

ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MANGANIN, C₃ BİTKİSİ *Cleome spinosa* VE C₄
BİTKİSİ *Cleome gynandra*’ NİN FOTOSENTEZ
VERİMİ VE STOMA İLETKENLİĞİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

AHMET DİNÇ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.01.00

Sunuş Tarihi: 18.06.2012

Bornova-İZMİR

2012

Ahmet DİNÇ tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “Manganın, C₃ bitkisi *Cleome spinosa* ve C₄ bitkisi *Cleome gynandra*’ da Fotosentez Verimi ve Stoma İletkenliği Üzerine Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’ nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 18.06.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

.....

Raportör Üye: Yrd. Doç. Dr. Hediye SEKMEN

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Çağlar KARAKAYA

.....

ÖZET

MANGANIN, C₃ BİTKİSİ *Cleome spinosa* VE C₄ BİTKİSİ *Cleome gynandra*’ DA FOTOSENTEZ VERİMİ VE STOMA İLETKENLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

DİNÇ, Ahmet

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji A.B.D

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Haziran 2012, 75 sayfa

Farklı karboksilasyon yollarına sahip (C₃ ve C₄) türlerin Mangan (Mn) uygulamasına bağlı olarak fotosentez mekanizması, reaktif oksijen türleri (ROS), antioksidant sistem üzerine etkilerinin araştırılması ile ilgili çalışmalar literatürde sınırlıdır. Özellikle aynı cinse ait, karboksilasyon yolları farklı olan türler ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla *Cleome spinosa* ve *Cleome gynandra* farklı Mn konsantrasyonlarına (0, 10, 50, 100 µM) maruz bırakılmış; ROS oluşumu (H₂O₂ miktarı), antioksidant savunma sistemi (Süperoksit Dismutaz (SOD), Askorbat Peroksidaz (APX), Glutasyon Redüktaz (GR), Monodehidro Askorbat Redüktaz (MDHAR), Dehidro Askorbat Redüktaz (DHAR) enzimleri ile izoenzimleri) ve lipid peroksidasyonu karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. *C.gynandra*’nın Mn içeriğinin *C. spinosa*’ya göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Her iki bitkide Mn uygulamasına bağlı olarak 100 µM’da ölçülen tüm fotosentetik parametrelerde (Fotosentez Hızı (A), Stomatal İletkenlik (g_s), Fotokimyasal Olmayan Söndürme (NPQ), Elektron Transfer Oranı (ETR)) düşüş gözlenmiştir. Uygulanan Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak en yüksek SOD aktivitesinin görüldüğü 10 µM’a göre her iki bitkinin total SOD aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Ayrıca Uygulanan Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak H₂O₂, APX, DHAR ve MDHAR aktivitesinde düşüş belirlenmiştir. *C. spinosa*’da 100 µM Mn GR aktivitesinin artmasına, TBARS miktarında ise düşüşe neden olmuştur. *C. gynandra*’da ise GR aktivitesi azalırken, TBARS miktarı azalmıştır. Bu sonuçlar 100 µM Mn uygulamasının her iki bitkide de toksik düzeyde etki yaptığını ve metabolizmasını olumsuz etkilediğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: *Cleome gynandra*, *Cleome spinosa*, C₃ ve C₄, Antioksidant Enzimler, H₂O₂, Fotosentez.

ABSTRACT**EFFECT OF Mn ON YIELD OF PHOTOSYNTHESIS AND STOMATAL CONDUCTANCE OF *Cleome spinosa* (C₃) AND *Cleome gynandra* (C₄)**

DİNC, AHMET

MSc in Biology

Supervisor: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

June 2012, 75 pages

There are a few studies that investigate the effects of Manganese (Mn) treatment on plants which differ in carboxylation pathways, especially in the same genus. For this aim, different Mn concentrations (0, 10, 50, 100 µM) were applied to *C. spinosa* and *C. gynandra* and production of reactive oxygen species (ROS) (H₂O₂ production), antioxidant defence system (superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR) enzymes and isoenzymes) and lipid peroxidation were determined in all treatment groups. In this study, Mn *C. gynandra* accumulated more Mn as compared to *C. spinosa*. 100 µM Mn application negatively effected the all measured photosynthetic parameters (A, g_s, NPQ, ETR). Excess Mn accumulation also decreased the total activity of SOD, H₂O₂, GR, APX, DHAR and MDHAR and increased the content of TBARS. This results showed that 100 µM Mn application has toxic effects on the metabolism of *C. spinosa* and *C. gynandra*.

Keywords: *Cleome gynandra*, *Cleome spinosa*, C₃ ve C₄, Antioksidant Enzimler, H₂O₂, Fotosentez

TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim boyunca ve tez sürecimde engin bilgisini, deneyimini ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail TÜRKAN' a, tez dönemimde bilgisi, laboratuvar deneyimini, ve paylaşımcı tavrıyla beni cesaretlendiren, desteğini her zaman hissettiğim Sayın Yrd. Doç. Dr. A. Hediye SEKMEN ESEN'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım ve ders dönemimde engin bilgilerinden yararlandığım hocalarım Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR, Sayın Doç. Dr. Melike BOR ve Yrd. Doç. Dr. Çağlar KARAKAYA' ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen, her anımda yanımda olan, varlıkları ile mutluluk sebebi olan ilk başta Zehra Özgecan TANYOLAÇ' a daha sonra Yrd. Doç. Dr. Ceyda Özfidan' a, Uzm. Rengin ÖZGÜR'e, Uzm. Barış UZİLDAY' a, Tolga Yalçınkaya' ya, Pelin Yıldızoğlu' na, Esra Çancıoğlu' na, Burcu Çebi' ye ve Emel Özsoy' a teşekkür ederim.

Okul hayatımda dışında tüm varlığı ile desteğini her zaman hissettiğim, özellikle yüksek lisans eğitimim boyunca bir çok şeyi paylaştığım Senay Fatma DURMUŞ' a çok teşekkür ediyorum.

Öğrenim yaşamım boyunca beni her yönden destekleyen, eğitimimi herşeyden önde tutan, ve bu konuda verdiğim kararlarda arkamda duran, babam Mustafa, annem Döndü DİNÇ' e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
SEMBOLLER DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Fotosentez: Işık Reaksiyonları.....	2
1.1.1 Fotosentez'in gerçekleşmesini sağlayan yapılar	4
1.1.2 Fotosentez elektron taşınımı	5
1.2. Fotosentez: Karbon Reaksiyonları.....	10
1.2.1. Calvin döngüsü	10
1.2.2 Calvin döngüsünün düzenlenmesi	12
1.3 Bitkilerde Karbondioksit Yoğunlaştırma Mekanizmaları	14
1.3.1 C ₃ VE C ₄ karboksilasyon yollarının karşılaştırılması.....	15
1.3.2 <i>Cleome gynandra</i> ve <i>Cleome spinosa</i> 'nın fotosentetik özellikleri	18
1.4 Mn Eksikliği ve Toksisitesinin Oksidatif Strese Etkileri	19
1.4.1 Sinyal molekülü olarak ROS' lar	20
1.4.2. Sekonder stres olarak oksidatif stres.....	20
1.5 Organel Düzeyinde ROS Düzenlemesi	22
1.5.1. Kloroplast	22

İÇİNDEKİLER (devam)

1.5.2.	Peroksizom.....	23
1.5.3	Mitokondri	24
1.5.4	Apoplast	25
1.6.	Enzimatik Olmayan Antioksidant Savunma Sistemi	25
2.	MATERYAL METOD	28
2.1.	Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Deneme Deseni	28
2.1.1	Tohum temini.....	28
2.1.2	Tohum sterilizasyonu	28
2.1.3	Tohumların çimlendirilmesi.....	28
2.1.4	Büyüme koşulları ve Mn uygulamaları.....	29
2.2	Biyokimyasal Parametreler	30
2.2.1	H ₂ O ₂ miktarı.....	30
2.2.2	Antioksidant enzim ekstraksiyonu ve aktivite analizleri.....	30
2.2.3	Antioksidant enzimlerin izoenzim tayini	32
2.3	Fotosentetik Parametreler.....	33
2.4	Mn İçeriğinin Belirlenmesi.....	34
3	BULGULAR	35
3.1.	Mn içeriği.....	35
3.2	Fotosentetik Parametreler.....	36
3.2.1	Klorofil floresansı.....	36
3.2.2	Fotosentez oranı.....	36
3.2.3	Stomatal iletkenlik.....	38
3.2.4	Elektron transfer oranı.....	40
3.2.5	Fotokimyasal olmayan söndürme.....	41
3.3	Enzim ve İzoenzim Aktiviteleri.....	42

İÇİNDEKİLER (devam)

3.3.1	SOD aktivitesi ve izoenzimleri.....	42
3.3.2	APX aktivitesi.....	45
3.3.3	GR aktivitesi.....	45
3.3.4	MDHAR aktivitesi.....	46
3.3.5	DHAR aktivitesi.....	47
3.3.6	H ₂ O ₂ miktarı.....	48
3.3.7	Lipid peroksidasyonu.....	49
4	TARTIŞMA.....	51
5	SONUÇLAR.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil

Sayfa

1.1	Fotosentez sırasında enerji aktarımı (Taiz and Zeiger, 2010).....	3
1.2	Fotosentezin Z şeması.....	4
1.3	Tilakoyid zarların protein komplekslerinin düzenlenişi.....	5
1.4	Oksijen oluşturan fotosentetik organizmalar için ayrıntılı Z şeması.....	6
1.5	D1 ve D2 ile CP43 ve CP47 orta alt birimlerinin sarmal yerleşimi.....	7
1.6	Mn iyonları S durumu (Taiz and Zeiger, 2010).....	8
1.7	Debarboksilasyon tiplerine göre C ₄ reaksiyonları (Taiz and Zeiger, 2010' dan).....	17
1.8	<i>C. spinosa</i> (A,B) ve <i>C. gynandra</i> 'nın (C,D) damarlanmalarının ve yaprak enine kesitlerinin karşılaştırılması.....	19
1.9	Kloroplastlarda ROS düzenlenmesi (Mittler <i>et al.</i> , 2004).....	23
1.10	Peroksizomlarda ROS düzenlenmesi ((Mittler <i>et al.</i> , 2004)).....	24
1.11	Mitokondride ROS düzenlenmesi((Mittler <i>et al.</i> , 2004)).....	25
2.1	Petri kabında çimlendirilmiş <i>C. gynandra</i> tohumları.....	29
3.1	Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak <i>C.spinosa</i> ve <i>C. gynandra</i> bitkilerinde Mn içeriği.....	35
3.2	Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak <i>C.spinosa</i> ve <i>C. gynandra</i> bitkilerinde F _V /F _M miktarının değişimleri.....	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.3 Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak <i>C.spinosa</i> ve <i>C. gynandra</i> bitkilerinde net fotosentez hızında meydana gelen değişimler.....	37
3.4 Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak <i>C.spinosa</i> bitkisinin farklı ışık şiddetlerinde ki net fotosentez hızında meydana gelen değişimler.....	37
3.5 Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak <i>C.gynandra</i> bitkisinin farklı ışık şiddetlerinde ki fotosentez hızında meydana gelen değişimler.....	38
3.6 Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak <i>C.spinosa</i> ve <i>C. gynandra</i> bitkilerinde stomatal iletkenliklerinde meydana gelen değişimler.....	39
3.7 Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak <i>C. spinosa</i> bitkisinin fotosentez hızı ile stomatal iletkenliği arasındaki ilişki.....	39
3.8 Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak <i>C.gynandra</i> bitkisinin fotosentez hızı ile stomatal iletkenliği arasındaki ilişki.....	4 0
3.9 Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak <i>C.spinosa</i> ve <i>C. gynandra</i> bitkilerinde elektron taşınım oranlarında meydana gelen değişimler.....	41

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.10 Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak <i>C.spinosa</i> ve <i>C. gynandra</i> bitkilerinde fotokimyasal olmayan söndürme seviyelerinde meydana gelen değişimler.....	42
3.11 <i>C. gynandra</i> bitkisinin SOD izoenzimleri, ve bu izoenzimlerin aktivitesinin uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak değişimleri.....	43
3.12 <i>C. gynandra</i> bitkisinin SOD izoenzimleri, ve bu izoenzimlerin aktivitesinin uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak değişimleri.....	44
3.13 <i>C. spinosa</i> ve <i>C. gynandra</i> bitkilerinin SOD izoenzimleri, ve bu izoenzimlerin aktivitesinin uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak değişimleri.....	44
3.14 Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak <i>C.spinosa</i> ve <i>C. gynandra</i> bitkilerinde APX aktivitesinin değişimleri.....	45
3.15 Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak <i>C.spinosa</i> ve <i>C. gynandra</i> bitkilerinde GR aktivitesinin değişimleri.....	46
3.16 Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak <i>C.spinosa</i> ve <i>C. gynandra</i> bitkilerinde MDHAR aktivitesinin değişimler	47

