*'nın yaprak ve petiyolünde yapılan çalışmalarda kuraklık boyunca toplam SOD aktivitesinin de çok fazla değişmediği rapor edilmiştir (Terzi ve Kadioğlu, 2006). Simplastik SOD aktivitesinde önemli bir değişimin olmaması bu bitkide SOD aracılığıyla süperoksitin dismutasyonu yerine, simplastta üretilen süperoksitin ekstrasellular alana taşınması ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan araştırmamızda apoplastik alanda süperoksit seviyesinin artmış olması bu düşüncemizi destekler niteliktedir. Bitkilerde süperoksit radikalinin hidroponik bir çevreye sahip olan membranın reaktif iç kısmında (Bhattacharjee, 2005) ve membrana geçirgen hidroperoksil formda bulunduğu (Sagi ve Fluhr, 2006) bilinmektedir. Mevcut çalışmada SOD'un yaprak ve petiyol apoplastına yerleşik olduğu sonucuna varılmıştır ve benzer veriler bazı bitkilerde de kaydedilmiştir (Castillo vd., 1987; Lyons vd., 2001). *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol apoplastına yerleşik olduğu bulunmuştur. SOD aktivitesi, artan süperoksit üretiminden dolayı hidroksil radikalinin oluşum riskini azaltarak etkili olabilir. Çalışmamızda yapılan analizler sonucunda yaprak ve petiyolde apoplastik SOD aktivitesinin kuraklığın başlangıcında önemli derecede değişmediği fakat % 74 yaprak kıvrılma derecesinde SOD aktivitesinde artış olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar kıvrılma boyunca oksidatif stres esnasında H_2O_2 'nin sentezini katalizlemek için apoplastik SOD'un simplastik SOD'dan çok daha etkili olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan son yıllarda Karlsson vd., (2005) ikincil hücre çeperinin gelişmesi için gerekli olan H_2O_2 'nin düzenlenmesinde apoplastik SOD'un önemli bir rolü olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca apoplastik SOD'un hücre çeperi lignifikasyonu ile da ilişkili olduğu kaydedilmiştir (Ogawa

vd., 1997). Sonuç olarak *C. setosa*'da apoplastik SOD aktivitesinin artması bu bitkinin hücre çeperi lignifikasyonu ile açıklanabilir.

Mevcut çalışmada bir diğer antioksidan enzim olan katalaz aktivitesindeki değişimler her iki bitkisel yapının apoplastik ve simplastik alanlarında araştırılmıştır. CAT'ın bitki dokularında H₂O₂'in temizlenmesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Ogawa vd., 1997). Bu enzim oldukça yüksek katalitik özelliğe sahip olup substratına affinitesi zayıftır. Yapılan çalışmalarda CAT'ın bir çok bitkinin apoplastik alanında yerleşik olduğu bulunmuştur (Edwards vd., 1990; Vanacker vd., 1998a; Patykowski ve Urbanek, 2003). Çalışmamızda yaptığımız analizler simplastik CAT aktivitesinin hem yaprak hem de petiyolde arttığını göstermiştir. Diğer taraftan yaprak kıvrılması esnasında yaprakta apoplastik CAT aktivitesinin arttığı fakat petiyolde önemli derecede değişmediği bulunmuştur. Yaprak apoplastik CAT aktivitesindeki bu artış literatürdeki bazı çalışmalarla uygunluk içerisindedir. Örneğin, kışlık arpa yapraklarında yapılan bir çalışmada apoplastik CAT aktivitesinin önemli derecede arttığı bulunmuştur (Baet vd., 2000). Bir diğer çalışmada *Blumeria graminis* patojeni ile muamele edilen yulaf ve domates (Vanacker vd., 1998a) yapraklarındaki apoplastik CAT aktivitesinin arttığı kaydedilmiştir. Vanacker vd. (1998b), fungal bir patojenle muamele edilen arpa apoplastında CAT aktivitesinin infeksiyondan sonra duyarlı kültürlerde 20 katlık bir artışın olduğunu rapor etmişlerdir. Mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar CAT aktivitesinin ekstrasellular alanda H₂O₂'nin kontrol edilmesiyle ilişkili olabileceği düşüncesini (Patykowski ve Urbanek, 2003) destekler niteliktedir.

Stres koşullarından etkilenen enzimlerden biri de polifenol oksidaz enzimidir. PPO'lar biyotik ve abiyotik streslerin etkisiyle teşvik edilirler ve patojen atakları, su stresi gibi birçok fizyolojik olayda rol oynarlar (Thipyapong vd., 2007). Mevcut çalışmada kuraklık periyodu esnasında yaprak ve petiyol apoplastik ve simplastik alanlarında PPO aktivitesinde meydana gelen değişimler de araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda kıvrılma derecesi arttıkça yaprak simplastik alanında PPO aktivitesinin azaldığı petiyolde ise arttığı saptanmış ve bu azalış ve artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Çalışmamıza benzer olarak, *Olea europaea* bitkisinde PPO aktivitesinin kuraklık koşullarında azaldığı rapor edilmiştir (Sofa vd., 2005). Literatürde yapılan bazı çalışmalarda stres esnasında PPO aktivitesindeki azalmanın nedeni olarak PPO'nun inhibisyonuyla ve indirgenmiş durumda fenolik bileşik redoks durumunun sürdürülmesiyle kuraklık stresinin fenolik bileşiklerin antioksidan özelliklerini geliştirebileceği

gösterilmiştir. Ayrıca PPO'nun proteolitik aktivitesinin bu enzimin ROS'lar tarafından hasar gören proteinlerin uzaklaştırılmasıyla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Kuwabara ve Katoh, 1999; Sofu vd., 2005). Bu konuda domates bitkisinde yapılan bir başka çalışmada hücrelerde antosiyanin ve fenolik madde miktarı artarken oksidatif hasarı azaltmak için PPO aktivitesinin % 42 oranında indirildiği rapor edilmiştir (Balakumar vd., 1997). Çalışmamızda yaprakta simplastik PPO aktivitesinin azalması kuraklık esnasında PPO'nun inhibisyona uğradığını göstermektedir. Ayrıca aktivitedeki azalışın kuraklık stresinin süresiyle ilişkili olduğu düşünülebilir. Nitekim lignifikasyonla ilişkili enzimlerin özellikle PPO aktivitesindeki azalmaların stresin süresiyle ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Zheng vd., 2005). Diğer taraftan kuraklık periyodu boyunca her iki bitkisel yapının apoplastik alanlarındaki PPO aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Bitkinin apoplastik alanında PPO aktivitesindeki bu artışın hücre çeperi lignifikasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde patojen ataklarına karşı artan PPO aktivitesinin hücre çeperi lignifikasyonuna ve çapraz bağlanmaya neden olduğu ileri sürülmüştür (Thipyapong vd., 2007). Literatürde apoplastik PPO aktivitesiyle ilgili veriler nispeten azdır. Örneğin, kışlık buğday yapraklarında yapılan bir çalışmada apoplastik PPO aktivitesinin soğuk stresinin etkisiyle arttığı kaydedilmiştir (Taşgın vd., 2006). Bununla birlikte elde ettiğimiz bulgulara benzer şekilde, apoplastik alandaki H₂O₂ seviyesinin artmasının apoplastik PPO aktivitesiyle ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Diaz-Vivancos vd., 2006). Apoplastta ROS'ların üretimi hidrosiprolin bakımından zengin glikoproteinler gibi hücre çeperi bileşenlerinin oksidatif çapraz bağlanmasına neden olabilir (Lee vd., 2007).

Diğer taraftan APX, DHAR, MDHAR ve GR enzimlerinin oluşturduğu ve askorbat-glutasyon siklusu veya Asada-Halliwell yolu olarak adlandırılan sistem stromada indirgenmiş askorbatın yüksek seviyede kalmasını sağlar. Böylece askorbat yokluğunda aşırı derecede kararsız olan APX enziminin fonksiyonel olması sağlanır ve enzimatik olarak H₂O₂ temizlenebilir. APX'in H₂O₂'yi temizlemesi askorbat-glutasyon siklusunun ilk basamağını oluşturmaktadır (Foyer ve Halliwell, 1976; Asada, 1994). Ayrıca DHAR, MDHAR ve GR sentezi oksidatif stresi azaltmak için su stresine maruz kalmış bitkilerin temel cevaplarından biridir (Dat vd., 1998). Stres altında bu sistemde görevli olan enzimlerin aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir (Mishra vd., 1993; Edwards vd., 1994; Foyer vd., 1994). Elde ettiğimiz bulgularda bu düşüncüyü destekler niteliktedir. Daha önce de açıklandığı gibi çalışmamızda apoplastik alandaki APX aktivitesindeki artışın H₂O₂

seviyesinin artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Askorbat-glutasyon yolunun diğer enzimleri olan DHAR, MDHAR ve GR de çalışmamızda araştırılmıştır. Mevcut çalışmada DHAR ve MDHAR aktivitelerinin yaprak ve petiyol simplastik alanlarında var olduğu fakat apoplastik alanda olmadığı bulunmuştur. Benzer şekilde tuz stresine maruz bırakılan *Pisum sativum* yaprak apoplastik alanında DHAR ve MDHAR aktivitelerinin olmadığı rapor edilmiştir (Hernandez vd., 2001). Benzer sonuçlar *Plantago major* (Lyons vd., 1999), *Fagus sylvatica* (Luwe, 1996), *Picea abies* (Polle vd., 1990) ve *Sedum album* (Castillo ve Greppin, 1986)'un yapraklarında yapılan çalışmalarla da ortaya konulmuştur. DHAR ve MDHAR oksidatif hasara karşı hücre bileşenlerini korumada önemli rol oynar (Asada ve Takahashi, 1987; Elstner, 1987; Salin 1988). Aynı zamanda askorbat üretimini katalizlerler (Sgherri vd, 2000). Ayrıca bu iki enzim askorbatın yüksek redoks durumunun sürmesine katkı sağlar (Noctor ve Foyer, 1998). Yapılan analizlerde simplastik DHAR ve MDHAR aktivitelerinin kıvrılma boyunca her iki bitkisel yapıda da arttığı saptanmış ve aktivitedeki bu artışlar istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Ayrıca DHAR ve MDHAR aktivitelerinin APOX aktivitesinden çok daha düşük olduğu görülmüştür. Literatürde yapılan çalışmalarla da kuraklık stresi sırasında MDHAR ve DHAR aktivitelerinin arttığı ileri sürülmüştür. Örneğin kuraklık stresine maruz bırakılan buğday çeşitlerinde orta ve ağır su stresi koşullarında MDHAR ve DHAR aktivitelerinin arttığı bulunmuştur (Selote ve Chopra, 2006). Yine çeltik bitkisinde yapılan bir çalışmada orta şiddette kuraklık stresi altında her iki enzim aktivitesinin de kontrolle kıyaslandığında önemli derecede artış gösterdiği rapor edilmiştir (Sharma ve Dubey, 2005). Bir diğer çalışmada ise tuz stresine maruz bırakılan bezelye'nin yaprak simplastik alanında MDHAR ve DHAR aktivitelerinin arttığı kaydedilmiştir (Hernandez vd., 2001). Elde edilen bulgulara göre yapraktaki DHAR aktivitesinin kuraklık periyodu esnasında kıvrılma boyunca artmasının simplastik dehidroaskorbat (DHA) seviyesinin artmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Böylece artan DHAR aktivitesi DHA'dan daha fazla askorbatın indirgenmesine neden olur. Petiyolde ise DHAR ve MDHAR aktivitelerinin artması kuraklık esnasında simplastik alanda glutasyon konsantrasyonunun önemli derecede artmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca artan DHAR ve MDHAR'ın hücrelerde biriken H₂O₂'yi temizlemek için askorbatın indirgenmesini katalizlediklerini söylemek mümkündür. Diğer taraftan apoplastik DHAR aktivitesinin olmaması *C. setosa*'nın apoplastik alanında askorbat-glutasyon yoluyla DHA'dan askorbatın büyük miktarda üretilmediği düşüncesini (Foyer ve Halliwell, 1976) desteklemektedir.