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.17 Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağı olarak <i>C.spinosa</i> ve <i>C. gynandra</i> bitkilerinde DHAR aktivitesinin değişimleri.....	48
3.18 Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağı olarak <i>C.spinosa</i> ve <i>C. gynandra</i> bitkilerinde H ₂ O ₂ değişimleri.	49

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
APX	Askorbat peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfid
GR	Glutasyon Redüktaz
AsA	Askorbik asit
MDHA	Monodehidroaskorbik asit
DHA	Dehidroaskorbik asit
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
MDA	Malondialdehit
Mn	Mangan
NPQ	Fotokimyasal Olmayan Söndürme
ETR	Elektron Taşınım Oranı

SembollerAçıklama A

Fotosentez Hızı

 g_s

Stomatal İletkenlik

1. GİRİŞ

Mangan (Mn), bitkilerin büyümesi ve ürün vermesi için gerekli temel yapı taşlarından biridir ve bitkiler tarafından Mn^{2+} olarak emilir (Marshner, 1995). Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda Mn' nın varlığı metabolik süreçlere müdahale ederek bitkinin büyüme ve gelişmesini yavaşlatır (Lidon, 2001). Mangan, çeşitli bitki fonksiyonlarıyla da yakından ilişkilidir. Fotosentezle ilişkisinin haricinde ATP sentezinde (Pfeffer *et al.*, 1986), rubisko karboksilaz reaksiyonlarında (Houtz *et al.*, 1988) ve yağ asitleri ve protein sentezinde önemli roller üstlenmektedir (Constantopoulus, 1970). Mn, fotosentez ve farklı enzimlerin aktivasyonu ile yakından ilişkilidir. Mn eksikliği sonucunda hücre büyümesinin yavaşlaması ve verim azalması gibi olumsuzluklar görülebilir (Mukhopadhyay *et al.*, 1991). Bu durumdan bitkinin üst kısımları köklere nazaran daha fazla etkilenir. Ayrıca, bitki hücrelerinde Mn eksikliğinden en fazla etkilenen kısım kloroplastlardır. Bu yüzden fotosentez Mn eksikliğinden olumsuz etkilenmektedir.

Kering *et al.*, (2008)' e göre, farklı cinslere ait C_4 bitkilerinin demet kını hücrelerinde Mn bağımlı NAD malik enzim (NAD-ME) enzim aktivasyonunun artması sonucu fotosentez hızında arttığı belirlenmiştir. Ancak aynı cinsle ait C_3 ve C_4 bitkilerinin, uygulanan Mn konsantrasyonunda ki azalmaya veya artışa bağlı olarak fotosentetik parametrelerinde ne tür değişiklikler olduğu daha önce detaylı olarak çalışılmamıştır. Bu amaçla, Cleome cinsine ait *Cleome spinosa* (C_3) ve *Cleome gynandra* (C_4) türlerinin 0, 10, 50 ve 100 μM Mn uygulamasına verdiği yanıtlar karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Cleome cinsi Capparaceae familyasından Brassicaceae' nin kardeş taksonu olan alt familya Cleomoideae' den tek yıllık otsu bir bitkidir (Hall *et al.*, 2002). Bu genus aynı cins içinde hem C_3 hemde C_4 karboksilasyon yollarına sahip bitki türlerini barındırmaktadır. Cleome cinsinin bu özelliği C_3 ve C_4 mekanizmalarını karşılaştırmayı amaçlayan çalışmalarda kullanılmasına neden olmuştur.

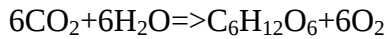
Bu özelliklere ek olarak Cleome genusu içinde *C. gynandra*, Arabidopsis' in filogenetik olarak en yakın C_4 akrabasıdır. *C. gynandra*' nın Arabidopsis ile gen dizileri benzerdir (Schrantz *et al.*, 2006). *C. gynandra* ve *C. spinosa* bitkilerinin

aynı cinse ait olması genetik altyapılarının benzer olmasını beraberinde getirmektedir. Bu nedenle, bu iki türün karşılaştırılmasıyla fotosentez mekanizmaları (C₃, C₄) arasındaki farkın ortaya konulması önemlidir. Ayrıca bu çalışmada, C₃ ve C₄ fotosentez mekanizması üzerine Mn' nın rolü de araştırılmıştır. Bu konuyla ilgili 2008 yılında farklı C₃ ve C₄ türlerinin kullanıldığı araştırmada farklı Mn konsantrasyonu uygulamalarının, fotosentez verimliliğini doğrudan etkilediği bilinen NADP malik (NADP.ME) (C₃ ve C₄) ve NAD.ME (C₄) enzimleri üzerinde farklı etkilere sahip olduğu bulunmuştur (Kering *et al.*, 2008).

Litaratürdeki bu çalışmalar göz önüne alındığında bu çalışmaların sadece farklı cinslere ait farklı karboksilasyon yollarına sahip C₃ ve C₄ türleri kullanılarak gerçekleştirildiği görülmektedir. Fakat aynı cinse ait farklı karboksilasyon yollarına sahip türler ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla; çalışmamızda, Mn' ın Cleome cinsine ait iki farklı karboksilasyon yoluna sahip iki türünün (*C. spinosa* ve *C. gynandra*) fotosentez verimi, ROS üretimi, antioksidant savunma sistemi üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

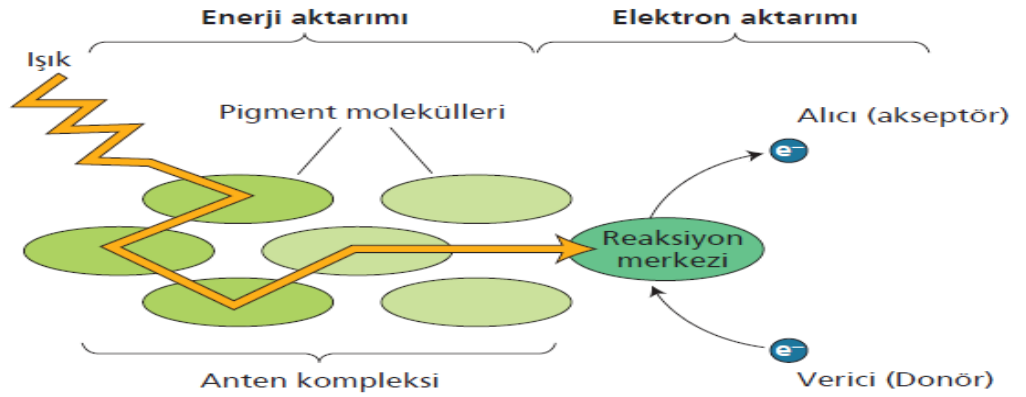
1.1. Fotosentez: Işık Reaksiyonları

Fotosentez, ışık enerjisini kullanabilen tek biyolojik olaydır. Fotosentez terimi kelime olarak “ışık kullanarak sentez” anlamına gelmektedir. Fotosentez de ışık enerjisi; su ve karbokdioksit kullanarak karbonhidratların sentezini sağlar, bu sırada oksijen açığa çıkar.



Yüksek bitkilerde fotosentezde en aktif doku yaprakların mezofil tabakasıdır. Mezofil hücreleri çok miktarda kloroplasta sahiptir. Fotosentezin gerçekleştiği yer kloroplastlardır. Kloroplastlar, fotosentezin gerçekleşmesi için gerekli ışığı soğuran klorofilleri içerir. Fotosentezde yer alan pigmentler, fotosentez için gerekli olan ışığı soğururlar. Bu pigmentlerin tümü kloroplastta bulunur. Klorofiller, fotosentetik organizmalardaki tipik pigmentlerdir fakat organizmalar, birden fazla pigmentin karşımında sahiptir. Klorofil *a* ve *b* yeşil bitkilerde, *c* ve *d* ise bazı protistlerde ve siyanobakterilerde bulunmaktadır.

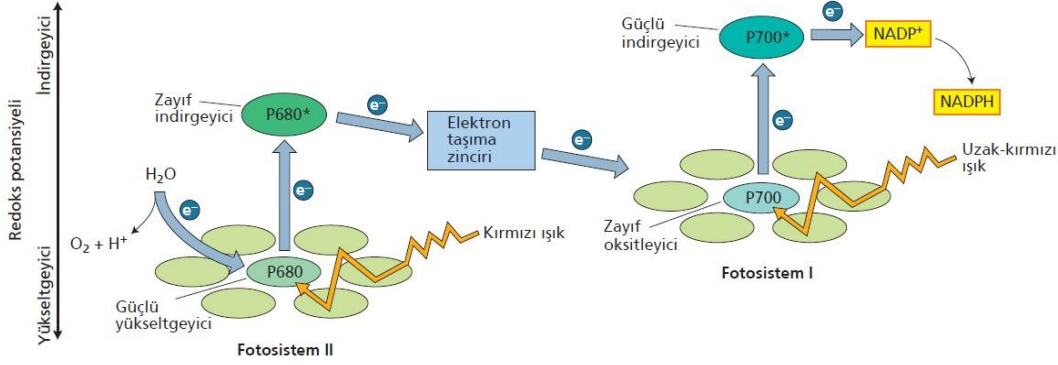
Karotenoidler, turuncu renkli pigmentlerdir ve fotosentez yapan tüm organizmalarda mevcuttur. Karotenoidler tarafından soğurulan ışık, fotosentez için klorofile aktarılır. Fotosentez, ışık toplayan antenler ve fotokimyasal reaksiyon merkezlerine sahip olan komplekslerde gerçekleşir. Bu kompleksler ışık toplar ve enerjiyi reaksiyon merkezi kompleksine aktarırlar. Anten sistemleri, ilişkide oldukları reaksiyon merkezlerine etkin bir biçimde enerji aktarma görevini üstlenmişlerdir (Grondelle *et al.*, 1994; Pullerits and Sundström, 1996). Işığın klorofilden reaksiyon merkezine, uyarılma enerjisinin fiziksel olarak aktarıldığı rezonans transferi ile gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Enerji, anten komplekslerinde çok etkin bir biçimde aktarılır, anten komplekleri tarafından soğurulan ışığın % 95-99'u fotokimyasal işlemlerde kullanılmak üzere reaksiyon merkezine aktarılır. Pek çok anten kompleksinin yapısı ortak özellik gösterir. Ökaryot organizmalarda en bol bulunan anten proteinleri, yapısal benzerlik gösteren büyük bir protein ailesinin üyeleridirler. Bu proteinlerin bazıları Fotosistem II (PS II) ile bütünleşmiş olup Işık Toplama Kompleksi I (LHCI), bazılarıda Fotosistem I ile bütünleşmiş olup Işık Toplama Kompleksi II (LHCII) olarak isimlendirilirler (Paulsen, 1995; Green and Durnford, 1996). LHC I proteini ile LHC II proteini yapısal benzerlikler göstermektedir. Ortak atasal bir proteinden köken aldıkları nerede ise kesinleşmiştir (Grosman *et al.* 1995; Green and Durnford, 1996).



Şekil 1.1: Fotosentez sırasında enerji aktarımı (Taiz and Zeiger, 2010).

Oksijen oluşturan organizmalar birbiri ile bağlantılı olarak çalışan iki fotosisteme sahiptir. PS I ve PS II olarak adlandırılırlar. Bu kompleksler fotosentezde enerjinin depolanmasını sağlayan başlangıç reaksiyonlarını gerçekleştirirler. PS I, 680 nm den uzun dalgaboylu uzak kırmızı ışığı, PS II ise

680 nm’deki kırmızı ışığı soğurur ve uzak-kırmızı ışıktaki çok az etkindir. PS I, nikotinamidadenin dinükleotid fosfatı (NADP^+) indirgeyebilen güçlü bir indirgeyici ve zayıf bir yükseltgeyici üretir. PS II ise suyu oksitleyebilen çok güçlü bir yükseltgeyici ve PS I tarafından üretilenden daha zayıf bir indirgeyici üretir.