Mevcut çalışmada askorbat-glutasyon siklusunun diğer bir antioksidan enzimi olan GR aktivitesinde meydana gelen değişimler araştırılmıştır. GR, GSSG'nin GSH'a indirgenmesine aracılık eder ve GSH'ın GSSG'ye oranının yüksek kalmasını sağlayarak oksidatif hasara karşı kloroplastların korunmasında önemli bir rol oynar (Gamble ve Burke, 1984; Pilon-Smits, 2000). Dolayısıyla stres altında askorbat-glutasyon yoluna GSH sağlamak ve GSH/GSSG oranının yüksek tutulması için GR aktivitesinde artış olması bir ihtiyaç olabilir. Çalışmamızda yaprak kıvrılma derecesi artarken yaprakta simplastik GR aktivitesinin arttığı bulunmuştur. GR aktivitesindeki artışın simplastik alandaki glutasyon seviyesinin artmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir. Nitekim araştırmamızda yaprak kıvrılması boyunca simplastik alanda GSH seviyesinin ve GSH/GSSG oranının arttığı bulunmuştur. Bu nedenle *C. setosa*'da yaprak kıvrılması artışına paralel olarak GR aktivitesinin artış göstermesi kuraklık koşullarında bu enzimin bitkiye dayanıklılık sağlamada rol oynayabileceğinin bir kanıtı olabilir. Benzer şekilde çeltik bitkisinde yapılan bir çalışmada kuraklık stresi esnasında GR aktivitesindeki artışın glutasyon seviyesinin artmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Sharma ve Dubey, 2005). Artan GR aktivitesinin strese tolerans geliştirmede etkili olabileceği ve elektron transport zincirindeki önemli bileşenlerin redoks dengesini değiştirebileceği rapor edilmiştir (Tyystjarvi vd., 1999). Diğer taraftan petiyolde ise kıvrılma derecesi artarken simplastik GR aktivitesinin azaldığı bulunmuştur. Bu nedenle petiyolde simplastik GR aktivitesinin azalış nedeninin simplastik alandaki GSSG içeriğinin değişmemesinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca araştırmamızda yaprak kıvrılması boyunca yaprak apoplastik alanındaki GR aktivitesinin arttığı, petiyolde ise aktivitenin % 54 kıvrılma derecesine kadar arttığı daha sonra kontrol seviyesine düştüğü görülmüştür. Yapraktaki apoplastik GR aktivitesinin apoplastik alanda biriken H₂O₂ ve süperoksit radikallerine bir cevap olarak arttığı düşünülmektedir. Ayrıca GR'nin askorbat-glutasyon yoluyla apoplastta üretilen H₂O₂ ve süperoksit radikallerinin temizlenmesinde fonksiyonu olduğunu söylemek mümkündür. Nitekim literatürdeki bazı çalışmalar bu düşünceyi destekler niteliktedir. Örneğin su stresine maruz bırakılan buğday bitkisinde GR aktivitesinde gözlenen artışın reaktif oksijen ürünlerine karşı kloroplastları korumada etkili olabileceği rapor edilmiştir (Gamble ve Burke, 1984). Ayrıca Foster ve Hess (1982), artan oksijen konsantrasyonuna cevap olarak oksidatif hasara karşı bitki dokularını korumada GR aktivitesinin arttığını ileri sürmüşlerdir. Yine tuz stresine maruz bırakılan *Pisum sativum* yapraklarında yapılan bir çalışmada yaprak apoplastik alanındaki GR aktivitesinin her iki çeşidin apoplastik

alanında arttığı bulunmuştur (Hernandez vd., 2001). Diğer taraftan petiyolde % 74 kıvrılma derecesinde apoplastik GR aktivitesinde önemli bir değişimin olmaması petiyol apoplastik alanındaki GR aktivitesinin rolünü bu alanda daha yüksek aktiviteye sahip olan APX enziminin üstlenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim askorbat-glutasyon yolunda anahtar bir enzim olan APX'in hücre içindeki H₂O₂ gibi oksidatif stres ürünlerinin temizlenmesinde rol aldığı ve böylece oksidatif stresin olumsuz etkilerini azaltabileceği rapor edilmiştir (Foyer ve Halliwell, 1976). Ayrıca daha önce *C. setosa*'da yapılan çalışmalarda yaprakta ve petiyolde kuraklık boyunca toplam GR aktivitesinin çok fazla değişmediği rapor edilmiştir (Terzi ve Kadioğlu, 2006). Apoplastik fazın hacmi toplam hücre hacminin % 4,5'ini oluşturduğu için (Winter vd., 1993) apoplastik alandaki antioksidan enzim aktiviteleri toplam aktiviteyle kıyaslandığında çok düşük fakat önemli miktarlardadır. Elde ettiğimiz bulgularda da apoplastik antioksidan enzim aktivitelerinin toplam enzim aktivitelerinden çok daha düşük olduğu saptanmıştır.

Antioksidan maddeler ve enzimatik olarak katalizlenen reaksiyonlardan oluşan antioksidan savunma sistemi oksidatif strese sebep olan reaktif oksijen türlerinin yok edilmesinde hücrelere yardımcı olurlar. Bu nedenle mevcut çalışmada antioksidan enzimlerin yanı sıra yaprak kıvrılmasıyla ilişkili olarak apoplastik ve simplastik alanlardaki antioksidanların rolü de araştırılmıştır. Askorbat (ASC) ve glutasyon (GSH) hücrelerde bulunan düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar olup enzimatik olmayan reaksiyonlarla ROS'ları temizler ve oksidatif stresin etkisini azaltırlar (Smirnoff ve Palanca, 1996). Ayrıca her iki bileşik hücrelerin redoks durumunun devam etmesinde önemli bir role sahip olup direkt olarak reaksiyona girerler ve süperoksit (O₂^{•-}) ve hidroksil radikallerini ([•]OH) nötralize ederler (Dalton, 1995). ASC'nin bitki hücresinin apoplastik alanında birçok olayla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Hücre çeperi peroksidazları için substrat olmanın yanı sıra hücre çeperi lignifikasyonunda da rol oynadığı kaydedilmiştir (Takahama ve Oniki, 1992; de Cabo vd., 1996; Mehlhorn vd., 1996). Çalışmamızda her iki bitkisel yapının apoplastik ve simplastik alanlarındaki askorbat içeriğinin dehidroaskorbat içeriğinden çok daha düşük olduğu bulunmuştur. Düşük askorbat içeriği hücre çeperinin çapraz bağlanması için gerekli olan bileşenlerle ilişkili olabilir. Ayrıca yaprak simplastik alanındaki askorbat içeriğinin % 26 ve % 54 kıvrılma derecelerinde arttığı daha sonra azaldığı bulunmuştur. Petiyolde ise, sadece kuraklığın başlangıcında arttığı daha sonra kıvrılma derecesi arttıkça azaldığı görülmüştür. Diğer taraftan yapraktaki askorbat üretiminin petiyoldekenden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Simplastik askorbat

miktarının % 74 kıvrılma derecesinde azalması askorbatın dehidroaskorbata oksidasyonu ile açıklanabilir. Nitekim mevcut çalışmada % 74 kıvrılma derecesinde simplastik askorbat miktarı azalırken dehidroaskorbat miktarının arttığı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara benzer şekilde çeltik bitkisiyle yapılan bir çalışmada stres durumunda askorbat miktarı azalırken DHA miktarının arttığı rapor edilmiştir (Boo ve Jung, 1999; Boo vd., 2000). Petiyolde simplastik alanda DHA'nın sadece kuraklığın başında arttığı daha sonra kıvrılma boyunca azaldığı bulunmuştur. Dolayısıyla petiyolde askorbat içeriğinin azalması dehidroaskorbattan değil APX'in askorbatı substrat olarak kullanmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca çalışmamızda yaprak ve petiyol apoplastik askorbat içeriğinin kontrolle kıyaslandığında arttığı bulunmuştur. Yaprak (% 74 kıvrılma derecesi) ve petiyol simplastik alanlarında askorbat içeriği azalırken apoplastik alanda artıyor olması askorbatın sitosolden apoplasta taşındığı (Takahama, 1996; Noctor ve Foyer, 1998) düşüncesini destekler niteliktedir. Birçok araştırmacı askorbat ve dehidroaskorbatın plazma membranındaki aktif taşınımı ile ilgili çalışmalar yapmıştır (Heath, 1988; Luwe vd., 1993). Örneğin ozon stresine maruz bırakılan *Cucurbita pepo* bitkisinde askorbatın ekstrasellular matrikse taşındığını ve böylece apoplastik askorbatın ozona karşı savunmada rol oynayabildiğini göstermiştir. Aynı çalışmada ekstrasellular DHA'nın sitoplazmaya yeniden taşınabileceği ve intrasellular (simplast) DHAR tarafından askorbata indirgenebileceği rapor edilmiştir (Luwe vd., 1993; Rauntenkraz vd., 1994). Diğer taraftan yaprak ve petiyol apoplastik alanlarında DHAR aktivitesinin bulunmaması DHA'nın apoplastta askorbatı oluşturmak için yeterince indirgenemediğini göstermektedir. Askorbat redoks sistemi L-askorbik asit (askorbat), monodehidroaskorbat ve dehidroaskorbattan oluşur. Çalışmamızda ASC/DHA ve ASC/ASC+DHA (redoks durumu) oranının stresin şiddetiyle yaprakta hem simplastik hem de apoplastik alanda azaldığı bulunmuştur. Diğer taraftan petiyolde ise simplastik alanda azalırken apoplastik alanda arttığı görülmüştür. Apoplastik antioksidan sistemde yer alan redoks dengesindeki değişimler bitkilerin patojen atakları, ağır metaller ve ozon gibi çeşitli çevresel streslere karşı cevabında rapor edilmiştir (Piqueras vd., 1999; Hernandez vd., 2001). Mevcut çalışmada kuraklık stresi hem apoplastik hem de simplastik alanda H₂O₂ birikimine ve peroksidaz aktivitesinde artışa neden olduğu için ASC/ASC+DHA'ya oranının azalmasının askorbatın peroksidaz bağımlı reaksiyonlar tarafından oksidasyonu ile açıklanabilir. Elde edilen bulgular literatürdeki bazı çalışmalarla uygunluk içerisindedir. Örneğin yapılan bir çalışmada çam ağaçlarının hipokotillerinde ve tütün yapraklarının apoplastik alanında yaşa bağlı olarak

ASC/ASC+DHA oranının azaldığı ve çözünebilir peroksidaz aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir (Sanchez vd., 1997; Takahama, 1998). Çeltik bitkisinde yapılan bir çalışmada ağır ve orta şiddette kuraklık stresine maruz kalan bitkilerin ASC/DHA oranlarının azalmasının yanı sıra toplam askorbat konsantrasyonunun da azaldığı saptanmıştır (Dalton vd., 1995).