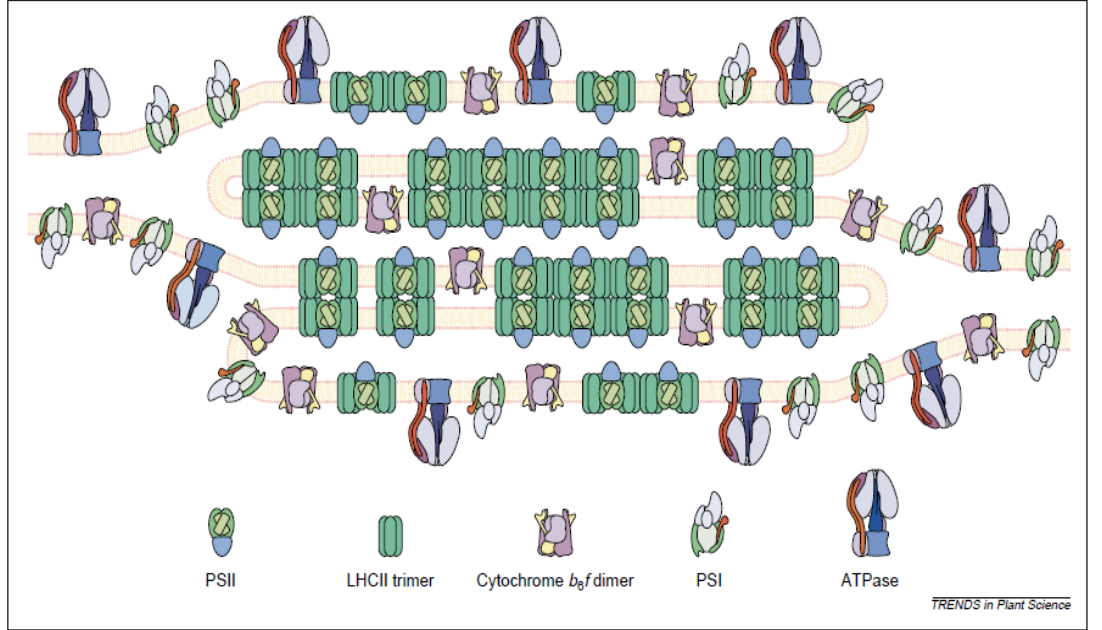
Şekil 1.2: Fotosentezin Z şeması. PSII tarafından soğurulan kırmızı ışık güçlü bir yükseltgeyici ve zayıf bir indirgeyici üretir. Uzak-kırmızı ışığı soğuran PSI zayıf bir yükseltgeyici ve güçlü bir indirgeyici üretir. PS II tarafından oluşturulan güçlü yükseltgeyici suyu yükseltirken PSI tarafından üretilen güçlü indirgeyici NADP^+ ’ı indirger. Bu şema fotosentetik elektron taşınımının anlaşılması için önemli bir temeldir. P680 ve P700, sırasıyla PS II ve PSI’nin maksimum soğurma dalga boylarını ifade etmektedir (Taiz and Zeiger, 2010).

1.1.1. Fotosentez’in gerçekleşmesini sağlayan yapılar

Kloroplastlar, yapılarında yoğun bir iç zar sistemi olan tilakoyidleri bulundurlar. Fotosentezin ışık reaksiyonlarının gerçekleştiği bu zar sisteminin içinde klorofiller bulunmaktadır. Tilakoyidlerin dışında kalan bölge ise “stroma” olarak isimlendirilir ve karbon indirgeme reaksiyonları burada gerçekleştirilir. Üstüste gelerek yığın oluşturmuş tilakoyidlere “grana lamelleri”, tilakoyidlerin zar ile bağlantılı yığın oluşturmeyen bölgelerine ise “stroma lamelleri” adı verilmektedir.

Fotosentez’in gerçekleşmesi için gerekli olan fazla sayıda protein tilakoyid zarlarına gömülü olarak bulunmaktadır. Reaksiyon merkezleri, anten pigment-protein kompleksleri ve elektron taşıyıcı enzimlerin çoğu integral zar proteinleridir. Tilakoyid zarda gömülü bulunan proteinlerin bir kısmı stromaya bir kısımda lümen olarak bilinen tilakoyid zarın iç kısmına doğru yönelmişlerdir.

PS I ve PS II tilakoyid zarlar üzerinden farklı yerlerde bulunurlar (Allen ve Forsberg, 2001) (Bkz. Şekil 1.3).



Şekil1.3:Tillakoyid zarların protein komplekslerinin düzenlenişi. PS II büyük bir çoğunlukla tillakoyid zarların yığın oluşturan bölgelerinde yerleşmiştir. PS I ve ATP sentaz ise stroma içerisine uzanmış yığın oluşturmamış bölgelerde bulunur. Sitokrom b_6f kompleksleri düzenli dağılmıştır. İki Fotosistemin bu şekilde yanıl olarak birbirinden ayrılmış olması, PS II tarafından üretilen elektron ve protonların PS I ve ATP sentaz tarafından kullanılmadan önce belli bir mesafe taşınmasını gerektirir (Allen and Forsberg, 2001).

1.1.2. Fotosentezde elektron taşınımı

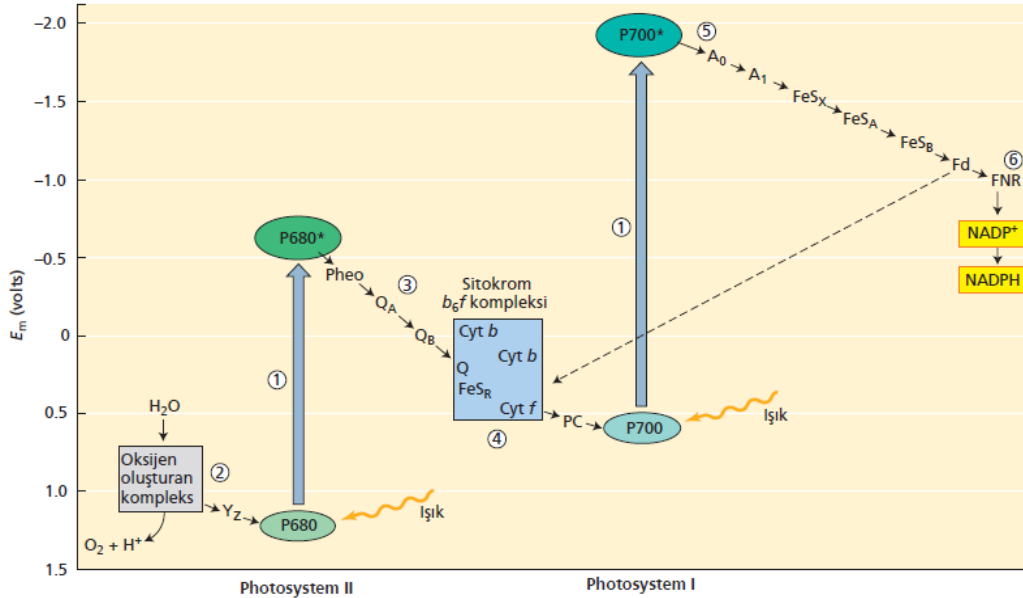
Elektronlar, klorofilden çıktıktan sonra bir dizi elektron taşıyıcısından geçerler. Bu elektron taşıyıcıları “Z şeması” şeklinde düzenlenmiştir. Reaksiyon merkezlerinde ki klorofillere çarpan fotonlar bu klorofilleri uyarır ve bir elektron dışı çıkar. Bu elektron bir dizi elektron alıcısından geçerek P700 (PSII’ den elektronları alır) ve NADPH⁺ ı (PSI’ den elektronları alır) indirger. Fotosentez de elektron akışı 4 büyük protein kompleksinde gerçekleşir. Bunlar; PS II, sitokrom b_6f kompleksi, PS I ve ATP sentazdır.

- PS II, tilakoyidin lümeninde suyu O₂’ e oksitler ve protonların lümene bırakılmasını sağlar.

•Sitokrom b_6f , PS II' den elektronları alarak PS I' e verir, ayrıca stromadan lümene ilave protonları taşır.

•PS I, ferredoksin (Fd) ve flavoproteinferredoksin-NADP redüktaz (FNR)' ın iş görmesi ile stroma da NADP^{+} ' ı NADPH ' e indirir.

• ATP-sentaz, protonları lümeden stromaya geçirerek ATP üretir.



Şekil 1.4: Oksijen oluşturan fotosentetik organizmalar için ayrıntılı Z şeması. Redoks taşıyıcılar ortalama redoks potansiyellerine göre yerleştirilmişlerdir (pH 7' de). (1) Dikey oklar reaksiyon merkezi klorofilleri tarafından foton soğurulmasını göstermektedir: PS II için P680 ve PS I için P700. Uyarılan PS II reaksiyon merkezi klorofili, P680*, feofitine (Pheo) bir elektron aktarır. (2) PS II' nin yükseltgeyici tarafında (P680* ile P680' i birleştiren okun solu) ışıkla yükseltgenen P680, suyun yükseltgenmesinden elektron alan Yz tarafından yeniden indirgenir. (3) PS II' nin indirgeyici tarafında (P680* ile P680' i birleştiren okun sağı), feofitin elektronları Q_A ve Q_B adı verilen elektron alıcı plastokinonlara aktarır. (4) Sitokrom b_6f kompleksi çözünür bir protein olan plastosiyanine elektronları aktararak P700⁺⁺ ü (oksidlenmiş P700) indirir. (5) P700 (A_0) da elektron alıcısının bir klorofil olduğu ve ondan sonraki alıcının (A_1) bir kinon olduğu düşünülmektedir. Bir dizi zara bağlı demir-kükürt proteini (FeS_x, FeS_A ve FeS_B) elektronları çözünebilen Fd' ye aktarır. (6) Çözünebilen FNR NADP^{+} ' ı NADPH ' e indirir. Bu NADPH Calvin döngüsünde CO_2 ' i indirgenmesinde kullanılır. Noktalı çizgi PS I' in çevresindeki devirsel elektron akışını göstermektedir (Blankenship ve Prince, 1985).

Yz, bir tirozin radikalidir ve D1 proteininin tirozin kalıntısından oluştuğu bilinmektedir. Bu radikal P680 ile Mn demeti arasında elektron taşıyıcı olarak iş görür. Yz'nin elektronları tutma eğilimi oldukça yüksektir.

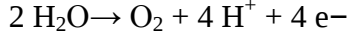
PS I ve PS II'nin soğurma özellikleri farklılıklar gösterir. Basel Kok PS I'in reaksiyon merkezinde bulunan klorofilin indirgenmiş halde 700 nm' de maksimum soğurma yaptığını bulmuştur. Bunun sonucunda bu klorofil P700 olarak adlandırılmıştır. Zouni *et al.*, (2001) ise PS II'nin 680 nm'de maksimum ışık soğurduğunu bulmuşlardır. Bu nedenle PS II'nin reaksiyon merkezindeki klorofil P680 olarak bilinmektedir (Kok, 1957; Zouni *et al*, 2001)

Fotosistem II çok sayıda alt birimden oluşan bir pigment protein kompleksidir (Barber *et al.*, 1999). Yüksek bitkilerde bu yapı iki tam reaksiyon merkezi ve bir anten kompleksinden oluşmaktadır. D1 ve D2 olarak bilinen iki zar proteini, reaksiyon merkezinin ortasında diğer proteinler ile birlikte bulunmaktadır (Zouni *et al.*, 2001). İlk elektron verici klorofil olan P680, diğer klorofiller, karatenoidler, feofitinler ve plastokinonlar D1 ve D2 zar proteinlerine bağlanmışlardır. Diğer proteinler ise anten kompleksleri olarak görev yaparlar ve oksijen oluşumunda gereklidirler.



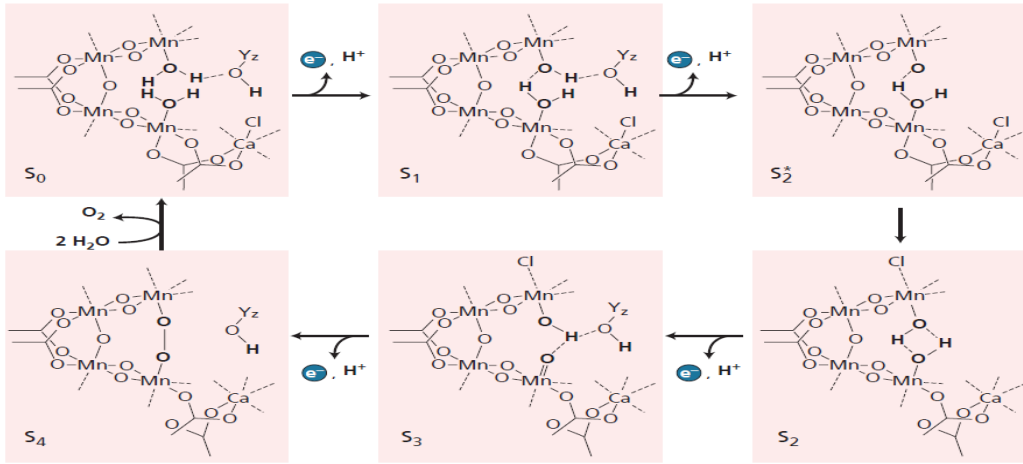
Şekil 1.5: D1 ve D2 ile CP43 ve CP47 orta alt birimlerinin sarmal yerleşimi. CP43 ve CP47 alt birimleri, uyarılma enerjisini reaksiyon merkezine iletirler. Ayrıca CP43, PS II' de yer alan Mn Demeti için amino ligand sağlar (Ferreira *et al.*, 2004).

Su, Fotosistem II tarafından oksijene oksitlenir. Aşağıdaki reaksiyon suyun oksitlenmesini göstermektedir.



Moleküler oksijen oluşturabilmesi için suyun yükseltgenmesi oldukça zordur. Fotosentezde oksijen oluşturan yapılar, bu reaksiyonu gerçekleştirebilen tek biyokimyasal sistemler olarak bilinmektedir. Suyun yükseltgenmesi sonucu oluşan protonlar, tillakoyidlerin lümenine bırakılır. Bunun ana nedeni oksijen oluşturan yapının tillakoyidlerin iç yüzeyinde bulunmasıdır. Daha sonrasında bu protonlar ATP sentaz içinden geçerek stromaya aktarılır. Bunun sonucunda suyun yükseltgenmesinden elde edilen protonlar ATP oluşumu için gerekli elektrokimyasal potansiyeli sağlar.

Suyun yükseltgenmesinde Mn oldukça önemli bir kofaktördür (Marschner, 1995). Mn İyonları S durumu olarak bilinen bir dizi yükseltgenme evresinden geçerler. Bu evre suyun yükseltgenmesi ve O_2 'nin oluşumu ile bağlantılıdır (Tommos ve Bobcock.,1998).



Şekil1.6: Mn iyonları S durumu (Taiz and Zeiger, 2010).

Fotosistem II' den ayrılan elektronlar feofitin ve 2 adet plastokinon tarafından alınır. Feofitin aslen bir klorofildir ve yapısında magnezyum atomu yerine iki adet hidrojen atomu bulundurmaktadır. Reaksiyon merkezine bağlı halde bulunan Q_A ve Q_B plastokinonları elektronları feofitinden sırası ile alırlar (Okamura *et al.*, 2010). Bu işlemler sonucunda Q_B, Q_B⁻² şeklinde indirgenir ve indirgenmiş bu hali ile stromadan 2H⁺ alır. Bunun sonucunda indirgenmiş plastohidrokinon (OH₂) oluşur. Daha sonra bu plastohidrokinon reaksiyon

merkezinden ayrılarak zarın hidrokarbon kısmına girer ve elektronlarını sitokrom***b₆f*** kompleksine iletir.

Sitokrom***b₆f*** çok fazla altbirimden oluşan oldukça büyük bir proteindir. İki tane *b* tipi, bir tanede *c* tipi hem (Sitokrom *f*) grubu bulundurmaktadır. Ayrıca bu büyük yapının içinde birde Rieske Demir-Kükürt proteinide bulunmaktadır. Sitokrom***b₆f*** içinde elektronların akış yolu tam olarak aydınlatılamamıştır ancak Q döngüsü (Kidon Döngüsü) denilen bir mekanizma bu komplekste gerçekleşen olayların çoğuna ışık tutmaktadır. Bu mekanizmaya göre, OH₂ yükseltgenir ve iki elektrondan biri elektron taşıma zincirinden PS I' e geçirilirken diğeri devirli bir işlemde geçer. Bu devirli işlem sonunda zarın bir yanından diğeri kısmına doğru pompalanan proton sayısı artar. Elektron taşıma zincirinde, plastohidrokinondan bir elektronu FeS (Rieske Demir-Kükürt Proteini) alır ve sitokrom *f* ye aktarır. Sitokrom*f* ise elektronunu plastosiyanine (PC) aktarır. PC' de P700 indirger. İşlemin devirli kısmında ise plastosemikinon elektronunu *b*-tipi hemlerden birine aktarır ve protonların her ikisinin de zarın lümen tarafına bırakır. *b*-tipi hem almış olduğu elektronu ikinci bir *b*-tipi hem üzerinden oksitlenmiş bir kinon molekülüne aktarır. Bu aktarım sonucunda kinon molekülü semikinon formuna indirgenir. Diğeri yandan benzer bir elektron akış dizisi, plastokinonu tamamen indirger. Plastokinon zarın stromaya bakan kısmından protonları alır ve plastohidrokinon olarak Sitokrom***b₆f*** kompleksinden ayrılır. Bu mekanizmanın iki kez tekrar etmesi sonucunda P700' e iki adet elektron aktarılmış olur. Bu işlemler sonucunda zarın iki yanında da elektrokimyasal bir potansiyel oluşur. Zarın iki yanındaki H⁺ konsantrasyon farkı bu potansiyelin oluşmasını sağlar. Elektrokimyasal potansiyel ATP sentezi için gerekli gücü sağlar.

Fotosistem II ve Fotosistem I oldukça kompleks yapılardır, tillakoyid zarlar üzerinde farklı bölgelerde lokalize olmuşlardır. Bu sebepten dolayı elektronları PS II' den PS I' e taşıyacak, zarın iç kısmında veya yüzeyinde hareket edebilen elemanlara ihtiyaç vardır. Plastokinon ve plastosiyanin, PS II ile PS I arasında ki elektron akışını sağlamakla görevli yapılardır. PS I reaksiyon merkezi, çok sayıda alt birimden oluşan oldukça kompleks bir yapıdır (Jordan *et al.*, 2001). Reaksiyon merkezinde 100 klorofilden oluşan merkezi bir anten bulunur. Bu anten ve P700, PsaA ve PsaB olarak adlandırılan iki proteine bağlı olarak bulunur (Chitnis, 2001). PS I' in reaksiyon merkezinde yer alan elektron taşıyıcıları karmaşık bir yapıdadır.

Mekanizma mevcut kanıtlar ışığında altında iki adet elektron alıcısının olduğunu öngörmektedir. Bunlardan birinin, bir klorofil molekülü diğerinin ise bir kinon çeşidi olan fillokinon olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca 3 adet Rieske Demir-Kükürt (Fe-S) proteini ve bunlara bağlı ferrodoksinler merkezdeki diğer elektron alıcılarıdır. Fe-S merkezi olarak adlandırılan Fe-S proteini üçe ayrılmıştır. Bunlar FeS_x , FeS_A , FeS_B olarak isimlendirilmiştir. FeS_x , P700 ile bütünleşmiştir. FeS_A , FeS_B ise PS I reaksiyon merkezinin elemanlarıdır. Elektronlar FeS_A , FeS_B merkezlerinden geçtikten sonra yine bir Demir-Kükürt proteini olan Fd' ye aktarılır. Burada zara bağlı bir protein olan FNR, $NADP^{+}$ 'ı $NADPH$ 'e indirger. $NADP^{+}$ PS I'in reaksiyon merkezi tarafından indirgenmiş olur ve devirli olmayan elektron akışı tamamlanmış olur (Karpus *et al.*, 1991).

1.2. Fotosentez: Karbon Reaksiyonları

Işıklı evre reaksiyonlarında, suyun ışığın etkisiyle moleküler oksijene yükseltgenmesine, tillakoyid zarda gerçekleşen reaksiyonlarla ATP ve indirgenmiş NADPH oluşumunu eşlik ettiğini görmüştük. NADPH ve ATP, CO_2 'in karbonhidrata indirgenmesini katalizleyen reaksiyonlarda kullanılır.

1.2.1. Calvin döngüsü

Fotosentetik karbon indirgeme reaksiyonu (Calvin Döngüsü) ilk kez C3 bitkilerinde bulunmuştur. Bu döngü 1950' li yıllarda Melvin Calvin ve arkadaşları tarafından saptanmıştır. Calvin döngüsü 3 evrede gerçekleşir ;

1. Karboksilasyon (3-fosfoglisarat oluşumu)
2. İndirgeme (Gliseraldehit- 3-fosfat oluşumu)
3. Yenileme (Rubiloz -1,5-bisfosfatın yeniden oluşması)

1.2.1.1 Karboksilasyon

CO_2 , Rubiloz-1,5-bisfosfat ile reaksiyona girerek, Calvin döngüsünün karboksilasyon evresini başlatır. Bu reaksiyon sonucunda iki molekül 3-fosfoglisarat oluşur. Reaksiyonu kloroplastlarda bulunan RuBisCO olarak bilinen Rubiloz -1,5-bisfosfatkarboksilaz/Oksijenaz enzimi katalizler. Karboksilasyon reaksiyonunda iki nokta oldukça önemlidir.

a. Rubiloz -1,5-bisfosfatın karboksilasyonu ile ilgili olarak serbest enerjide ortaya çıkan negatif değışiklik büyük olduğundan reaksiyon başarı ile ilerler.

b. Fotosentez yapan hücrelerde bulunan düşük CO_2 konsantrasyonlarında Rubisko' nun CO_2 ' e olan ilgisi hızlı karboksilasyon için yeterlidir.

1.2.1.2 İndirgenme

Işık reaksiyonlarında oluşan ATP yardımı ile ilk olarak 3-fosfogliserat fosfogliseratkinaz yardımıyla 1,3-bisfosfogliserata fosforillenir. Daha sonra gliseraldehit-3-fosfata indirgenir. Bu işlemde ise yine ışık reaksiyonlarda üretilen NADPH kullanılır. Reaksiyon kloroplastlarda bulunan NADP: gliseraldehit -3-fosfat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenir.

1.2.1.3 Yenilenme

CO_2 alımının sürekliliği için Rubiloz -1,5-bisfosfatın sürekli olarak yenilenmesi gerekmektedir. Yenilenme reaksiyonu 9 basamakta gerçekleşen bir işlemdir.

1. Gliseraldehit-3-fosfat molekülü, izomerizasyon reaksiyonu ile trioz fosfat izomeraz enzimi tarafından dihidroksiaseton-3-fosfata dönüştürülür.

2. Dihidroksiaseton-3-fosfat, ikinci bir gliseraldehit-3-fosfat ile aldol kondensasyonu geçirir. Aldozlar tarafından katalizlenen bu reaksiyon sonucunda Fruktoz-1,6-bisfosfat oluşur.

3. Fruktoz-1,6-bisfosfat, Fruktoz-6-fosfata hidrolizlenir. Daha sonra transketolaz ile reaksiyona girer.

4. Eritroz-4-fosfat ve ksiloz-5-fosfat oluşturmak için Fruktoz-6-fosfatın 1. ve 2. Karbonları üçüncü bir gliseraldehit-3-fosfat molekülüne aktarılır. Bu işlem transketolaz tarafından yapılır.

5. Eritroz-4-fosfat, aldolaz enzimi yardımı ile dördüncü bir trioz fosfat molekülü ile birleşerek sedoheptuloz-1,7-bisfosfatı üretir.

6. Sedoheptuloz-1,7-bisfosfat, hidrolizlenerek sedoheptuloz-7-fosfata dönüştürülür.

7. Sedoheptuloz-7-fosfat, iki karbonunu beşinci ve son bir gliseraldehit-3-fosfat molekülüne aktararak riboz-5-fosfatı ve ksiloz-5-fosfatı üretir. Bu işlemi transketolaz yardımı ile gerçekleştirir.

8. Ksiloz-5-fosfatın iki molekülü, ribuloz-5-fosfat izomeraz enzimi ile iki molekül ribuloz-5-fosfat şekeline dönüştürülür. Riboz-5-fosfat izomeraz enzimi ise Riboz-5-fosfattan üçüncü bir Ribuloz-5-fosfat şekerini oluşturur.

9. Son olarak, Ribuloz-5-fosfat Kinaz ATP ile Ribuloz-5-fosfatın fosforilasyonunu katalizler. Böylece başlangıçta CO₂alıcısı olarak kullanılan Rubiloz-1,5-bisfosfat tekrardan kazanılmış olur.

Calvin döngüsünün çalışma hızı ara ürünlerin konsantrasyonuna bağlı olarak artabilir yani döngü otokatalitiktir. Bunun sonucu olarakta trioz fosfat başka bir yöne yönlendirilmediği sürece, Calvin döngüsü tükettiğinden daha fazla substrat üretebilir. Calvin döngüsünde CO₂' in fonksiyonunu sürdürebilmesi için ATP ve NADPH formunda enerjiye gereksinim vardır. Bir molekül heksozun sentezlenmesi için altı molekül CO₂' in fiske edilmesi gerekmektedir. Bunun için 18 ATP ve 12 NADPH harcanır. Yani Calvin döngüsünde karbonhidrata dönüştürülen her bir CO₂ molekülü için 3 molekül ATP ve 2 molekül NADPH tüketilmektedir.

Ototrofik hücrelerin hepsinde Calvin döngüsü görülmemektedir. Anaerobik bakterilerin bir kısmı ototrof büyüme için farklı yollar kullanırlar. Bu yollar şöyledir;

1. Asetil –CoA türevlerinden organik asitlerin sentezi
2. Gliksilatın üretilmesini sağlayan döngü
3. Asetogenik, methanogenik bakterilerde doğrusal yol (Asetil-CoA yolu)

1.2.2. Calvin döngüsünün düzenlenmesi

Calvin döngüsünün düzenlenmesinde,

a. Işığa bağımlı olarak aktifleşen enzimler iş görür. Bu döngüde ışık tarafından düzenlenen 5 enzim vardır.