Mevcut çalışmada etkili bir intrasellular radikal temizleyici olan glutatyon içeriğindeki değişimler de araştırılmıştır. Glutatyonun *C. setosa*'nın yaprak ve petiyol apoplastik alanlarında olmadığı sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde, glutatyonun bazı bitki türlerinin apoplastik alanlarında çok az veya hiç olmadığı rapor edilmiştir (Polle vd., 1990; Luwe, 1996; Vanacker vd., 1998b). Çalışmamızda kuraklık periyodunda yapraktaki toplam glutatyon içeriğinin (GSH+GSSG) petiyoldekenden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca simplastik GSH içeriğinin kuraklık periyodu ilerledikçe arttığı, GSSG içeriğinin ise azaldığı gözlenmiştir. Kuraklık stresi altında simplastik glutatyon içeriğindeki artış aynı alandaki GR ve DHAR aktivitelerinin artmasıyla açıklanabilir. GR aktivitesindeki artış yüksek GSH ve düşük GSSG seviyesiyle ilişkilidir. Elde edilen bulgulara benzer şekilde kuraklık stresine maruz bırakılmış çeltik bitkisinde glutatyon konsantrasyonunun arttığı ve bu artışın askorbat-glutatyon yolundaki enzim aktivitelerindeki değişimle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Sharma ve Dubey, 1995). Zhang ve Kirkham (1996)'ın yaptıkları çalışmada elde ettikleri veriler, sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Bu araştırmacılar kuraklık stresine maruz bırakılmış *Sorghum bicolor* bitkisinde GSH seviyesinin arttığını, GSSG seviyesinin ise azaldığını rapor etmişlerdir. Kuraklık stresi esnasında glutatyon seviyesindeki artış oksidatif strese karşı bitkileri korumada GSH'in ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda artan glutatyon seviyesinin askorbat ve dehidroaskorbat seviyelerinin düzenlenmesi için gerekli olduğu düşünülür (Noctor ve Foyer, 1998; Foyer vd., 2001). Diğer taraftan petiyolde GSH içeriği artarken, GSSG içeriğinin kuraklığın başlangıcında arttığı daha sonra çok fazla değişmediği bulunmuştur. Bu nedenle petiyolde kuraklığın artmasıyla GSSG'nin değişmemesi, GR'nin substrat olarak NADPH'ı kullanarak GSSG'yi GSH'a indirgediğini göstermektedir. Nitekim, GR'nin GSSG'yi GSH'a indirgerken NADPH'ı kullandığı ve böylece CO₂ fiksasyonunun azaldığı zamanlarda NADPH/NADP⁺ oranının ayarlanmasına yardımcı olduğu bilinmektedir (Creissen vd., 1996). Ayrıca petiyolde GSH içeriğinin artması GSH'ın enzimatik olmayan reaksiyonlarla üretilmesinin bir sonucu olabilir. Bununla birlikte mevcut çalışmada yaprak ve petiyolde GSH/GSSG oranının önemli derecede arttığı görülmüştür. Bu durum artan GR aktivitesinin glutatyon

havuzunun redoks durumunun sürdürülebilmesi için yeterli olmadığına işaret etmektedir. Nitekim çalışmamızda GR aktivitesinin petiyol simplastik alanında azaldığı bulunmuştur.

Stresin etkisiyle aşırı derecede biriken ROS'ların membran hasarının oluşmasında birincil derecede etkili olduğu bilinmektedir (Scandalios, 1993; Li ve Staden, 1998). Çalışmamızda askorbat-glutasyon döngüsündeki antioksidan sistemin kuraklığın başlangıcında uyarıldığı ve bu uyarının, membran hasarının en yüksek olduğu % 26 kıvrılma derecesinden sonra maksimuma ulaştığı saptanmıştır. Daha önce *C. setosa*'da yapılan çalışmalarda bir membran hasarı indikatörü olan MDA içeriğinin % 26 kıvrılma derecesine kadar arttığı daha sonraki kıvrılma derecelerinde azaldığı kaydedilmiştir (Terzi ve Kadioğlu, 2006). MDA içeriğinin % 26 kıvrılma derecesinden sonra azalması antioksidan enzim sisteminin uyarılmasıyla ilişkili olabilir. Ayrıca yaprak kıvrılmasının son aşamasında (% 74) askorbat-glutasyon döngüsündeki enzim aktivitelerinde meydana gelen azalışların nispeten ROS'ların temizlenmiş olmasının bir sonucu olabilir.

Mevcut çalışmada antioksidan sistemle ilişkili olarak yaprak ve petiyol arasında çoğu benzerlikler olmasına rağmen bazı farklılıkların olduğu da saptanmıştır. Bu farklılıkların yaprak kıvrılma olayı ve her iki bitkisel yapının yapısal ve fonksiyonel farklılığıyla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma ile yaprak kıvrılmasının kuraklık toleransına yeterince katkı sağlayıp sağlayamadığı ve yaprak kıvrılması esnasında kuraklığa tolerans sağlamada bitkinin iki farklı hücresel alanlarındaki antioksidan enzimlerin ve antioksidanların rolü belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak, elde edilen tüm bulgular yaprak kıvrılmasının kuraklık toleransına tek başına katkı sağlayamadığı ve aynı zamanda *C. setosa*'nın apoplastik ve simplastik alanlarındaki antioksidan savunma sisteminin de aktive edildiğini göstermiştir. Ayrıca antioksidan enzim aktivitelerindeki artışların hücre çeperinde lignifikasyona ve oksidatif çapraz bağlanmaya neden olabileceği sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇLAR

1. Kuraklık stresine maruz bırakılan *Ctenanthe setosa*'da yaprak kıvrılma derecesi artarken, nispi su içeriğinin, yaprak su potansiyelinin ve stoma iletkenliğinin azaldığı bulundu.
2. Apoplastik sıvının simplastik sıvıdan bulaşmama işareti olarak kabul edilen G-6-PDH aktivitesi 0'a yakın bir değerde bulundu. Böylece apoplastik sıvı çok saf bir yüzde de elde edildi.
3. Artan yaprak kıvrılma derecesi boyunca yaprakta simplastik SOD aktivitesinin önemli derecede değişmediği saptandı. Petiyolde ise sadece % 54 kıvrılma derecesinde arttığı, diğer kıvrılma derecelerinde önemli bir değişimin olmadığı bulundu. Diğer taraftan apoplastik SOD aktivitesinin hem yaprak hem de petiyolde kuraklığın başlangıcında önemli ölçüde değişmediği, fakat % 74 yaprak kıvrılma derecesinde her iki bitkisel yapıda da aktivitenin arttığı belirlendi.
4. Kuraklık periyodu boyunca kıvrılma derecesi artarken, apoplastik ve simplastik GPX aktivitesinin kontrole oranla yaprak ve petiyolde önemli derecede arttığı ve bu artışların istatistiki bakımdan önemli olduğu tespit edildi.
5. Bitkinin yaprak ve petiyollerinde yapılan analizler sonucunda CAT aktivitesinin yaprak simplastik alanında yaprak kıvrılması süresince, petiyolde ise sadece % 74 kıvrılma derecesinde arttığı bulundu. Yaprak apoplastik alanında da simplastik alanına benzer şekilde aktivitenin kıvrılma boyunca arttığı petiyolde ise önemli derecede değişmediği kaydedildi.
6. Kuraklık periyodu esnasında yaprakta simplastik APX aktivitesinin kontrole oranla önemli ölçüde değişmediği fakat petiyolde % 26 ve % 74 kıvrılma derecelerinde arttığı belirlendi. Kıvrılma arttıkça yaprak ve petiyoldeki apoplastik APX aktivitesinin kontrole kıyaslandığında arttığı, petiyolde sadece % 54 kıvrılma derecesinde aktivitenin değişmediği bulundu.
7. NAD(P)H oksidaz aktivitesinin yaprakta kontrole oranla arttığı, petiyolde ise tüm kıvrılma periyotlarında aktivitede değişim olmadığı bulundu.
8. Kıvrılma derecesinin artmasıyla beraber kuraklık periyodu arttıkça yaprak simplastik alanındaki GR aktivitesinin arttığı, petiyolde ise azaldığı bulundu. Diğer

- tarafından yaprakta apoplastik GR aktivitesinin simplastik GR aktivitesinde olduğu gibi kontrolle kıyaslandığında arttığı petiyolde ise aktivitenin değişmediği görüldü.
9. Yapılan analizler sonucunda DHAR aktivitesinin sadece yaprak ve petiyol simplastik alanında var olduğu, apoplastik alanda ise aktivitenin olmadığı görüldü. Yaprak simplastik alanındaki DHAR aktivitesinin kontrolle kıyaslandığında önemli ölçüde arttığı saptandı. Petiyol simplastında ise aktivitenin, % 26 kıvrılma derecesinde arttığı ancak % 74 kıvrılma derecesinde ise değişmediği kaydedildi.
 10. MDHAR aktivitesinin DHAR aktivitesinde olduğu gibi sadece yaprak ve petiyol simplastik alanında var olduğu, her iki bitkisel yapının apoplastik alanında ise olmadığı görüldü. Simplasttaki MDHAR aktivitesinin kıvrılma boyunca arttığı, petiyolde ise sadece % 26 ve % 54 kıvrılma derecelerinde arttığı, % 74 kıvrılma derecesinde kontrol seviyesine düştüğü bulundu.
 11. Kuraklık periyodu boyunca kıvrılma derecesinin artmasına paralel olarak yaprak simplastik PPO aktivitesinin kontrolle kıyaslandığında istatistikî açıdan önemli derecede azaldığı saptandı. Petiyolde ise aktivitenin % 26 ve % 54 kıvrılma derecelerinde arttığı, % 74 maksimum kıvrılma derecesinde ise tekrar azaldığı belirlendi. Diğer taraftan yaprak ve petiyol apoplastik alanlarındaki PPO aktivitesinin kuraklık periyodu arttıkça arttığı bulundu.
 12. Yapılan analizler sonucunda indirgenmiş (GSH) ve okside (GSSG) glutatyon içeriklerinin yaprak ve petiyol simplastik alanında var olduğu, her iki bitkisel yapının apoplastik alanlarında olmadığı görüldü. GSH içeriğinin yaprak ve petiyolde kuraklık periyodu boyunca arttığı, GSSG'nin ise azaldığı görüldü. Ayrıca kuraklık periyodunun artmasıyla GSH/GSSG oranının her iki bitkisel yapının simplastik alanında arttığı tespit edildi.
 13. Kuraklık periyodu boyunca yaprak ve petiyolde yapılan analizler sonucunda askorbat (ASC) ve dehidroaskorbat (DHA) içeriklerinin hem apoplastik hem de simplastik alanlarında var olduğu görüldü. Yaprak ve petiyolde apoplastik ASC içeriğinin kontrole oranla kıvrılma periyodu boyunca arttığı, apoplastik DHA içeriğinin yaprakta arttığı petiyolde ise azaldığı belirlendi. Diğer taraftan simplastik ASC içeriğinin yaprakta % 26 ve % 54 kıvrılma derecelerinde artarken, % 74 kıvrılma derecesinde azaldığı görüldü. Petiyolde ise kuraklığın başlangıcında artan ASC içeriğinin % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde azaldığı bulundu. Ayrıca simplastik DHA içeriğinin kuraklık boyunca arttığı, petiyolde ise kuraklığın

başlangıcında önemli bir değişimin olmadığı, % 54 ve % 74 kıvrılma derecelerinde azaldığı kaydedildi. ASC/DHA oranının yaprakta hem simplastik hem de apoplastik alanda ve petiyol apoplastik alanında azaldığı, petiyolde simplastik alanında ise arttığı görüldü.

14. Yapılan analizler sonucunda yaprak ve petiyol apoplastik ve simplastik alanlarındaki H_2O_2 içeriğinin % 54 kıvrılma derecesine kadar arttığı daha sonra azaldığı bulundu.
15. Yaprak ve petiyol apoplastik ve simplastik alanlarındaki süperoksit üretiminin de arttığı ve apoplastik alandaki üretimin simplasttakinden daha fazla olduğu saptandı.
16. Reaktif oksijen türlerinin dokusal yerleşimini belirlemek amacıyla yapılan histokimyasal analizler sonucunda süperoksit tarafından NBT'nin indirgenmesi sonucu oluşan formazonun çoğunlukla mezofil hücrelerinde daha az oranda da kortekste olduğu saptandı. Hidrojen peroksitin ise mezofil ve epidermal hücrelerinin hücre çeperinde yerleşik olduğu bulundu.

6. ÖNERİLER

Tüm dünyada, bitkiler elverişsiz çevre şartlarından olumsuz etkilenmektedir. Bitkiler üzerinde olumsuz etkileri olan çevresel streslerden biri kuraklık stresidir. Bitkiler stresten korunmak için çeşitli savunma mekanizmalarına sahiptirler. Yaprak kıvrılması bu mekanizmalardan biri olup, bu mekanizmaya sahip olan *Ctenanthe setosa* bitkisi stres çalışmalarının fizyolojisini açıklamak bakımından oldukça önemli bir bitkidir ve stres durumunda yapraklarını kıvrarak uzun süre hayatta kalabilmektedir. Son yıllarda, bitkilerin yapraklarını katlamaları veya kıvrımları yerine stomalarının açık kalması koşulu ile yaprak kıvrımını engelleme çalışmaları yapılmaktadır. Bunun nedeni stres etkisiyle oluşan katlanma veya kıvrılma sonucu bitkilerin fotosentez hızında azalma olmakta ve biyomas üretimleri düşmektedir. Özellikle dünyada geniş olarak tarımı yapılan ve bu mekanizmaya sahip pirinç, mısır, buğday gibi bitkiler için bu çalışmalar daha büyük önem arz etmektedir. Bu yönde çalışmalar yapmak ve başarılı olmak için katlanma veya kıvrılma mekanizmasının bütün yönleri ile bilinmesi gerekir. Tarafımızdan daha çok bir model bitki olarak kullanılan *Ctenanthe setosa* bitkisindeki yaprak kıvrılma mekanizmasını aydınlatmaya yönelik olan bu çalışmadan elde edilen bilgiler, yukarıda ekonomik önemi olduğu vurgulanan ve benzer mekanizmalara sahip bitkiler için kullanılabilir olmasından dolayı, mevcut çalışmanın uygulanabilir özelliği bulunmaktadır.

Son yıllarda proteinlerle yapılan araştırmaların çoğunluğu, stres polipeptidlerinin izolasyonu, karakterizasyonu, bu proteinlerin şifrelendiği genlerin klonlanması ve başka bir bitkide ekspresyonunun yapılması yönünde yoğunlaşmıştır. *C. setosa*'da apoplastik proteinlerin kuraklık stresinden nasıl etkilendikleri bilinmemektedir. Bu açıdan *C. setosa*'da stres esnasında değişen apoplastik ve simplastik proteinlerin iki yönlü profillerinin belirlenmesinin daha sonra yapılacak proteomiks ve moleküler çalışmalar için öncü olacağı düşünülmektedir.

Ayrıca mevcut çalışmamızda antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin yaprak kıvrılma periyodunda hücre çeperi lignifikasyonuna neden olabileceği belirlenmiştir. Bu olayın daha ayrıntılı olarak incelenebilmesi için yaprak kıvrılması sırasında lignin içeriğinde meydana gelen değişimlerin ve fenilalanin amonyak liyaz ve IAA oksidaz gibi lignifikasyonla ilişkili diğer enzim aktivitelerinin araştırılmasına gereksinim duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- 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.
- Aebi, H.E. 1983. Catalase. In: Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer, H.U., Ed., Verlag Chemie, Weinheim, 273-286.
- Alscher, R.G. Erturk, N. ve Heath, L.S., 2002. Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Controlling Oxidative Stress in Plants, J. Ex. Bot., 53, 1331-1341.
- Antonenkov, V.D., 1989. Dehydrogenases of the Pentose Phosphate Pathway in Rat Liver Peroxisomes, Eur. J. Biochem., 183, 75-82.
- Aono, M., Saji, H., Fujiyama, S. ve Sugita, M., 1995. Decrease in Activity of Glutathione Reductase Enhances Paraquat Sensitivity in Transgenic *Nicotiana tabacum*, Plant Physiol., 107, 645-648.
- Arora, A. ve Mohan, J., 2002. Expression of Dwarfing Genes Under Nitrogen and Moisture Stress in Wheat (*Triticum spp*): Dry Matter Partitioning, Root Growth and Leaf Nitrogen, J. Agronon. Crop Sci., 186, 111-118.
- Arrigoni, O., Dipierro, S. ve Borracino, G., 1981. Ascorbate Free Radical Reductase: A Key Enzyme of The Ascorbic Acid System, FEBS Lett., 125, 242-244.
- Arrigoni, O., 1994. Ascorbate System in Plant Development, J. Bioenerg Biomembr., 26, 407-419.
- Asada, K., Takahashi, M. ve Nagate, M., 1975. Assay and Inhibitors of Spinach Superoxide Dismutase, Agric. Biol. Chem., 38, 471-473.
- Asada, K. ve Takahashi, M., 1987. Production and Scavenging of Active Oxygen in Photosynthesis, In: Photoinhibition, Kyle, D.J., Osmond, C.B., Arntzen, C.J., Ed., Elsevier, Amsterdam, 227-287..
- Asada, K., 1992. Ascorbate Peroxidase-Hydrogen Peroxide Scavenging Enzyme in Plants, Physiol. Plant., 85, 235-241.
- Asada, K., 1994. Production and Action of Active Oxygen Species in Photosynthetic Tissues, In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, Foyer, C.H., Mullineaux, P.M., Ed., CRC Press, Boca Raton, 77-104.
- 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.

- Ayaz, F.A., Kadioglu, A. ve Dogru, A., 2001. Leaf Rolling Effects on Lipid and Fatty Acid Composition in *Ctenanthe setosa* (Marantaceae) Subjected to Water-Deficit Stress, Acta Physiol. Plant. 23, 43-47.
- Baet, S.H., Kwan, I.S., Part, T.I., Yun, S.J., Kim, J.K. ve Chai, K.G., 2000. Activities and Isozyme Profiles of Antioxidant Enzymes in Intracellular Compartment of Overwintering Barley Leaves, J. Biochem. Mol. Biol., 33, 385-390.
- Bahrn, A., Jensen, C.R., Asch, F. ve Mogensen, V.O., 2002. Drought-Induced Changes in Xylem pH, Ionic Composition, and ABA Concentration Act As Early Signals in Field-Grown Maize (*Zea mays* L.), J. Exp. Botany., 53, 251-263.
- 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.
- Baker, C.J. ve Orlandi, E.W., 1995. Active Oxygen in Plant Pathogenesis, Annu. Rev. Phytopathol., 33, 299-321.
- Balakumar, T., Gayathri, B. ve Anbudurai, P.R., 1997. Oxidative Stress Injury in Tomato Plants Induced by Supplemental UV-B, Radiation. Biol. Plant., 39, 2499-2506.
- Barcelo, A.R., 1998. The Generation of H₂O₂ in The Xylem of *Zinnia elegans* is Mediated by An NADPH-Oxidase-Like Enzyme, Planta, 207, 207-216.
- Bastide, B., Sipes, D. ve Ting, I.P., 1993. Effect of Severe Water Stress on Aspects of Crassulacean Acid Metabolism in *Xerosicyos*, Plant Physiol., 103, 1089-1096.
- 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., Kramer, P.J., Ed., John Wiley and Sons, New York, 33-42.
- Berczi, A. ve Moller, I.M., 2000. Redox Enzymes in the Plant Plasma Membrane and Their Possible Roles, Plant Cell Environ., 23, 1287-1302.
- Bergmeyer, J. ve Grabl, M., 1983. Methods of Enzymatic Analysis, Third Edition, Germany, 190-302.
- Bhattacharjee, S., 2005. Reactive Oxygen Species and Oxidative Burst: Roles in The Stress, Senescence and Signal Transduction in Plants, Curr. Sci. India, 89, 1113-1121.
- Bidwell, R.G.S., 1974. Plant Physiology, Giles, McMillan Co., New York.
- Bishop, D.L., 2002. Gene Expression of Vacuolar Peroxidase With Stress-Induced Pathogenesis in Wheat Sheats, Physiol. Mol. Plant Pathol., 61, 65-71.

- 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., Caldwell, M.M., Ed., Springer-Verlag, Berlin, 17-47.
- Blinda, A., Koch, B., Ranunjulu, S. ve Dietz, K.J., 1997. De Novo Synthesis and Accumulation of Apoplast Proteins in Leaves of Heavy Metal Exposed Barley Seedlings, *Plant Cell Environ.*, 20, 969-981.
- Blum, A., 1986. *Plant Breeding for Stress Environments*, CRC Press, Boca Raton, USA, 1-223.
- Boeuf, G., Legnard, B. ve Rambour, S., 1999. Influence of Light Conditions on Development, Apoplastic Peroxidase Activities and Peroxidase Isoenzymes in Chicory Root Explants, *Physiol. Plant.*, 106, 331-336.
- Boeuf, G., Legnard, B. ve Rambour, S., 2001. Effect of NAA on the Development Apoplastic Peroxidase Activities and Peroxidase Isoenzymes in Chicory Root Explants, *J. Plant Physiol.*, 158, 963-969.
- Bolwell, G., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C., Minibaeva, F., Rowntree, E.G. ve Wojtaszek, P., 1999. Recent Advances in Understanding the Origin of the Apoplastic Oxidative Burst in Plant Cells, *Free Radical Res.*, 31, 137-145.
- Boo, Y.C. ve Jung, J., 1999. Water Deficit Induced Oxidative Stress and Antioxidative Defences in Rice Plants, *J. Plant Physiol.*, 155, 255-261.
- Boo, Y.C., Lee, K.P. ve Jung, J., 2000. Rice Plants With A High Protochlorophyllide Accumulation Show Oxidative Stress in Low Light That Mimics Water Stress, *J. Plant Physiol.*, 157, 405-411.
- Bowditch, M. ve Donaldson, R. 1990. Ascorbate Free-Radical Reduction by Glyoxysomal Membranes, *Plant Physiol.*, 94, 531-537.
- Bowler, C., Van Maontague, M. ve Inze, D., 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43, 83-116.
- Bray, E.A., 1997. Plants Responses to Water Deficit, *Trends Plants Sci.*, 2, 48-54.
- Brickell, C., 1989. *The Royal Horticultural Society Gardeners Encyclopedia of Plants and Flowers*, Dorling Kindersley, London.
- Brune, A., Urbach, W. ve Dietz, K.J. 1994. Zinc Stress Induces Changes in Apoplasmic Protein Content and Polypeptide Composition of Barley Primary Leaves, *J. Exp. Bot.*, 45, 1189-1196.
- Cakmak, I ve Marschner H., 1988. Zinc-Dependent Changes In ESR Signals, NADPH Oxidase and Plasma Membrane Permeability in Cotton Roots, *Physiol. Plant.*, 73, 182-186.