1. Rubisko
2. NADP: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
3. Fruktöz -1,6-bisfosfataz
4. Sedoheptuloz -1,7-bisfosfataz
5. Rubiloz-5-fosfat kinaz

Son Dört enzim ferredoksin-tiyoredoksin sistemi yardımıyla ışık tarafından kontrol edilir (Buchanan *et al.* 1988; Wolosiuk *et al.*, 1993; Besse and Buchanan, 1997; Schürmann and Jacquot, 2000). Rubisko ise rubiskoaktivaz isimli bir tiyoredoksin yardımcı enzime tarafından dolaylı olarak kontrol edilir.

b. Işığa bağımlı iyon hareketleri Calvin döngüsü enzimlerini düzenler. Işıklandırma sonucunda stromadan tillakoyitlerin lümenine doğru protonlar pompalanır. Bu işlem sonunda stromada ki Mg^{2+} konsantrasyonu artarken H^+ konsantrasyonunda azalma görülür. Bu durumda pH 7'den 8 doğru artış göstermektedir. Calvin döngüsü enzimlerinden bazıları pH 8'de pH 7'den daha aktiftirler.

c. Zarlarda ışığa bağlı taşınımında Calvin döngüsünü düzenler. Karbonun kloroplastın dışarısına çıkarılma hızı Calvin döngüsünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynar.

Calvin döngüsünün düzenlenmesinde önemli bir role sahip olan rubiskonun özelliklerinden bir tanesi de hem oksijenasyonunu hemde karboksilasyonunu katalizlemesidir. Fotosentetik CO_2 fiksasyonu ve fotorespirasyona bağlı oksijenasyon birbiriyle rekabet eder. Oksijenasyon, fotorespirasyon olarak bilinen işlemin ilk reaksiyonudur. Fotorespirasyon, CO_2 fikse eden hücrelerden CO_2 ' in

kaybına neden olur. Karboksilasyon ile oksijenasyon arasında ki rekabet fotosentezin verimliliğini düşürür.

Bazı Bitkiler bu problemin önüne geçmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Bu bitkiler ya hiç fotorespirasyon yapmaz ya da çok sınırlı ölçüde yaparlar. Bu tip bitkilerin, normal Rubiskoya sahip olmalarına karşın, fotorespirasyon yapmamalarının sebebi, rubiskonun bulunduğu ortamda CO₂ biriktirmesiyle oksijenasyon reaksiyonlarının baskılanmasıdır.

1.3. Bitkilerde CO₂ Yoğunlaştırma Mekanizmaları

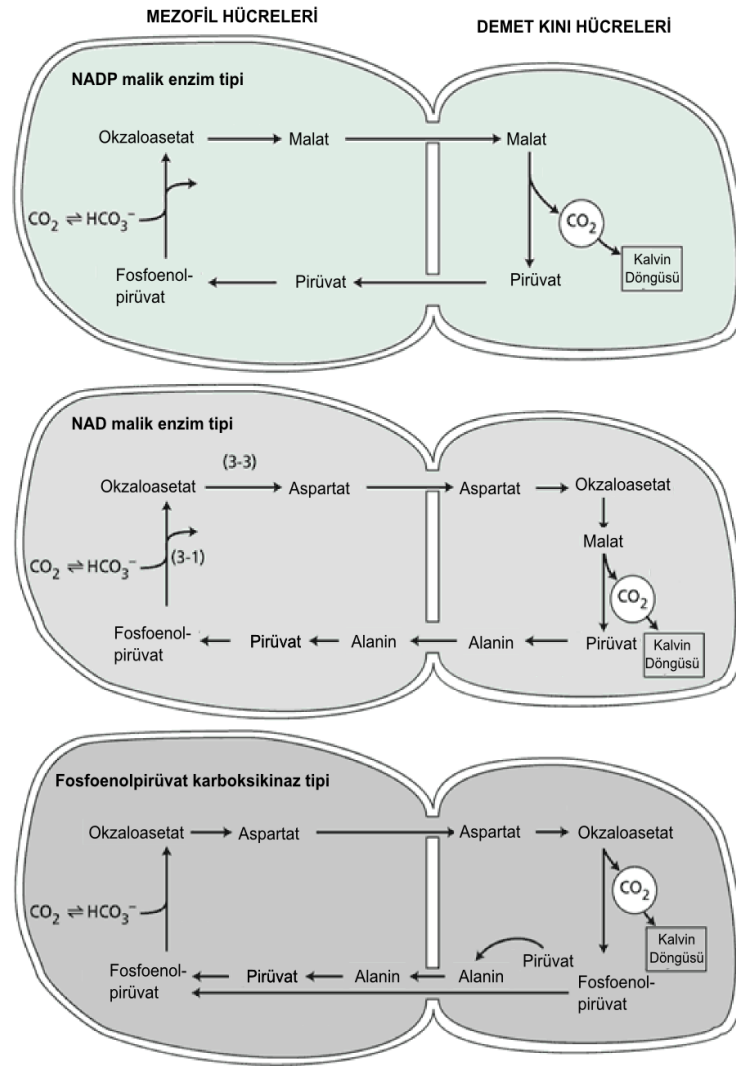
Bitkiler tarafından kullanılan üç çeşit fotosentez türü vardır (Sage *et al.*, 2004). Çoğu bitki türünde, Kalvin-Benson döngüsünde, CO₂ üç karbonlu bir son ürün oluşturmak üzere rubilazbifosfatkarboksilaz/oksijenaz (RuBisCo) tarafından fiks edilir. Bu bitkiler oluşturdukları ürün üç karbonlu olduğu için C₃ bitkileri olarak adlandırılırlar. C₄ ve Crassulacean Asit Metabolizması (CAM) fotosentezi yapan bitkiler C₃ bitkilerinden evrimleşmiştir ve her ikisinde de oluşturulan ilk ürün dört karbonludur. Fotosentetik reaksiyonlar, C₄ bitkilerinde mezofil hücreleri ve iletim demetlerinin etrafında halkasal bir yapı oluşturan demet kını hücreleri arasında uzaysal olarak ayrılmıştır. Bu anatomik özelleşmeye Kranz anatomisi adı verilir. Kranz anatomisi taşıyan bitkiler CO₂' yi mezofil hücrelerinde fiks ettikten sonra, dört karbonlu organik asitler aracılığı ile demet kını hücrelerine taşırlar ve burada CO₂' yi serbest bırakırlar. Bu noktadan sonra C₃ bitkilerine benzer Kalvin-Benson döngüsü çalışmaya başlar. Ancak CO₂ miktarı fazla olduğu için elektron iletim sisteminin aşırı yüklenmesi veya fotorespirasyon riski azaltılmıştır. Metabolizmanın bu şekilde ayrılması mezofil ve demet kını hücrelerinde belirli genlerin ayrı ayrı ifade edilmesiyle gerçekleşir. Karbonik anhidraz, fosfoenolpiruvatkarboksilaz, NADP-malatedehidrogenaz ve piruvattorfofosfat dikinaz mezofil hücrelerinde ifade olurken, NADP-malik enzim ve RuBisCo demet kını hücrelerinde ifade olur (Brown *et al.*, 2005). C₄ metabolizmasında iş gören enzimlerin hepsi aslında C₃ bitkilerinde de mevcuttur, ancak ifade seviyeleri çok düşüktür.

Mangan, PS II' de su parçalayıcı komplekste yer alır, süperoksitdismutazın (MnSOD) bir bileşenidir ve önemli metabolik enzimler için anahtar bir rol üstlenir (Marshner et al., 1995). Daha önce C₄ bitkileri üzerinde yapılan çalışmalarda, fotosentez aşamasında Mangan'ın farklı rollere sahip olduğu belirlenmiş olmasına rağmen, genelde çalışmalar, C₄ bitkilerinin ürün verimi ve büyümesi üzerine yoğunlaşmıştır. C₄ bitkileri sıcak ve kurak çevre koşulları altında yaşayabilirler ve dünya üzerinde ki besinlerin ana kaynaklarını oluştururlar. C₄ bitkilerinin evrimsel adaptasyonunda (karbondioksitin demet kını hücrelerinde yoğunlaşması) H₂O' nun varlığından çok CO₂ sınırlayıcı faktör olmuştur. Bu mekanizma nedeniyle su kaybı önlenirken CO₂ alınımda dengelenmiş olur (Ehleringer *et al.*, 1993).

1.3.1. C₃ ve C₄ karboksilasyon yollarının karşılaştırılması

Bitkilerde CO₂ fotosentetik fiksasyonu yapan enzim Ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz (Rubisco)'dur. Ancak Rubisco kinetik açıdan kusurlu bir enzimdir. Diğer enzimlerle karşılaştırıldığında reaksiyon katalizleme hızı düşüktür ve substratı olan CO₂' ye ilgisi azdır. Daha da önemlisi, Rubisco CO₂ ve O₂ arasında ayırım yapamaz (Jordan and Ogren, 1981). O₂ ışık reaksiyonlarıyla bitki hücrelerinde üretildiği ve atmosferde yüksek miktarda bulunduğu için bu özellik fotosentez verimliliği açısından problem teşkil etmektedir (Edwards and Walker, 1983). Rubisco' nun ribuloz-1,5-bifosfat (RuBP) ve O₂' yi reaksiyona sokması fotorespirasyona sebep olur ve fotosentetik karbon asimilasyonunu olumsuz yönde etkiler. Böylece fotorespirasyon CO₂' nin tekrar atmosfere bırakılmasına sebep olur (Edwards and Walker, 1983). Şu anki atmosferik CO₂ ve 25 °C sıcaklıkta, C₃ bitkilerinde fotorespirasyon hızı fotosentezin %20-30' u kadardır (Sage, 2001, 2004). Artan sıcaklıkla birlikte fotorespirasyon hızı, fotosentez hızına göre daha fazla artış göstermektedir (Sage and Kubien, 2007). C₄ fotosentetik yolu, düşük CO₂ konsantrasyonunun, yüksek sıcaklığın, kuraklığın ve/veya tuzluluğun sebep olduğu yüksek fotorespirasyon baskısıyla evrimleşmiştir (Ehleringer, 1997; Sage, 2004; Tipple and Pagani, 2007). Bu yolun 3' ü monokotil, 16' sı dikotil hatlardan olmak üzere toplamda 45 kez birbirinden bağımsız olarak evrimleştiği düşünülmektedir (Sage, 2004). C₄ bitkileri dünya florasının %4' ünü temsil etselerde, global primer üretimin %20' sinden sorumludurlar. C₄ fotosentezinin temel özelliği, C₄ yapraklarında atasal C₃

fotosentez yolu etrafında anatomik ve biyokimyasal değişimlerle CO₂ konsantre edici bir mekanizma oluşturmuş olmasıdır. Böylelikle içsel CO₂ miktarı yüksek seviyelerde tutulmaktadır. Yüksek bitkilerde C₄ fotosentezi iki fotosentetik döngünün (C₃ ve C₄) ayrı ayrı çalıştığı, iki farklı fotosentetik hücre tipinde (mezofil ve demet kını) gerçekleşmektedir. C₄ fotosentezinin ilk basamağı mezofil hücrelerinde gerçekleşir, ve bu basamak CO₂'nin bikarbonata dönüştürülmesidir. Bikarbonat fosfoenolpirüvat karboksilaz (PEPC) aracılığıyla fosfoenolpirüvat (PEP) ile reaksiyona girer ve 4 karbonlu bir asit olan oksaloasetatı oluşturur. Bu fotosentez yoluna C₄ fotosentezi ismi verilmesini sebebi bu basamaktan kaynaklanmaktadır. Oksaloasetat diğer 4 karbonlu asitlere (malat, aspartat) dönüşür ve demet kını hücrelerine difüze olur. Burada dekarboksilasyona uğrayarak CO₂'nin Rubisco tarafından fikse edilmesini sağlar ve buradan sonra C₃ fotosentez döngüsü çalışmaya başlar. Dekarboksilasyondan sonra ortaya çıkan 3 karbonlu ürün mezofil hücrelerine geri döner. C₄ fotosentez mekanizmasına sahip bitkiler 3 biyokimyasal alt tipte sınıflandırılmaktadır. Bunlar demet kını hücresinde C₄ asit dekarboksilasyonunda görev alan enzimlerine göre: NAD malik enzim (NAD-ME), NADP malik enzim (NADP-ME) ve fosfoenolpirüvat karboksikinaz (PCK) tipleridir (Hattersley, 1992). Değişik dekarboksilasyon yollarına sahip C₄ fotosentetik yolları şekil 1.7' de gösterilmiştir. C₄ bitkileri, karbon konsantre edici bu özellikleriyle kuraklığa daha iyi uyum sağlamışlardır ve C₃ bitkilerine göre su ve azotu daha verimli kullanabilmektedirler (Nelson, 2004). C₃ bitkisi olan çeltik (*Oryza sativa*) ve C₄ bitkisi olan mısır (*Zea mays*)'ın su, azot, ve güneş ışığını kullanma verimlilikleri (WUE, PNUE, RUE) karşılaştırıldığında, mısırın bu özelliklerinin çeltiğe göre sırasıyla 1.9, 2.8 ve 1.5 kat daha verimli olduğu saptanmıştır (Mitchell ve Sheehy, 2006). Bu karşılaştırmanın bir benzerine ülkemizden örnek vermek gerekirse Türkiye de yetişen buğday'ın (C₃) WUE'sinin 1.33-1.45 kg m⁻³ arasında olduğu (Sezen ve Yazar, 1996), mısırdaki ise bu değer 1.65-2.15 kg m⁻³ arasında olduğu bilinmektedir (Dağdelen vd., 2006).

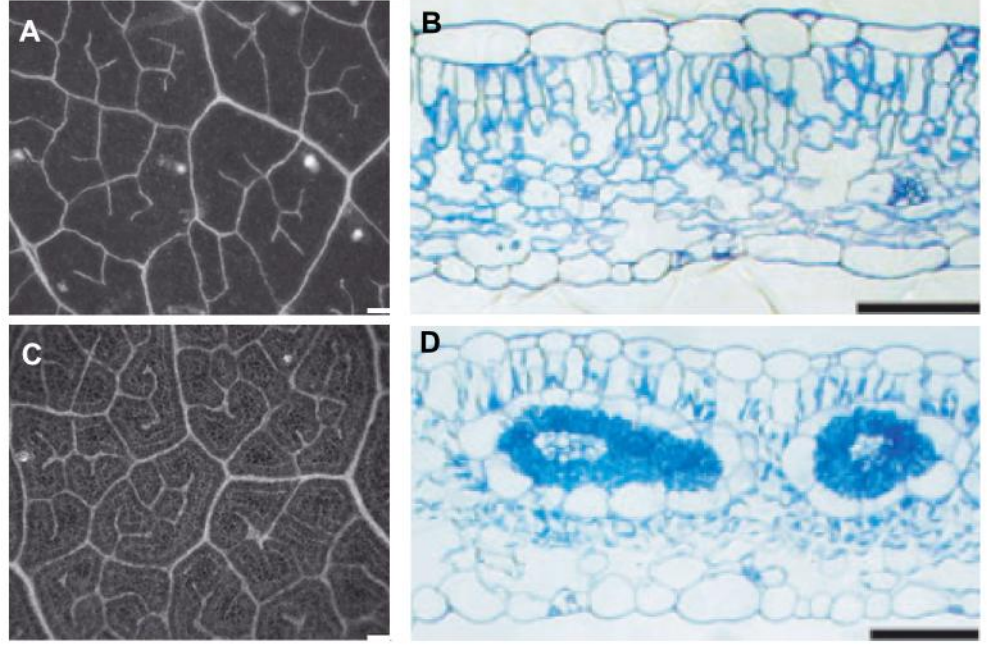


Şekil 1.7:Debarboksilasyon tiplerine göre C₄ reaksiyonları (Taiz and Zeiger, 2010' dan).

C₄ fotosentez mekanizması iki sebep yüzünden CO₂ konsantre edici bir mekanizma gibi çalışmaktadır: birincisi, PEPC' nin Rubisco' ya göre reaksiyon katalizleme hızının daha yüksek olması ve O₂ ye ilgisi olmaması, ikincisi ise demet kını hücrelerinin hücre duvarlarının gaz difüzyonunu engelleyici bir bariyer olarak görev yapmasıdır. Demet kını hücrelerinde CO₂ konsantrasyon mekanizmasının oluşturduğu yüksek CO₂ miktarı, fotorespirasyonun engellenmesini sağlamaktadır ve C₄ bitkilerini C₃ bitkilerine göre daha düşük çevresel CO₂ seviyelerinde fotosentetik doyuma ulaştırmaktadır.

1.3.2. *Cleome gynandra* ve *Cleome spinosa*'nın fotosentetik özellikleri

Son yıllarda besin kıtlığına çare bulabilmek için bitki biyologları alternatif arayışlar içindedir. Bunlardan biriside insan beslenmesinde önemli yere sahip olan C₃ bitkisi çeltiğe C₄ fotosentez yolunun aktarılmasıdır (Mitchell and Sheehy, 2006; Hibberd *et al.* 2008) . Ancak bu karmaşık yolun aktarılması; damarlanma, demet kını hücresi oluşumu gibi anatomik, fotosentetik enzimlerin aktivitelerinin ve lokalizasyonlarının düzenlenmesi gibi biyokimyasal bir çok mekanizmanın açıklanmasını gerektirmektedir. Bu mekanizmaların açıklanabilmesi için Arabidopsis gibi etkili bir modele ihtiyaç vardır. Brown *et al.* (2005), bu amaçla Arabidopsis' in en yakın C₄ akrabası olan *C. gynandra*'nın kullanılmasını önermiştir. Bunun sebebi Arabidopsis' te yaprak gelişimiyle ilgili elde edilen bilgilerin *Cleome*'da kullanılarak *Cleome*'da bu işlevleri gören genlerin daha kolay izole edilebilmesi , *Cleome*'dan elde edilen C₄ genlerini Arabidopsis' e aktararak test etme olanağı ve *Cleome*'un yaşam döngüsünün görece kısa olmasıdır. Marshall *et al.* (2007) ise *Cleome* cinsine ait türlerin fotosentetik karakteristiklerini araştırmıştır. Çalışmada 9 farklı tür kullanılmıştır. *C. gynandra* da ortalama damarlanma uzunluğu 8 mm mm⁻² iken bu değer *C. spinosa*'da 5' dir. Demet kını hücreleri arasındaki mezofil hücresi sayısı *C. gynandra*'da 2, *C. spinosa*'da 8 olarak bulunmuştur, aynı zamanda *C. gynandra*'nın demet kını hücreleri *C. spinosa*'ya göre 3 kat daha büyüktür. Yazarlar anatomik özellikler yanında fotosentetik enzimlerinde aktivitelerini karşılaştırmıştır. *C. gynandra* ve *C. spinosa*'da PEPC, NAD-ME, PCK ve NADP-ME aktiviteleri sırasıyla 12.2, 2.60, 1.03, 0.1 ve 0.7, 0.06, 0.06, 0.12 olarak tespit edilmiştir (aktiviteler µmol min⁻¹ mg klorofil⁻¹ cinsindendir). Bu veriler *C. gynandra*'nın NAD-ME tipi bir C₄ bitkisi olduğunu , bunun yanında *C. spinosa*'nın ise anatomik ve biyokimyasal olarak tam bir C₃ bitkisi olduğunu göstermektedir.



Şekil 1.8: *C. spinosa* (A,B) ve *C. gynandra*'nın (C,D) damarlanmalarının ve yaprak enine kesitlerinin karşılaştırılması (Marshall *et al.*, 2007' den).

1.4. Mn Eksikliği ve Toksisitesinin Oksidatif Strese Etkileri

Mangan, özellikle yaprak petiollerinin periferel hücrelerinde birikir. Hücresel düzeyde ise aşırı miktarda bulunan Mn'nin vakuollerde (Foy *et al.*, 1978), hücre çeperinde (Menon *et al.*, 1984) ve golgi veziküllerinde (Hughes, 1988) depolandığı bulunmuştur. Aşırı Mn, klorofil biyosentezini inhibe eder ve fotosentez hızının düşmesine neden olur (Macfie *et al.*, 1992).

Hücresel düzeyde Mn'nin aşırı seviyede bulunması, ROS oksijen türlerinin birikiminden kaynaklanan oksidatif stresin bir sonucu olarak bitki metabolizmasını olumsuz etkileyebilir (Channey, 1993; Kabata-Pendias, 2001), ayrıca bitkinin antioksidant sistemin de dengesizliklere yol açar (Shi *et al.*, 2006; Lei *et al.*, 2007). Bazı araştırmalar, toleran türlerde yüksek seviyede bulunan Mn'ın antioksidanların seviyelerini artırdığını ve düşük oksidatif stresi uyardığını göstermiştir (Fecht-Christoffers *et al.*, 2003). Aşırı Mn'nin oksidatif stres yanıtları ile ilgili olarak, çeltiğin büyüme safhasının ilk aşamalarında iki kinetik faz belirlenmiştir. İlk faz, Mn'nin tilakoyid lamellerinde aşırı birikmesi ile alakalıdır. Bu birikme sonucunda elektron akışının engellenmiş ve ROS üretiminin sınırlanmış olduğu belirlenmiştir. (McCain and Markley, 1989). İkinci kinetik fazda ise, yüksek miktarda bulunan Mn'nin sıklık olmayan

fotofosforilasyon süreçlerini inhibe ettiği, ROS üretiminde artışa ve tilakoyid lamellerinde peroksidaz sisteminde hasara neden olduğu gözlemlenmiştir. (Lidon and Teixeira, 2000). Bunun sonucunda aşırı Mn birikiminin kloroplast lamellerinde aksaklıklara neden olduğu belirlenmiştir ancak burada SOD' ın yüksek aktivitesinin hücrenin zarar görmesini bir noktaya kadar engellediği de belirlenmiştir.

1.4.1. Sinyal molekülü olarak ROS' lar

ROS' ların çevresel stresler sırasında oksidatif zarara yol açma potansiyellerinin yanında, son yıllarda, bu moleküllerin patojen enfeksiyonu, çevresel stresler, programlanmış hücre ölümü ve gelişimle ilgili farklı uyarılara tepki verilmesinde sinyal iletilici moleküller olarak görev aldıkları gösterilmiştir (Torres ve Dangl, 2005). “Oksidatif yanma” olarak ifade edilen, ROS üretimindeki hızlı artışın, yukarıda belirtilen bu işlemlerin çoğu için önemli olduğu gösterilmiştir. Genetik çalışmalarla, plazma zarındaki NADPH oksidazları kodlayan, *Rboh* genlerinin, bu işlemler sırasında hücrelerde ROS' larla birlikte, sinyal iletiminde yer aldıkları gösterilmiştir (Torres ve Dangl, 2005). ROS sinyallerinin NADPH oksidazlar aracılığı ile aktif olarak üretilmelerinin dışında ROS' lar stres sırasında oluşan metabolik dengesizlik sonucu da üretilirler. Bunlar, alışma ve savunma mekanizmalarını aktive etmek için stres sinyali olarak kullanılmaktadırlar. ROS' ların sinyal molekülü olarak kullanıldığı bu mekanizmalar, stres altında oksidatif zarara karşı koyulmasını sağlamaktadır (Davletova *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2008; Sekmen *et al.*, 2007). Sonuç olarak ROS' ların birbirinin zıttı iki özellikleri bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, hücreye zarar veren toksik moleküller olmaları, diğeri ise çeşitli çevresel streslere tepki verilmesinde, yararlı sinyal molekülü olmalarıdır.

1.4.2. Sekonder Stres Olarak Oksidatif Stres

Değişen ortamlara bitkilerin alışması hücresel dengenin yeniden kurgulanmasını gerektirmektedir. Bu ise, hücrenin farklı bölmelerinde yer alan birden fazla metabolik yol arasındaki hassas düzenlemeler ile gerçekleşmektedir. Ancak, bu metabolik denge, su kıtlığı sırasında bozulabilmektedir (Mittler, 2006). Farklı metabolik yolların uyum içinde çalışmaları bozulunca, hücrede yüksek enerji düzeyindeki elektronlar moleküler oksijene (O_2) iletilirler (Takahashi and

Asada 1988; Mittler, 2002). Bunun sonucunda tekli oksijen ($^1\text{O}_2$), süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), ve hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşmaktadır. Bunlar, proteinler, DNA ve lipitleri oksitleyerek zarar oluşturan toksik moleküllerdir (Apel and Hirt, 2004). Optimum büyüme koşullarında, ROS' lar kloroplast, mitokondri ve peroksizomlar gibi organellerde ve apoplastta düşük düzeylerde üretilmekte, ancak, stres sırasında, ROS' ların üretiminde bir artış görülmektedir. Bitkilerde stres sırasında ROS birikimi; ROS üretimi ile ROS süpürülmesi arasındaki dengeye bağlıdır (Miller, 2009). ROS' ların üretimi ve süpürülmesi ise, stresin şiddetine ve dokunun enerji dengesizliğine alışma yeteneğinin yanında, büyüme koşullarındaki (ışık şiddeti, sıcaklık vb.) diğer değişkenlere de bağlıdır.