- Cakmak, I., Strbac, D. ve Marschner, H., 1993. Activities of Hydrogen Peroxide-Scavenging Enzymes in Germinating Wheat Seeds, J. Exp. Bot., 44, 127-132.
- Campbell, M.K., 1991. Biochemistry, Harcourt Brace Jovanovich College Publishers, Fort Worth, USA.
- Capaldi, D.J. ve Taylor K.E. 1983. A New Peroxidase Colour Reaction: Oxidative Coupling of 3-Methyl-2-Benzothiazolinone Hydrazone (MBTH) With Its Formaldehyde Azine Application to Glucose and Cholin Oxidase, Analyt. Biochem., 129, 329-336.
- Castillo, F.J., Miller P.R. ve Greppin, H., 1987. Extracellular Biochemical Markers of Photochemical Oxidant Air Pollution Damage to Norway Spruce, Experientia, 43, 111-115.
- Castillo, F.J ve Greppin, H., 1988. Extracelular Ascorbic Acid and Enzyme Activities Related to Ascorbic Acid Metabolism in *Sedum album* L. Leaves After Ozone Exposure, Environ. Exp. Botany., 28, 231-238.
- 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.
- Chaudiere, J. ve Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular Antioxidants from Chemical to Biochemical Mechanisms, Food Chem. Toxicol., 37, 949-962.
- Chen, G.X. ve Asada, K., 1989. Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurrence of Two Isozymes and the Differences in Their Enzymatic Properties, Plant Cell Physiol., 30, 987-998.
- Clarke, J.M., 1986. Effect of Leaf Rolling on Leaf Water Loss in *Triticum spp.*, Can. J. Plant Sci., 66, 885-891.
- Conklin, P.L., 2001. Recent Advances in the Role and Biosynthesis of Ascorbic Acid in Plants, Plant Cell Environ., 24, 383-394.
- Constantinides, S.M. ve Bedford, C.C., 1967. Multiple Forms of Polyphenol Oxidase, J. Food. Sci., 32, 446-450.
- Corlett, J.E., Jones, H.G., Massacci, A. ve Masodijidek, J., 1994. Water Deficit, Leaf Rolling and Susceptibility to Photoinhibition in Field Grown Sorghum, Physiol. Plant., 92, 423-430.
- Cram, W.J., 1999. Negative Feedback Regulation of Transporting Cells. The Maintenance of Turgor, Volume and Nutrient Supply, In: Encyclopedia of Plant The Cuticle, Lüttge, U., Pitman, M.G., Ed., Berlin, Germany, Springer, 284-316.
- Creissen, G., Edwards, E.A. ve Mullineaux, P.M., 1994. Glutathione Reductase and Ascorbate Peroxidase, In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants, Foyer, C.H., Ed., Mullineaux, P.M., CRC Press, Boca Raton, 343-364.

- Creissen, G., Broadbent, P., Stevens, R., Wellburn, A.R. ve Mullineaux, P.M., 1996. Manipulation of Glutathione Metabolism in Transgenic Plants, J. Biochem., 24, 465-472.
- Çırak, C. ve Esenal, E., 2006. Soyada Kuraklık Stresi, OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 21, 231-237.
- Dalton, D.A., Haras, F.J., Russell, S.A. ve Evans, H.J., 1987. Purification, Protection and Distribution of Ascorbate Peroxidase in Legumen Root Nodules, Plant Physiol., 83, 789-794.
- Dalton, D.A. 1995. Antioxidant Defences of Plants and Fungi, In: Oxidative Stress and Antioxidant Defences in Biology, Ahmad, S., Ed., Chapman Hall, New York, 298-355.
- Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H. ve Scott, I.M., 1998. Parallel Changes in H₂O₂ and Catalase During Thermotolerance Induced by Salicylic Acid or Heat Acclimation in Mustard Seedlings, Plant Physiol., 116, 1351-1357.
- Dat, J., Vandenaabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. ve Breusegem, F., 2000. Dual Action of the Active Oxygen Species During Plant Stress Responses, CMLS Cell Mol Life S., 57, 779-795.
- De Cabo, R.C, Gonzales-Reyes, J.A, Cordola, F ve Navas, P., 1996. Rooting Hastened in Onions by Ascorbate and Ascorbate Free Radical, J. Plant Growth Regul., 15, 53-56.
- De Gara, L., Tommasi, F., Liso, R. ve Arrigoni, O., 1991. Ascorbic Acid Utilization by Prolyl hydroxylase “in vivo”, Phytochem., 30, 1397-1399.
- De Gara, L. ve Tommasi, F. 1999. Ascorbate Redox Enzymes: A Network of Reactions Involved in Plant Development, Recent Dev. Phytochem., 3, 1-15.
- Diaz-Vivancos, P., Rubio, M., Mesonero, V., Periago, P.M., Ros, Barceló, A., Martínez-Gómez, P. ve Hernández, J. A., 2006. The Apoplastic Antioxidant System in *Prunus*: Response to Long-Term Plum Pox Virus Infection, J. Exp. Bot., 57, 3813-3824.
- Dietz, K.J., 1997. Functions and Responses of the Leaf Apoplast Under Stress, Prog. Bot., 58, 221-254.
- 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.
- Dingkuhn, M., Audebert A., Jones, M.P., Etienne, K. ve Sow, A., 1999. Control of Stomatal Conductance and Leaf Rolling in *O. sativa* and *O. glaberrima* Upland Rice, Field Crops Research, 61, 223-236.

- Edwards, E.A., Rawsthorne, S. ve Mullineaux, P.M., 1990. Subcellular Distribution of Multiple Forms of Glutathione Reductase in Leaves of Pea (*Pisum sativum* L), Planta, 180, 278-284.
- Edwards, E.A., Enard, C., Creissen, G.P. ve Mullineaux, P.M., 1994. Synthesis and Properties of Glutathione Reductase in Stressed Peas, Planta, 192, 137-143.
- 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.
- Ekanayake, I.J., De Data, 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, D.D. Davies, Ed., Academic Press, USA, 253-315.
- Elstner, E.F., 1991. Mechanisms of Oxygen Activation in Different Compartments of Plant Cell, In: Active Oxygen Species, Oxidative Stress and Plant Metabolism, Pell, E.J., Steffen, K.L., Ed., The American Society of Plant Physiologists, Rockville, M.D, 13-25.
- Elstner, E.F. ve Osswald, W., 1994. Mechanisms of Oxygen Activation During Plant Stress, Proceedings of the Royal Soc. Edinburg, 103, 131-154.
- Espin, J.C., Trujano, M.F., Tudelo, J. ve Garcia-Canovas, F., 1995. Monophenolase Activity of Polyphenol Oxidase from Haas Avacado, J. Agaric. Food Chem., 45, 1091-1096.
- Fazeli, F., Ghorbanlı, M. ve Niknam, V., 2007. Effect of Drought on Biomass, Protein Content, Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Two Sesame Cultivars, Biol. Plant., 51, 98-103.
- Felle, H.H. ve Hanstein, S., 2002. The Apoplastic pH of the Substomal Cavity of *Vicia faba* Leaves and Its Regulation Responding to Different Stress Factors, J. Exp. Botany, 53, 73-82.
- Feierabend, J., Schaan, C. ve Hertwig, B., 1992. Photoinactivation of Catalase Occurs Under Both High and Low Temperature Stress Conditions and Accompanies Photoinhibition of Photosystem II, Plant Physiol., 100, 1554-1561.
- Feng, Y.L., Cao, K.F. ve Feng, Z.L., 2002. Thermal Dissipation, Leaf Rolling and Inactivation of PS II 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.

- Foster, J.G. ve Hess, J.L., 1982. Oxygen Effects on Maize Leaf Superoxide Dismutase and Glutathione Reductase, Phytochem., 21, 1527-1532.
- Foyer, C.H. ve Halliwell, B., 1976. Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplast: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism, Planta, 133, 21-25.
- Foyer, C.H., 1993. Ascorbic Acid, In: Antioxidants in Higher Plants, Alscher, R.G., Hess, J.L., Ed., CRC Press, Boca Raton, 31-58.
- Foyer, C.H., Descouvieres, P. ve Kunert, K.J., 1994. Protection Against Oxygen Radicals: An Important Mechanism Studied in Transgenic Plants, Plant Cell Environ., 17, 507-523.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F. ve Scott, I.M., 1997. Hydrogen Peroxide and Glutathione Associated Mechanisms of Acclimatory Stress Tolerance and Signalling, Physiol. Plant., 100, 241-254.
- 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 Metabolims in Maize Leaves, Plant Physiol., 117, 283-292.
- Foyer, C.H. ve Noctor, G., 2000. Oxygen Processing in Photosynthesis: Regulation and Signalling, New Phytol., 146, 359-388.
- Foyer, C.H., Theodoulov, F.L. ve Delrot, S., 2001. The Functions of Inter- and Intracellular Glutathione Transport Systems in Plants, Trends Plant Sci., 6, 486-492.
- Frahry, G. ve Schopfer, P., 2001. NADH-Stimulated, Cyanide-Resistant Superoxide Production in Maize Coleoptiles Analyzed With A Tetrazolium-Based Assay, Planta., 212, 175-183.
- Fridovich, L., 1986. Biological Effect of Superoxide Radical, Arch. Biochem. Biophys., 247, 1-11.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases, Annu. Rev. Biochem., 64, 97-112.
- Fu, J. ve Huang, B., 2001. Involvement of Antioxidants and Lipid Peroxidation in the Adaptation of Two Cool-Season Grasses to Localized Drought Stress, Environ. 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.
- Gao, D., Knight, M.R., Trewaves, A.J., Sattelmacher, B. ve Plieth, C., 2004. Self-Reporting *Arabidopsis* Expressing pH and [Ca²⁺] Indicators Unveil Ion Dynamics in the Cytoplasm and in the Apoplast Under Abiotic Stress, Plant Physiol., 134, 898-908.

- Gaspar, T., Penel, C., Hagege, D. ve Greppin, H., 1991. Peroxidases in Plant Growth Differentiation and Development Processes, Univ. M. Curie-Sklodowska, Lublin, Poland and Univ., Geneva, Switzerland.
- Giorio, P., Sorrentino, G. ve d'Andria, R., 1999. Stomatal Behaviour, Leaf Water Status and Photosynthetic Response in Field-Grown Olive Tress Under Water Deficit, Environ. Exp. Bot., 42, 95-104.
- Gonzalez-Reyes, J.A., Hidalgo, A., Caler, J.A., Palos, R. ve Navas, P., 1994. Nutrient Uptake Changes in Ascorbate Free Radical-Stimulated Onion Roots, Plant Physiol., 104, 271-276.
- Gözükara, E.M., 1997. Biyokimya, Evin Matbaası, İstanbul.
- Griffith, O.W., 1980. Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine, Analyt. Biochem., 106, 207-212.
- Griffith, M., Ala, P., Yang, D.S.C., Hon, W., ve Moffat, B., 1992. Antifreeze Protein Produced Endogenously in Winter Rye Leaves, Plant Physiol., 100, 593-596.
- Grignon, C. ve Sentenac, H., 1991. pH and Ionic Conditions in the Apoplast, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 42, 103-128.
- Hale, M.G., ve Orcutt, D.M., 1987. The Physiology of Under Stress, John Wiley and Sons, New York, USA.
- Halliwell, B., 1984. Toxic Effects of Oxigen on Plant Tissues, In: Chloroplast Metabolism, The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells, Halliwell, B., Ed., Oxford Press, Oxford, 180-206.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., 1989. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford, Clarendon Press.
- 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.
- 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.
- Hausladen, A. ve Alscher, R.G., 1993. Glutathione, In: Antioxidants in Higher Plants, Alscher, R.G., Hess, J.L., Ed., CRC Press, Boca Raton, 1-30.
- Heath, R. L., 1988. Biochemical Mechanisms of Pollutant Stress. In: Assessment of Crop Loss from Air Pollutants, Hech, W.W., Taylor, O.C., Tinget, D.T., Ed., Elsevier Applied Science, London, 259-286.
- 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.