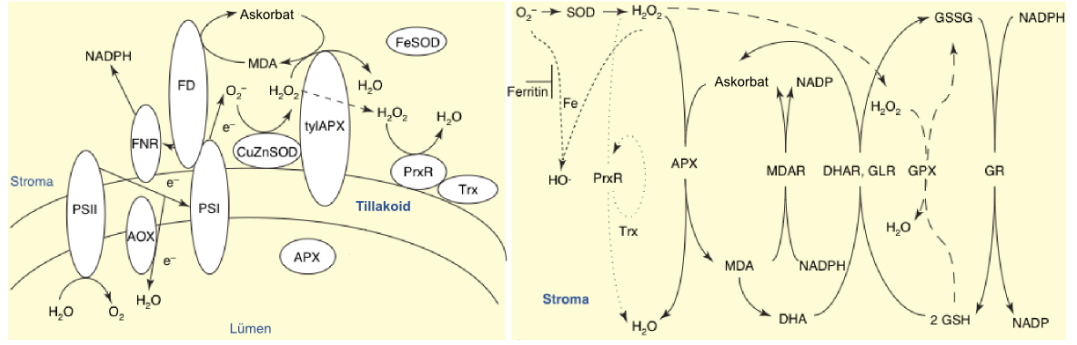
Hücre büyümesi ve fotosentez aşırı Mn' dan, olumsuz etkilenmektedir (Macfie *et al.*, 1992). Stres sırasında stoma iletkenliğinin azalması sonucunda yaprak içindeki CO_2 konsantrasyonu düşmektedir. Kloroplastlarda, CO_2 fiksasyonunun azalması ile birlikte elektron taşınım zincirinin aşırı indirgenmesi, ROS üretimini arttırmakta ve oksidatif strese neden olmaktadır. Benzer şekilde, stres sırasında elektron taşınım zincirinin aşırı indirgenmesi sonucu mitokondride de ROS' lar üretilmektedir (Davidson and Schiestl, 2001). Diğer yandan, fotorespirasyon sırasında peroksizomlarda, glikolat' ın glikoksilata yükseltgenmesi sürecinde de yine bir reaktif oksijen türü olan H_2O_2 üretilmektedir (Mittler *et al.*, 2004). Bitkiler oluşan ROS' ları detoksifiye etmek için çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidantlar üretirler. Askorbik asit (AsA) ve glutatyon (GSH) gibi enzimatik olmayan antioksidantlar ve süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX) ve peroksiredoksinler (Prx) gibi ROS süpürücü enzimler, gerek normal metabolizma gerekse stres sırasında ROS detoksifikasyonunda rol alırlar (Takahashi and Asada 1988; Mittler *et al.*, 2004; Dietz *et al.*, 2006; Türkan ve Demiral, 2009).

1.5. Organel Düzeyinde ROS Düzenlenmesi

1.5.1. Kloroplast

Kloroplast tillakoidlerinde bulunan PSI ve PSII reaksiyon merkezleri ROS üretiminin ana bölgeleridir. ROS' ların foto üretimi fizyolojik ve çevresel faktörlerden oldukça etkilenmektedir ve ROS' ların üretim hızı CO₂ asimilasyonu için gerekli olan miktardan daha fazla foton yoğunluğunun olduğu ortamlarda artış göstermektedir (Asada, 2006). Stres koşullarında, stoma kapanmasına bağlı olarak azalan CO₂ miktarı ve aşırı ışık yüklenmesiyle moleküler oksijene elektronların transferi sonucunda O₂⁻ üretilir. PSI' de gerçekleşen bu üretim Mehler reaksiyonu olarak adlandırılır (Asada, 2006). Zara bağlı bakır/çinko süperoksitdismutaz (Cu/ZnSOD) PSI yakınlarında süperoksit radikalini H₂O₂' ye dönüştürür ve zara bağlı tillakoidal askorbatperoksidaz ise (tylAPX) H₂O₂' yi suya çevirir (su-su döngüsü) (bkz.Şekil 1.9). Bu işlemler süresince, AsA monodehidroaskorbat (MDHA) radikale yükseltgenir. MDHA, ferrodoksinin indirgenmesiyle (Miyake and Asada, 1994; Rizhsky, Liang and Mittler, 2003) ya da monodehidroaskorbatredüktaz (MDHAR) enziminin katalizlemesiyle NAD(P)H ile tekrar AsA' ya indirgenir (Sano *et al.*, 2005; Asada 2006). Dehidroaskorbat (DHA), MDHAR'ın MDHA'nın AsA'ya indirgeyemediği durumlarda üretilir. DHA, GSH'ı elektron vericisi olarak kullanan DHA redüktaz (DHAR)'ın katalizlediği reaksiyonlarda AsA' ya indirgenir. Tioredoksinlerle (Trx) beraber tillakoid zarlarında yer alan peroksiredoksinler (PrxRler) kloroplastlarda fotokimyasal olarak üretilen H₂O₂'nin detoksifikasyonu için alternatif bir su-su döngüsü ile antioksidatif korunma sağlarlar (Dietz *et al.*, 2006). Prx ve Trx' in oksidatif stres boyunca önemli rollere sahip olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir (Rey *et al.*, 2005; VieiraDosSantos ve Rey, 2006).

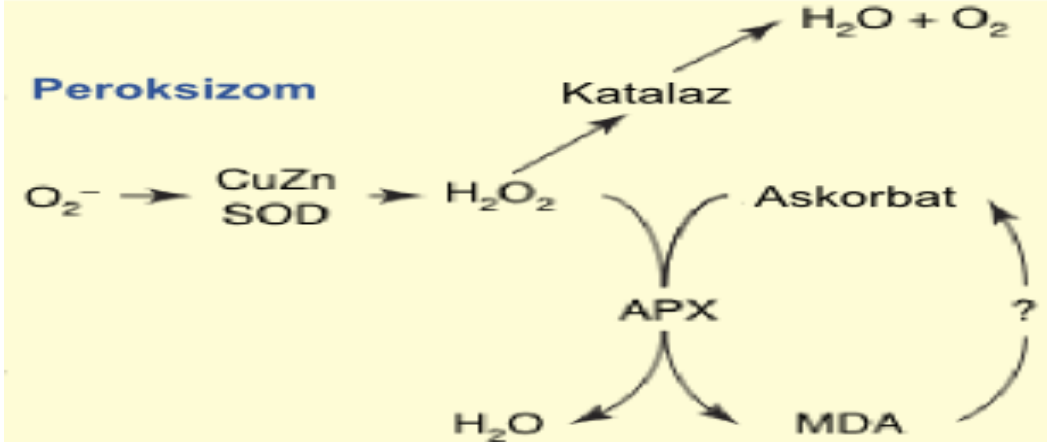
Tekli oksijen (¹O₂), klorofilin üçlü uyarılmış hali nedeniyle P680 reaksiyon merkezinde ve elektron taşıma zincirinde aşırı yüklenme olduğunda ışık yakalama komplekslerinde üretilir (Asada, 2006). ¹O₂ lipid peroksidasyonuna ve dokularda hasara yol açar (Moller *et al.*, 2007; Triantaphylides *et al.* 2008). Ayrıca fotooksidatif stresin, Arabidopsis yapraklarında aşırı lipid peroksidasyonunu ¹O₂' e bağlı olarak arttırdığı gösterilmiştir (Triantaphylides *et al.*, 2008).



Şekil 1.9: Kloroplastlarda ROS düzenlemesini (Mittler *et al.*, 2004)

1.5.2. Peroksizomlar

Peroksizomlarda çeşitli metabolik olaylar sonucu yüksek miktarda H₂O₂ ve O₂⁻ üretilmektedir. ROS' ların miktarı ise üretim ve süpürülme arasındaki ince çizgide dengede tutulur. Stomaların kapanmasıyla mezofil hücrelerinde CO₂/ O₂ oranı azalmaktadır ve bunun yol açtığı fotorespirasyon ile kloroplastlardaki glikolat üretimi artış göstermektedir. Glikolatın glikolatoksidaz enziminin peroksizomlarda ki oksidasyonu fotorespirasyon sırasında H₂O₂ üretimine sebep olmaktadır (Noctor *et al.* 2002; Karpinski *et al.* 2003). Peroksizomlardaki H₂O₂ üretiminin diğer kaynakları ise yağ asitlerinin β-oksidasyonu, flavinoksidaz yolu ve süperoksit radikalinin dismutasyonudur (Corpas *et al.*, 2001; Palma *et al.*, 2009). Peroksizomlarda bulunan ve H₂O₂' nin detoksifikasyonunda iş gören ana enzim CAT' dır (Mittler *et al.* 2004; Vandena-beele *et al.*, 2004). Ayrıca APX ve AsA-GSH döngüsü, H₂O₂' nin peroksizomlarda süpürülmesi işlemini gerçekleştirir (Jimenez *et al.*, 1997) (bkz. Şekil 1.10). O₂⁻ peroksizomlarda ksantinoksidaz (XOD) enziminin işlevi sonucunda oluşur ve SOD O₂⁻' yi O₂ ve H₂O₂' ye dönüştürür (del Rio *et al.*, 1996; Corpas *et al.*, 2001).

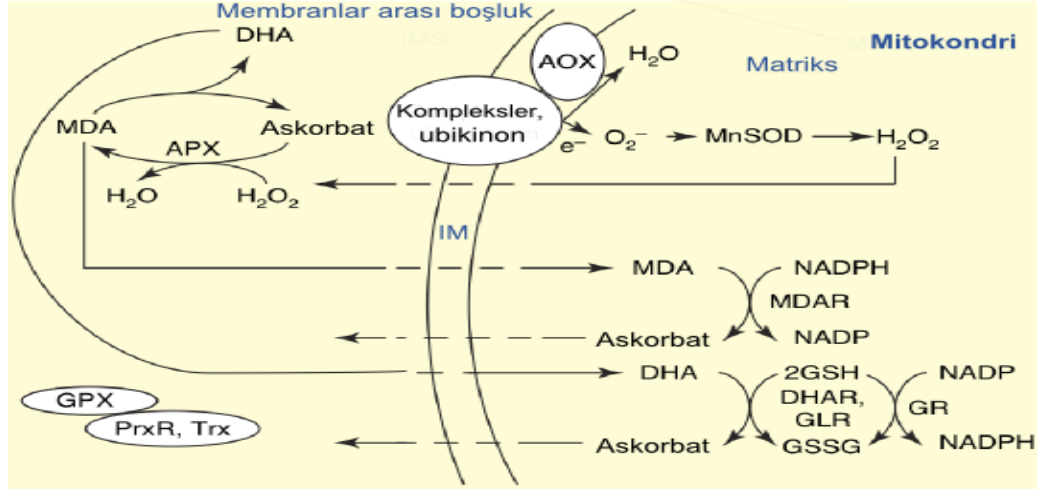


Şekil 1.10: Peroksizomlarda ROS düzenlenmesi (Mittler *et al.*, 2004)

1.5.3. Mitokondri

Mitokondriler, kloroplast ve peroksizomlara göre daha az miktarda ROS üretirler (Foyer and Noctor, 2005; Rhoads *et al.*, 2006). Mitokondride, elektron taşıma zincirindeki kompleks I ve kompleks III, ROS üretiminin ana merkezleridir (Moller 2001; Rhoads *et al.*, 2006; Moller *et al.*, 2007). Ubisemikion, kompleks I ve kompleks III arasındaki geçiş formudur. Elektronları oksijene taşır. Ayrıca O_2^- üretir ve sonuçta H_2O_2 'yi indirger (Raha and Robinson, 2000; Rhoads *et al.*, 2006).

Kuraklık stresi boyunca mitokondride ROS üretimi artar (Pastore *et al.*, 2007). Bu artışın nedeni ise mitokondri elektron taşıma zincirindeki dalgalanmaların ubikinon (UQ) havuzunu aşırı yüklemesi ve ROS üretimine sebep olmasıdır (Rhoads *et al.*, 2006). Atkinand Macherel (2009)'a göre, kuraklık stresi altında solunum hızı yükselir. Çünkü, kloroplastlardaki ATP üretiminin azalmasını karşılamak için mitokondriyal ATP isteğinde bir artış görülür. Mitokondriyal alternatif oksidaz (AOX) ve mangan SOD (Mn-SOD) bu sinyal yolunu kontrol etmede anahtar enzimlerdir (Foyer ve Noctor, 2005) (bkz. Şekil 1.). AOX, UQ havuzunun indirgenme durumunun düzenlenmesinde ve mitokondrideki ROS üretiminin azaltılmasında rol oynar. Mn-SOD ise O_2^- 'yi H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürür (Moller, 2001; Rhoads *et al.*, 2006).