- Henzler, T. ve Steudel, E., 2000. Transport and Metabolic Degradation of Hydrogen Peroxide in *Chara corallina*: Model Calculations and Measurements With the Pressure Probe Suggest Transport of H₂O₂ Across Water Channels, J. Exp. Bot., 51, 2053-206.
- Hernandez, J.A., Ferrer, A.M., Jimenez, A., Barcelo, A.R., ve Sevilla, F., 2001. Antioxidant Systems and O₂⁻/H₂O₂ Production in the Apoplast of Pea Leaves. Its Relation With Salt-Induced Necrotic Lesion in Minor Veins, Plant Physiol., 127, 817-831.
- Heywood, V.H., 1978, Flowering Plants of the World, Oxford University Press, Oxford.
- Horemans, N., Foyer, H.C., Potters, G. ve Asard, H., 2000. Ascorbate Function and Associated Transport Systems in Plants, Plant Physiol. Biochem., 38, 531-540.
- Hopkins, W.G., 1995. Introduction to Plant Physiology, The University of Western Ontario, John Wiley and Sons Inc., 423-443.
- Hossain, M.A ve Asada K., 1984. Purification of Dehydroascorbate Reductase from Spinach and Its Characterization As A Thiol Enzyme, Plant Cell Physiol., 25, 85-92.
- Hossain M.A, Nakano Y ve Asada, K., 1984. Monodehydroascorbate Reductase in Spinach Chloroplasts and Its Participation in Regeneration of Ascorbate For Scavenging Hydrogen Peroxide, Plant Cell Physiol., 25, 385-395.
- 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.
- Husted, S. ve Schjoerring, .K., 1995. Apoplastic pH and Ammonium Concentration in Leaves of *Brassica napus* L., Plant. Physiol., 109, 1453-1460.
- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W. ve Sacher-Diaz, M., 1992. Alfalfa Leaf Senescence Induced by Drought Stress: Photosynthesis, Hydrogen Peroxide Metabolism, Lipid Peroxidation and Etylene Evolution, Physiol. Plant., 84, 67-72.
- Jiang, Z.Y., Woolland, A.S.C. ve Wolff, S.F., 1990. Hydrogen Peroxide Production During Experimental Protein Glycation, FEBS Lett., 268, 69-71.
- Jimenez, A., Hernandez, J.A., del Rio ve Sevilla, F., 1997. Reactive Oxygen Intermediates in Plant-Microbe Interactions: Who is Who in Powdery Mildew Resistance? Planta, 216, 891-902.
- Jones, H.G., 1979. Visual Estimation of Plant Water Status in Cereals, J. Agric. Sci., 92, 83-89.
- Jones, H.G., 1992. Plants and Microclimate, Cambridge University Press, Cambridge.
- Jung, S., 2004. Variation in Antioxidant Metabolism of Young and Mature Leaves of *Arabidopsis thaliana* Subjected to Drought, Plant Sci., 166, 459-466.

- 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.
- Kadioğlu, A. ve Terzi, R., 2007. A Dehydration Avoidance Mechanism: Leaf Rolling, The Bot. Review., 73. 290-302.
- Kalefetoğlu, T. ve Ekmekçi, Y., 2005. The Effects of Drought on Plants and Tolerance Mechanisms, G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 18, 723-740.
- 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.
- Kaplan, J.C. ve Beutler, E., 1967. Electrophoresis of Red Cell NADH- and NADPH-Diaphorases in Normal Subjects and Patients With Congenital Methemoglobinemia, Biochem. Biophys. Res. Commun., 23, 605-610.
- Karlsson, M., Melzer, M., Prokhorenko, I., Johansson, T., Wingsle, G., 2005. Hydrogen Peroxide and Expression of Hipi-Superoxide Dismutase are Associated With The Development of Secondary Cell Walls In *Zinnia elegans*, J. Exp. Bot., 56, 2085-2093.
- Kato, Y., Urano, J., Maki, Y. ve Ushimaru, T., 1997. Purification and Characterization of Dehydroascorbate Reductase from Rice, Plant Cell Physiol., 38, 173-178.
- Kessler, B., 1961. Nucleic Acids As Factors in Drought Resistance of Higher Plants, Recent Advan. Bot., 1153-1159.
- Kirchoff, B.K. ve Kennedy, H., 1985. Foliar, Nonstructural Nectaries in the Marantaceae, Can. J. Bot., 63, 1785-1788.
- Klapheck, S., 1988. Homoglutathione: Isolation, Quantification and Occurence in Legumens, Physiol. Plant., 74, 727-732.
- 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.
- Kocaçalışkan, I., 1986. Patateste Yumru Gelişim Sürecine Bağlı Olarak Bitki Hormonlarının Polifenol Oksidaz Enzimi ve Enzimatik Kararma Üzerine Etkisi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Erzurum.
- Kornberg, A., ve Horecker, B.L., 1955. Glucose-6-Fosphate Dehydrogenase. In: Methods in Enzymology, Colowick, S.P., Kaplan, N.O., Ed., New York, N.Y., USA, Academic Press, 363-368.
- Kow, Y.W., Smyth, D.A. and Gibbs, M., 1982a. Oxidation of Reduced Pyridine Nucleotide By A System Using Ascorbate and Hydrogen Peroxide from Plant and Algae, Plant. Physiol., 69, 72-76.

- Kow, Y.W., Smyth, D.A. and Gibbs, M., 1982b. Oxidation of NAD(P)H in A Constituted Spinach Chloroplast Preparation Using Ascorbate and Hydrogen Peroxide, Plant Physiol., 69, 740-741.
- Kozlowski, T.T. ve Pallardy, S.G., 1997. Physiology of Woody Plants, Academic Press, San Diego.
- Kramer, P.J., 1980. Water Relations in Plants, Academic Press, New York.
- Krebs, H.A. ve Eggleston, L.V., 1978. The Regulation of the Pentose Phosphate Cycle in Rat Liver. In: Advances Enzyme Regulation, Weber, G., Ed., Oxford Pergamon Press Ltd., 421-433.
- Kuwabara, T. ve Katoh, Y., 1999. Involvement of the Binuclear Copper Site in the Proteolytic Activity of Polyphenol Oxidase, Plant Cell Physiol., 40, 1029-1035.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T₄, Nature, 227, 680-685.
- Law, M.Y., Charles, S.A. ve Halliwell, B., 1983. Glutathione and Ascorbic Acid in Spinach (*Spinacia oleracea*) Chloroplasts, Biochem. J., 210, 899-903.
- Lawlor, D.W., 1983. Integration of Biochemical Processes in the Physiology of Water-Stressed Plants. In: Effects of Stress on Photosynthesis, R. Marelle, H. Clijsters, Ed., M., Van Poucke, London, Junk Publishers, 35-44.
- Lee, Y.B. ve Lee, S.M., 2000. Effect of S-Adenosylmethionine on Hepatic Injury from Sequential Cold and Warm Ischemia, Pharmacol. Res., 23, 495-500.
- Lee, B.R., Kim, K.Y., Jung, W.J., Avicé, J.C., Ourry, A. ve Kim, T.H., 2007. Peroxidases and Lignification in Relation to the Intensity of Water-Deficit Stress in White Clover (*Trifolium repens* L.), J. Exp. Bot., 13, 1-9.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. ve Lamb, C., 1994. H₂O₂ from the Oxidative Burst Orchestrates the Plant Hypersensitive Disease Resistance Response, Cell, 79, 583-593.
- Levy, H.R., 1979. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenases. In: Advances Enzymology, Meister, A., Ed., New York, John Wiley and Sons Inc. 97-191.
- Lewitt, J., 1972. Responses of Plants to Environmental Stresses, Academic Press, New York.
- Lewitt, J., 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses, Academic Press, New York.
- Li, L. ve Staden, J.V., 1998. Effects of Plant Growth Regulators on the Antioxidant System in Callus of Two Maize Cultivars Subjected to Water Stress, Plant Growth Regul., 24, 55-66.

- Lin, L.S. ve Varner, J.E., 1991. Expression of Ascorbic Acid Oxidase in Zucchini Squash (*Cucurbita pepo* L.), Plant Physiol., 96, 159-165.
- 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.
- Loewus, F.A. ve Loewus, M.W., 1987. Biosynthesis and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants, Crit. Rev. Plant Sci., 5, 101-119.
- Loewus, F.A., 1988. Ascorbic Acid and Its Metabolic Products. In: The Biochemistry of Plants, Press, J., Ed., Academic Press, New York, 85-107.
- 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.
- Luwe, M.W.F., Takahama, U. ve Heber, U., 1993. Role of Ascorbate in Detoxifying Ozone in the Apoplast of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Leaves, Plant Physiol., 101, 969-976.
- Luwe, M., 1996. Antioxidants in the Apoplast and Symplast of Beech (*Fagus sylvatica* L.) Leaves: Seasonal Variations and Responses to Changing Ozone Concentrations in Air, Plant Cell Environ., 19, 321-328.
- Lyons, T., Ollerenshaw, J. H., ve Barnes, J. D., 1999. Impacts of Ozone on *Plantago major*: Apoplastic and Symplastic Antioxidant Status, New Phytol., 141, 253-263.
- Lyons, T.M., Plochl, M., Turcsanyi, E ve Barnes, J.D., 2001. Extracellular Antioxidants: A Protective Sscreen Against Ozone. In: Environmental Pollution and Plant Responses, Agrawal, S.B., Agrawal, M., Ed., London, UK, Lewis Publisher, 183-194.
- Mann, C. ve Kleilil, D., 1938. Homocuprein and Heptacuprein, Copper Protein Compounds of Blood and Liver in Mammals, Proc. R. Soc., London, 126, 303-315.
- Marbach, I. ve Mayer, A.M., 1975. Changes in Carechol Oxidase and Permeability to Water in Seed Coats of *Pisum elatius* During Seed Development and Maturation, Plant Physiol., 56, 93-96.
- Markeis, P., 1974. Anthocyanins and Their Stability in Foods, Crit. Rev. Food Technol., 4, 11-20.
- Matthews, R.B., 1951. The Oxidation of Reduced Diphosphopyridine Nucleotide in Green Peas, J. Biol.Chem., 189, 695-704.
- 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.

- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Van Montagu, M., ve Inze, D., 1998. Glutathione Homeostasis in Plants: Implications for Environmental Sensing and Plant Development, J. Exp. Bot., 49, 649-667.
- Mayer, A.M., 1987. Polyphenol Oxidases in Plants. Recent Progress, Phytochem., 16, 11-20.
- McKersie, B.D. ve Lehsem, Y., 1994. Stress and Stress Coping in Cultivated Plants, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Medrano, H., Escalona, J. M., Bota, J., Gulias, J. ve Flexas, J., 2002. Regulation of Photosynthesis of C3 Plants in Response to Progressive Drought: Stomatal Conductance As a Reference Parameter, Ann. Bot., 89, 895-905.
- Mehdy, M.C., Sharma, Y.K., Sathasivan, K. ve Bays, N.W., 1996. The Role of Activated Oxygen Species in Plant Disease Resistance, Physiol. Plant., 98, 365-374.
- Mehlhorn, H., Cottam, D.A., Lucas, P. W. ve Wellburn, A.R., 1987. Induction of Ascorbate Peroxidase and Glutathione Reductase Activities by Interactions of Mixtures of Air Pollutants, Free Radical Res. Commun., 3, 193-197.
- Mehlhorn, H., Lelandais, M, Korth, H.G. ve Foyer, C.H., 1996. Comparison of Ascorbate-Dependent Peroxidase Activity in Horseradish Peroxidase Types I and II and in Leaf Extracts, FEBS Letts., 378, 203-206.
- Mehta, A., Mason, P.J. ve Vulliamy, T.J., 2000. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency, Bailliers Best. Pract. Res. Clin. Haematol. Mar., 13, 21-38.
- Meister A., 1983. Selective Modification of Glutathione Metabolism, Science., 220, 472-477.
- Meister, A., 1988. Glutathione Metabolism and Its Selective Modification, J. Biol. Chem., 263, 17205-17208.
- Meldrum, N.U. ve Tarr, H.L.A., 1935. The Reduction of Glutathione by the Warburg Christian System, Biochem. J., 29, 108-115.
- Mishra, N.P., Mishra, R.K. ve Singhal, G.S., 1993. Changes in the Activities of Antioxidant Enzymes during Exposure of Intact Wheat Leaves to Strong Visible Light at Different Temperatures in the Presence of Protein Synthesis Inhibitors, Plant Physiol., 102, 903-910.
- Miyake, C. ve Asada, K., 1992. Tylakoid Bound Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts and Photoreduction of Its Primary Oxidation Product Monodehydroascorbate Radicals in the Tylakoids, Plant Cell Physiol., 33, 541-553.
- Miyake, C. ve Asada, K., 1996. Inactivation Mechanism of Ascobate Peroxidase at Low Concentrations of Ascorbate, Hydrogen Peroxide Decomposes Compound I of Ascorbate Peroxidase, Plant Cell Physiol., 37, 423-430.

- Mittler, R., 2002. Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance, Trends Plant Sci., 7, 405-410.
- Mundree, S.G., Baker, B., Mowla, S., Peters, S., Marais, S., Willigen, C.V., Govender, K., Maredza, A., Muyanga, S., Farrant, J.M. ve Thomson, J.A., 2002. Physiological and Molecular Insights into Drought Tolerance, Afr. J. Biotechnol., 1, 23-38.
- Nakano, Y., ve Asada, Y., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, Plant Cell Physiol., 22, 867-880.
- Nakano, Y., ve Asada, Y., 1987. Purification of Ascorbate Peroxidase from Spinach Chloroplasts: Its Inactivation in Ascorbat Depleted Medium and Reactivation by Monodehydroascorbate Radical, Plant Cell Physiol., 28, 131-135.
- Nishiyama, Y. Ikeda, H. ve Haramaki, N., 1998. Oxidative Stress is Related to Excercise in Tolerance in Patients With Heart Failure, Am. Heart. J., 135, 115.
- Noctor, G ve Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and Glutathione, Keeping Active Oxygen Under Control, Ann. Review of Plant Physiol. Plant Mol. Biology, 49, 249-279.
- Ogawa, K., Kanematsu, S ve Asada, K., 1997. Generation of Superoxide Anion and Localization of Cu-Zn Superoxide Dismutase in the Vascular Tissue of Spinach Hypocotyls: Their Association With Lignification, Plant Cell Physiol., 38, 1118-1126.
- Oppenheimer, H.R., 1960. Plant Water Relationships in Arid and Semi-Arid Conditions, UNESCO, UK., 105-138.
- O'Toole, J.C., Ozbun, J.L. ve Wallace, D.H., 1977. Phosynthetic Responce to Water Stress in *Phaseolus vulgaris*, Physiol. Plant., 40, 111-114.
- O'Toole, J.C.ve Cruz, R.T., 1980. Response of Leaf Water Potential, Stomatal-Resistance, and Leaf Rolling to Water-Stress, Plant Physiol., 65: 428-432.
- Padu, E, Moldau, H., and Kollist, H., 1999. The Effect of Ozone on Antioxidantive Reactions in Apoplast and Symplast of Barley Leaves, Plant Peroxidase Newslett., 133-138.
- Padurariu, C., Harovitz, T., Paltineau, R. ve Negomi, V., 1969. On the Relationship Between Soil Moisture and Osmotic Potential in Maize and Sugar Beet Plants, Physiol. Plantarum., 22, 850-860.
- 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 Senecence, Physiol. Plant., 87, 227-231.

- Patykowski, J ve Urbanek, H., 2003. Activity Of Enzymes Related to H₂O₂ Generation and Metabolism in Leaf Apoplastic Fraction of Tomato Leaves Infected With *Botrytis Cinerea*, J. Phytopathol., 151, 153-161.
- Pennypacker, B.W., Leath, K.L., Stout, W.L. ve Hill, R.R., 1990. Technique for Simulating Field Drought Stress in Greenhouse, Agron. J., 82, 951-957.
- Pilon-Smits, E.A.H., Zhu, Y.L., Sears, T. ve Terry, N., 2000. Overexpression of Glutathione Reductase in *Brassica juncea*: Effects of Cadmium Accumulation and Tolerance, Physiol. Plant., 110, 455-460.
- Pinheiro, H.A., DaMatta, F.M., Chaves, A.R.M., Fontes, E.P.B. ve Loureiro, M.E., 2004. Drought Tolerance in Relation to Protection Against Oxidative Stress in Clones of *Coffea canephora* Subjected to Long-Term Drought, Plant Sci., 167, 1307-1314.
- Piqueras, A., Olmos, E., Martinez-Solano, J.R. ve Hellin, E., 1999. Cd-Induced Oxidative Burst in Tobacco BY2 Cells: Time Course, Subcellular Location and Antioxidant Response, Free. Radic. Res., 31, 533-538.
- Pitcher, L.H., Brennan, E., Hurley, A., Dunsmuir, P., Tepperman, J.M. ve Zilinskas, B.A., 1991. Overproduction of Petunia Copper/Zinc Superoxide Dismutase Does Not Confer Ozone Tolerance in Transgenic Tobacco, Plant Physiol., 97, 452-455.
- Polle, A., Chakrabarti, K., Schurmann, W ve Rennenberg, H., 1990. Composition and Properties of Hydrogen Peroxide Decomposing Systems in Extracellular and Total Extracts from Needles of Norway Spruce (*Picea Abies* L., Karst.), Plant Physiol., 94: 312-319.
- Premachandra, G.S., Saneoka, H., Fujita, K. ve Ogata, S., 1992. Osmotic Adjustment and Stomatal Response to Water Deficits in Maize, J. Exp. Botany., 43, 1451-1456.
- 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., Lucas, P.W. ve Lea, P.J., 1990. Age Dependent Damage and Glutathione Metabolism in Ozone Fumigated Barley: A Leaf Section Approach, J.Exp.Bot., 40, 1309-1317.
- Ramachandra Reddy, A., Chaitanya, K.V., Jutur, P.P. ve Sumithra, K., 2004. Differential Antioxidative Responses to Water Stress Among Five Mulberry (*Morus alba* L.) Cultivars, Environ. Exp. Bot., 52, 33-42.
- Ramanjulu, S., Kaiser, W.M. ve Dietz, K.J., 1999. Salt and Drought Stress Differentially Affect the Accumulation of Extracellular Proteins in Barley, Z. Nat. 54, 337-347.
- Ranieri, A., D'Urso, G., Nali, C., Lorenzini, G. ve Soldatini, G.F., 1996. Ozone Stimulates Apoplastic Antioxidant Systems in Pumpkin Leaves, Physiol. Plant., 97, 381-387.

- Ranieri, A., Castagna, A., Baldan, B ve Soldatini, G.F., 2001. Iron Deficiency Differently Affects Peroxidase Isoforms in Sunflower, J. Exp. Bot., 52, 25-35.
- Rautenkranz, A.A.F., Li, L., Machler, F., Martinoia, E. ve Oertli, J.J., 1994. Transport of Ascorbic and Dehydroascorbic Acid Across Protoplast and Vacuole Membranes Isolated from Barley (*Hordeum vulgare* L. Cv Gerbel) Leaves, Plant Physiol., 106, 410-415.
- Rennenberg, G.H., 1982. Glutathione Metabolism and Possible Roles in Higher Plants. Phytochem., 21, 2771-2781.
- Rennenberg, H., ve Lamourex, G.L., 1990. Physiological Processes That Modulate The Concentration of Glutathione in Plant Cells. In: Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants, Fundamental Environmental and Agricultural Aspects, Rennenberg, H., Brunold, C., De Kok, L.J., Stulen, I., Ed., SPB Academic Publication., The Hague, 53-65.
- 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.
- Ros Barcelo, A., Munoz, R ve Sabater, F., 1987. Lupin Peroxidases: I. Isolation and Characterization of Cell Wall-Bound Isoperoxidase Activity, Physiol. Planta., 71, 448-454.
- Sagi, M ve Fluhr, R., 2006. Production of Reactive Oxygen Species by Plant NADPH Oxidases, Plant Physiol., 141, 336-340.
- Sairam, R.K., Deshmuk, P.S. ve Shukla, D.S., 1997. Tolerance of Drought and Temperature Stress in Relation to Increased Antioxidant Enzyme Activity in Wheat, J. Agron. Crop Sci., 178, 171-178.
- 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.
- Salin, M.L., 1988. Toxic Oxygen Species and Protective Systems of the Chloroplast, Pysiol. Plant., 72, 681-689.
- Salisbury, F.D. ve Ross, C.W., 1992. Plant Physiology, Wadsworth Publishing Co., California.
- Sano, S., Miyake, C., Mkami, M. ve Asada, K., 1995. Molecular Characterization Monodehydroascorbate Radical Reductase from Cucumber Highly Expressed in *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 270, 21354-21361.
- Sanchez, M, Queijeiro, E., Revilla, G ve Zarra, I., 1997. Changes in Ascorbic Acid Levels in Apoplastic Fluid During Growth Pine Hypocotyls. Effects on Peroxidase Activities Associated With Cell Walls, Physiol. Plant., 101, 815-820.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutase, Plant Physiol., 101,7-12.

- Schirmer, R.H., Krauth-Siegel, R.L. ve Schulz, G.E., 1989. Glutathione Reductase, In: Glutathione, Chemical, Biochemical and Medical Aspects, Coenzymes and Cofactors, Dolpin et. al., Ed., Wiley, New York, 187-242.
- Schupp, R., Schatten, T., Willenbrink, J. ve Rennenberg, H., 1992. Long Distance Transport of Reduced Sulphur in Spruce (*Picea abies* L.), J. Exp. Bot., 43, 1243-1250.
- Schulze, E.D., Turner, N.C., Gollan, T ve Shackel, K.A., 1987. Stomatal Responses to Air Humidity and to Soil Drought. In: Stomatal Function, Zeiger, Z., Farquhar, G.D., Cowan, I.R., Ed., Stanford University Press, CA, 311-321.
- Scott, W.A., 1975. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Neurospora crassa*, Methods Enzymol., 41, 177-182.
- Schraudner, M., Moeder, W., Wiese, C., Van Camp, W., Inze, D., Langebartels, C. ve Sandermann, H.J., 1998. Ozone-Induced Plant Tobacco Bel W3, Plant J., 16, 235-245.
- 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.
- Selote, D.S. ve Chopra, R.K., 2006. Drought Acclimation Confers Oxidative Stress Tolerance by Inducing Co-Ordinated Antioxidant Defense at Cellular and Subcellular Level in Leaves of Wheat Seedlings, Physiol. Plant., 127, 494-506.
- 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., Pinzino, C, ve Navari-Izzo, F., 1996. Sunflower Seedlings Subjected to Increasing Water Stress by Water Deficit: Changes in O₂⁻ Production Related to the Composition of Thylakoid Membranes, Physiol. Plant., 96, 446-452.
- 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.
- Sharma, P. ve Dubey, R.S., 2005. Drought Induced Oxidative Stress and Enhances The Activities of Antioxidant Enzymes in Growing Rice Seedlings, Plant Growth Regul., 46, 209-221.
- Shaw, B., Thomas, T.H ve Cooke, D.T., 2002. Responses of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) to Drought and Nutrient Deficiency Stress, Plant Growth Regul., 37, 77-83.
- Siddique, M.R.B., Hamid, A. ve Islam, M.S., 2000. Drought Stress Effects on Water Relations of Wheat, Bot.Bull. Acad. Sin., 41, 35-39.
- Singh, B.N. ve Mackill, D.J., 1977, Genetics of Leaf Rolling Under Drought Stress, Manila, IRRI.

- Singh, M., Srivastava, J.P. ve Kumar, A., 1990. Effect of Water Potential Components in Wheat Genotypes, Indian J. Plant Physiol., 33, 312-317.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S. ve Miszalski, Z., 2007. The Role of Hydrogen Peroxide in Regulation of Plant Metabolism and Cellular Signalling in Response to Environmental Stresses, Acta Biochim. Pol., 54, 39-50.
- 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., 1993. The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation, New Phytol., 125, 27-58.
- Smirnoff, N., 1996. The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants, Ann. Bot., 70, 661-669.
- Smirnoff, N ve Pallanca, J.E., 1996. Ascorbate Metabolism in Relation to Oxidative Stress, Biochem. Soc. T., 24, 472-478.
- Smirnoff, N., 1998. Plant Resistance to Environmental Stresses, Curr. Opin. Biotechnol., 9, 214-219.
- Smith, I.K., Kendall, A.C., Keys, A.J., Turner, J.C. ve Lea, P.J., 1985. The Regulation of the Biosynthesis of Glutathione in Leaves of Barley (*Hordeum vulgare* L.), Plant Sci., 41, 11-17.
- Sofa, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. ve Masia, A., 2005. Antioxidant Defences in Olive Trees During Drought Stress: Changes in Activity of Some Antioxidant Enzymes, Func. Plant Biology, 32, 45-53.
- Souza, I.R.P. ve McAdam, J.W., 2001. Gibberellic Acid Dwarfism Effects on the Growth Dynamics of b73 Maize (*Zea mays* L.) Leaf Blades: A Transient Increase in Apoplastic Peroxidase Activity Precedes Cessation of Cell Elongation, J. Exp. Bot., 52, 1673-1682.
- Speer, M. ve Kaiser, W.M., 1994. Replacement of Nitrate by Ammonium As the Nitrogen Source Increases the Salt Sensitivity of Pea Plants. II. Inter and Intracellular Solute Compartmentation in Leaflets, Plant Cell Environ., 17, 1223-1231.
- Speer, M., Brune, A. ve Kaiser, W.M., 1994. Replacement of Nitrate by Ammonium As the Nitrogen Source Increases the Salt Sensitivity of Pea Plants. I. Ion Concentrations in Roots and Leaves, Plant Cell Environ., 17, 1215-1221.
- Srivalli, B., Sharma, G. ve Khanna-Chopra, R., 2003. Antioxidative Defences System in Upland Rice Cultivar Subjected to Increasing Intensity of Water Stress Followed by Recovery, Physiol. Plant., 119, 503-512.
- Stahl, W. ve Sies, H., 2002. Introduction: Reactive Oxygen Species, Research Monographs, 1-2.

- Streb, P., Michael-Knauf, A. ve Feierabend, J., 1993. Preferential Photoinactivation of Catalase and Photoinhibition of Photosystem II are Common Early Symptoms under Various Osmotic and Chemical Stress Conditions, Physiol. Plant., 88, 590-598.
- Street, H.E. ve Öpik, H., 1984. The Physiology of Flowering Plants: Their Growth and Development, Third Edition, Baltimore.
- Takahama, U ve Oniki, G., 1992. Regulation of Peroxidases Dependent Oxidation of Phenolics in The Apoplast of Spinach Leaves by Ascorbate, Plant Cell Physiol., 33, 379-387.
- Takahama, U. ve Oniki, T., 1994. The Association of Ascorbate and Ascorbate Oxidase in the Apoplast with IAA-Enhanced Elongation of Epicotyls from *Vigna angularis*, Plant Cell Physiol., 35, 257-266.
- Takahama, U., 1996. Effects of Fusicoccin and Indole-3-Acetic Acid on the Level of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in the Apoplast During Elongation of Epicotyl Segments of *Vigna angularis*, Physiol. Plant., 98, 731-736.
- Takahama, U., 1998. Ascorbic Acid-Dependent Regulation of Redox Levels of Chlorogenic Acid and Its Isomers in the Apoplast of Leaves of *Nicotiana tabacum* L., Plant Cell Physiol., 39, 681-689.
- Tambussi, E.A., Bartoli, C.G., Beltrano, J., Guamet, J.J., ve Araus, J.L., 2000. Oxidative Damage to Tylakoid Proteins in Water-Stressed Leaves of Wheat (*Triticum aestivum*), Physiol. Plant., 108, 398-404.
- Tanaka, K., 1994. Tolerance to Herbicides and Air Pollutants. In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants, Foyer, C.H., Mullineaux, P.M., Ed., CRC Press, Boca Raton, 365-378.
- Tandoğan, B., 2004. Kuzu Böbrek Korteksinden Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenazın Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin Saptanması, Haccettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Taşgın, E., Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B. ve Popova, L.P., 2006. Effects of Saliysilic Acid and Cold Treatments on Protein Levels and on the Activities of Antioxidant Enzymes in the Apoplast of Winter Wheat Leaves, Pytochem., 67, 710-715.
- Terzi, R., 2005. *Ctenanthe setosa*'da Yaprak Kıvrılma Mekanizmasının Araştırılması, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Terzi, R. ve Kadioğlu, A., 2006. Drought Stress Tolerance and Antioxidant Enzyme System in *Ctenanthe setosa*, Acta Biol. Cracov. Ser. Bot., 48, 89-96.
- Thipyapong, P., Stout, M. ve Attajarusit, J., 2007. Functional Analysis of Polyphenol Oxidases by Antisense/Sense Technology, Molecules, 12, 1569-1595.
- Tomos, A.D. ve Leigh, R.A., 1999. The pressure Probe: A Versatile Tool in Plant Cell Physiology, Ann. Review Plant Physiol., 50, 447-472.

- 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.
- Tyystjarvi, E., Riikonen, M., Arisi, A.C.M, Kettunen, R., Jouanin, L. ve Foyer, C.H., 1999. Photoinhibition of Photosystem II in Tobacco Plants Overexpressing Glutathione Reductase and Poplars Overexpressing Superoxide Dismutase, Plant Physiol., 105, 405-416.
- Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E. ve Herka, K., 1991. Elicitation of Defense Responses in Bean Leave By *Botrytis cinerea* Polygalacturanase, Acta Physiol. Plant., 13, 43-50.
- Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol Oxidases and Peroxidase in Fruits and Vegetables, CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 15, 49-127.
- Vanacker, H., Carver, T.L.W., ve Foyer, C.H., 1998a. Pathogen-Induced Changes in the Antioxidant Status of the Apoplast in Barley Leaves, Plant Physiol., 117, 1103-1114.
- Vanacker, H., Harbinson, J., Ruisch, J., Carver, T.L.W. ve Foyer, C.H., 1998b. Antioxidant Defences of the Apoplast, Protoplasma, 205, 129-140.
- Vionella, A. ve Macri, F., 1991. Generation of Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide at Surface of Plant, Cell. J. Bioenerg. Biomemb., 23, 409-423.
- Von Willert, D.J., Matyssek, R. ve Herppich, W., 1995. Experimentelle Pflzenoekologie Grundlagen und Anwendungen, Geor Theme Verlag, Stuttgart, 344.
- Wells, W.W., Xu, D.P., Yang, Y. ve Rocque, P.A., 1990. Mammalian Thioltransferase (Glutaredoxin) and Protein Disulfide Isomerase Have Dehydroascorbate Reductase Activity, J. Biol. Chem., 265, 15361-12364.
- 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.
- Wilkinson, S. ve Davies, W., 1997. Xylem Sap pH Increase: A Drought Signal Received at the Apoplastic Face of the Guard Cell That Involves the Suppression of Saturable Abscisic Acid Uptake by the Epidermal Symplast, Plant Physiol., 113, 559-573.
- Wingate, V.P.M., Lawton, M.A. ve Lamb, C.J., 1988. Glutathione Causes A Massive and Selective Induction of Plant Defense Genes, Plant Physiol., 87, 206-210.

- Winter, H., Robinson, D.G. ve Heldt. H.W. 1993. Subcellular Volumes and Metabolite Concentrations in Barley Leaves, Planta, 191, 180-190.
- Wood, T., 1986. Distribution of the Pentose Phosphate Pathway in Living Organisms, Cell Biochem. Funch., 4, 235-240.
- Woodbury, W., Spencer, A.K. ve Stahmann, M.A., 1971. An Improved Procedure Using Ferricyanide for Detecting Catalase Isoenzymes, Anal.Biochem., 44, 301-305.
- 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.
- Yamamuchi, N., Yamawaki, K. ve Ueda, Y., 1984. Subcellular Localization of Redox Enzymes Involving Ascorbic Acid in Cucumber Fruit, J. Jpn. Soc. Horti. Sci., 53, 347-353.
- Youn, H., 2000. Molecular Analysis of Monodehydroascorbate Reductase and Dehydroascorbate Reductase in Plants, Texas Tech University, Doctor of Philosophy Thesis, United States.
- Zaheer, N., Tewari, K.K. ve Krishan, P.S., 1967. Mitochondrial Forms of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and 6-Phosphogluconic Acid Dehydrogenase in Rat Liver, Arch. Biochem. Biophys., 120, 22-34.
- Zeybek, N., ve Zeybek, U., 1994, Farmasotik Botanik, İkinci Baskı, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, İzmir, 53-54.
- Zhao, L., Chen, G. ve Zhang, C., 2001. Interaction Between Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Drought-Induced Abscisic Acid Synthesis in Root Tips of Wheat Seedlings, Aust. J. Plant Physiol., 28, 1055-1061.
- Zhang, J., Cui, S., Li, J ve Kirkham, M.B., 1995. Protoplasmic Factors, Antioxidant Responses, and Chilling Resistance in Maize, Plant Physiol. Biochem., 33, 567-575.
- Zhang, J. ve Kirkham, M.B., 1996. Antioxidant Responses to Drought in Sunflower and Sorghum Seedlings, New Phytol., 132, 361-373.
- Zheng, X., Van Huystee, R.B., 1992. Anionic Peroxidase Catalysed Ascorbic Acid and IAA Oxidation in the Presence of Hydrogen Peroxide: A Defence System Against Peroxidative Stress in Peanut Plant, Phytochem., 31, 1895-1898.
- Zheng, H.Z., Cui, C.L. Zhang, Y.T., Wang, D., Jing, Y. ve Kim, K.Y., 2005. Active Changes of Lignification-Related Enzymes in Pepper Response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*, J. Zhejiang Uni. Sci., 6, 778-786.

ÖZGEÇMİŞ

07.09.1976 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 1994 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans öğreniminden 1998 yılında biyolog unvanı ile mezun oldu. Aynı yıl K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 1999 yılında K.T.Ü. Rize Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi oldu. 2002 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsünde doktora programına başladı. 2004 yılında Erasmus programı ile gittiği Hannover Üniversitesi (Almanya)'nde 6 ay süreyle öğrenim gördü. Şu anda Rize Üniversitesi'nde öğretim elemanı olarak görevine devam etmektedir.