Şekil 1.11: Mitokondride ROS düzenlenmesi (Mittler *et al.*, 2004)

1.5.4. Apoplast

Güncel çalışmalar apoplastın, absisik aside yanıtta ve kuraklık, tuzluluk gibi çevresel faktörlere karşı koyma süresinde önemli bir H_2O_2 üretim merkezi olduğunu ortaya koymuştur (Hernandez *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; Jubany-Mari *et al.*, 2009). *AtRbohD* ve *AtRbohF*, mezofil hücrelerinde ve bekçi hücrelerindeki iki ana NADPH oksidazı kodlayan genlerdir ve ABA-tarafından uyarılan stoma kapanması için gerekli olan apoplastik ROS üretiminden sorumludurlar (Kwak *et al.*, 2003; Torres ve Dangl, 2005). Diğer apoplastik ROS üreten enzimler hücre duvarıyla ilişkisi oksidaz ve peroksidazlar ve poliamin oksidazlardır (Mittler, 2002; Moschou *et al.*, 2008).

1.6. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemi

Enzimatik olmayan antioksidanlardan biri olan askorbik asit (AsA), bitkilerde gelişme ve büyüme düzenlenmelerinde aldıkları roller nedeniyle çok yüksek miktarda sentezlenmektedirler. Düşük miktarda askorbat sentezleyen *Arabidopsis* mutantlarında yavaş büyüme, ve geç çiçeklenme fenotipi gözlenmiştir, askorbat sentezinin tamamen ortadan kaldırılması ise bitkilerde ölümcüldür (Dowdle *et al.*, 2002). Askorbat sentezleyemeyen bitkilerin hayatta kalamaması askorbat'ın bitki büyümesi, gelişmesi, metabolizması ve savunma sistemlerinde önemli bir yere sahip olduğunu göstermiştir (Noctor and Foyer, 1998, Smirnoff *et al.*, 2001). Askorbat'ın bitkideki miktarı ve redoks durumu, bitkide büyüme ve gelişmenin denetlenmesiyle ilişkilidir (Barth *et al.*, 2004).

Ayrıca, askorbatın, dehidroaskorbat'a (DHA) yükseltgenmesinin (AsA/DHA oranının düşmesi) hücre döngüsünü yavaşlattığı bilinmektedir (De Gara and Tomassi, 1999). Bitkilerdeki pek çok rolünün yanında askorbat aynı zamanda gen ifadesini yöneten bir sinyal molekülüdür (Pastori et al., 2003, Kiddle et al., 2003). Askorbat yetersizliğinde yaprak hücrelerinde özel transkriptler oluşmaktadır (Pastori ve ark. 2003). Diğer yandan askorbat, bitkisel hormon metabolizması ve düzenlenmesi ile de ilişkilidir. Örneğin, askorbat, ABA sentezi ve sinyali ile stoma açılması gibi ikincil etkiler de de yer alır (Maggio *et al.*, 2002). Bunların yanında askorbat'ın oksitlenme durumu (Asa/DHA) hücrenin redoks durumunu değiştirebilir, bu özelliği nedeniyle aynı zamanda bir redoks arayüzü görevi de üstlenmektedir (de Pinto *et al.*, 1999).

Diğer bir enzimatik olmayan antioksidan, yüksek konsantrasyonlarda protein dışı thiol gruplarının varlığı aerobik metabolizma ile yakından ilişkilidir, ve neredeyse bütün ökaryotlarda bu thiol gruplarının büyük kısmı glutatyondur (GSH) (Fahey, 2001). Bitkilerde glutatyonun thioldisülfitin tamponlaması, peroksidaz ve glutaredoksin için substrat oluşturması, kükürt asimilasyonu ve depolanması gibi görevleri vardır (Foyer and Noctor, 2009). Askorbat gibi, GSH dokularda çok yüksek miktarda indirgenmiş olarak bulunur. GSH havuzu askorbat-glutatyon döngüsü aracılığı ile H_2O_2 ' ye bağlanır (Foyer ve Halliwell 1976). Bu döngüde oksitlenmiş olan dehidroaskorbat (DHA) GSH' ı substrat olarak kullanan dehidroaskorbatredüktaz (DHAR) tarafından indirgenir, ve bu reaksiyon GSH' ın oksitlenerek glutatyondisülfit (GSSG) oluşturmasına sebep olur. Bu döngü mitokondri ve peroksizomlardahil olmak üzere birçok hücre kompartımanında mevcuttur (Chew *et al.*, 2003) . Hücrede H_2O_2 üretiminin artması, genel olarak GSH havuzunda bir artışa ve GSSG birikimine neden olur (Vanacker, 2000). GSH/GSSH oranı kadar, GSH redoxpotansiyelide, toplam GSH havuzunun büyüklüğünden etkilenmektedir. GSH/GSSH oranının değişmesi hücrenin redoks potansiyeli de değişmesine, bu da thiol içeren proteinlerin modifiye edilerek aktivitelerinin düzenlenmesine neden olur (Foyer and Noctor, 2005). Genetik ipuçları glutatyon konsantrasyonlarının meristem fonksiyonu, ışık sinyalleme, ve patojenlere karşı oluşturulan cevapta önemli olduğunu göstermiştir (Ball *et al.*, 2004; Dron *et al.*, 1988; Frendo *et al.*, 2005; Kurepa *et al.*, 1998; May *et al.*, 1996). Sonuç olarak yukarıda tanımlanan enzimatik ve

enzimatik olmayan ROS süpürme mekanizmaları, tüm hücre bölmelerinde vardır. Bu da hücrenin yaşamını sürdürmesinde ROS detoksifikasyonunun ne denli önemli olduğunu göstermektedir (Mittler *et al.*, 2009).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Deneme Deseni

2.1.1. Tohumların temini

Cleome gynandra tohumları Cambridge Üniversitesi'nden Dr. Julian Hibberd, *Clome spinosa* tohumları ise Kahramanmaraş Üniversitesi'nden Yrd. Doç. Dr. Ferit Kocaçınar tarafından temin edilmiştir.

2.1.2. Tohum sterilizasyonu

Tohumlar 5 dk. boyunca %1 sodyum hipoklorit çözeltisi ile yüzey sterilizasyonuna maruz bırakılmıştır. Bunun ardından 5 kez steril deiyonize su ile yıkanmıştır.

2.1.3. Tohumların çimlendirilmesi

Tohumların çimlendirilmesi petri kaplarında gerçekleştirilmiştir. Yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlar 10 cm çapındaki petrilere filtre kağıdı üzerinde çimlendirilmiştir. Petri şeklinde kesilmiş filtre kağıtlarından 3 kat kullanılmıştır. Her petriye 8 ml steril deiyonize su eklenmiş ve pens yardımı ile tohumlar petrilere yerleştirilmiştir. Ekimin ardından petri kaplarının etrafı Parafilm® ile sarılmıştır. Bu petriler karanlıkta, 20/30 °C (16/8 h) değişen sıcaklıklarda 5 gün inkübatörde bekletilmiştir (Ochuodho *et al.*, 2006). Bu süreç sonunda çimlenmiş olan tohumlar denemenin ileriki aşamalarında kullanılmıştır. Ekim işlemi, çimlenme sırasındaki kontaminasyonu engellemek için steril kabinde yapılmış ve kullanılan petri, filtre kağıdı ve pensler 170 °C' de 2 saat sterilize edilmiştir.



Şekil 2.1 Petri kabında çimlendirilmiş *C. gynandra* tohumları.

2.1.4. Büyüme koşulları ve Mn uygulamaları

Çimlenmiş tohumlar İçinde sadece perlit bulunan saksılara aktarılmıştır. Bitkiler 16/8 saat (aydınlık/karanlık) ışık periyodunda, 25°C sıcaklıkta, %60-70 nem içeren ortamda floresan ışık yardımı ile büyütülmüştür. Saksılar 2 günde bir yarım kuvvet Hoagland solüsyonu ile sulanmışlardır (Hoagland and Arnon, 1950). Sulama İşlemi 1 ay süre ile devam etmiştir. 1 ay sonunda bitkilere yarım kuvvet Hoagland solüsyonu içerisinde 0, 10, 50 ve 100 μM Mn uygulaması yapılmıştır. Uygulamanın devamında 21. günde bitkiler hasat edilmiştir. Antioksidan Enzim ve ROS analizleri için gerekli örnekler sıvı azotta dondurulmuştur. Bu örnekler analizlere kadar -80 °C' de saklanmıştır. Mn içeriği ölçümü için gerekli örnekler etüvde kurulmuştur.

2.2. Biyokimyasal parametreler

2.2.1. H₂O₂ miktarı

H₂O₂ miktarı Liu *et al.* (2010)' a göre bazı değişikliklerle belirlenmiştir. Analizde kullanılacak örnekler analize kadar sıvı azot içinde muhafaza edilmiştir. Eğer örnekler, -80 °C veya -20 °C derecede saklanırsa H₂O₂ miktarında 1 haftada %60' a varan kayıplar gözlenebilmektedir (Cheeseman, 2006). 0,1 g bitki örneği sıvı azotta toz haline getirildikten sonra 3 ml soğuk aseton (-20 °C) ile homojenize edilmiş ve 3000 g de 4 °C' de 10 dk. santrifüj yapılmıştır. Elde edilen süpernatanttan 1 ml alınmış ve üstüne 0,1 ml titanyum reaktifi (konsantre HCl içinde %20 titanyum tetraklorür) ve 0,2 ml eklenerek, titanyum-peroksit komplekslerinin oluşturulması ve çöktürülmesi sağlanmıştır. Reaksiyon karışımı 16000 g' de 4 °C' de 10 dk. santrifüj yapılmış, ve pellet soğuk aseton (-20 °C) ile yıkanmıştır. Eğer ilk yıkamanın ardından pellet temiz değilse yıkama tekrarlanabilmektedir. Bunun ardından pellet 2 ml 1M H₂SO₄' te çözünmüştür. Çözeltilerin absorbansı 410 nm' de su köre karşı okunmuştur. H₂O₂ konsantrasyonları miktarları bilinen H₂O₂ ile hazırlanmış standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

2.2.2. Antioksidant enzim ekstraksiyonu ve aktivite analizleri

Bu aşamadaki bütün işlemler proteaz aktivitesini minimum seviyede tutmak için 4 °C' de gerçekleştirilmiştir. Protein ve enzim ekstraktlarının hazırlanması için 0,1 gr yaprak örneği ilk olarak sıvı azotta ezilerek toz haline getirilmiştir. Bunun ardından 0,25 ml ekstraksiyon tamponunda (50 mMTris-HCl pH 7.8, 0,1 mM ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA), 0,2% (v/v) Triton-X100, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), and 2 mM dithiothreitol (DTT)) homojenize edilmiştir. Askorbatperoksidaz aktivitesi analizi için homojenizasyon tamponuna 5 mM askorbik asit eklenmiş ve DTT yerine %2 (w/v) PVPP kullanılmıştır. Homojenizasyonun ardından örnekler 14000 g' de 20 dk. santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra elde edilen süpernatantlar protein miktarı ve enzim aktivitesi belirlenmesinde kullanılmıştır. Analizler sırasında örneklerin tekrar tekrar donup çözülmesini engellemek için elde edilen süpernatant ayrı

ependorflara pay edilerek saklanmıştır.

2.2.2.1 Protein miktarının belirlenmesi

Protein miktarı Bradford (1976)' a göre belirlenmiştir. Ölçüm Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının asidik şartlarda proteine bağlandığında kırmızı ve/veya yeşil formundan maviye dönüşmesine dayanmaktadır. Bu mavi renk oluşumu 595 nm' de ölçülmüştür. Standart olarak bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır. Standart aralığı 0,02 – 0,2 mg/ml' dir. Bitki ekstraktlarının protein miktarları elde edilen bu standart ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır.

2.2.2.2 Askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APX (EC 1.11.1.11)) aktivitesi Nakano ve Asada (1981)' e göre belirlenmiştir. Ölçüm, askorbatın oksitlenmesine bağlı olarak 290 nm' deki absorbansın azalmasının izlenmesine dayanmaktadır. Reaksiyon karışımı 0,1 mM EDTA, 0,1 mM H₂O₂ ve 0,5 mM Askorbat içeren 50 mM potasyum fosfat tamponudur (pH 7,0). Oksitlenen askorbat miktarı, ekstinksiyon katsayısı 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ kullanılarak hesaplanmıştır. Enzimin, 1 mg total protein başına dakikada oksitlediği askorbat miktarı, 1 U (μmol askorbat mg protein⁻¹ min⁻¹) olarak hesaplanmıştır.

2.2.2.3 Glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Glutatyon redüktaz (GR (EC 1.6.4.2)) aktivitesi Foyer ve Halliwell (1976)' ya göre ölçülmüştür. Yöntem GSSG' yi redüklemek için GR tarafından oksitlenen NADPH' ın izlenmesine dayanır. Reaksiyon karışımı 0,5 mM GSSG, 0,12 mM NADPH içeren 25 mM sodyum fosfat (pH 7.8) tamponudur. NADPH oksidasyonu 340 nm' de takip edilmiştir. Oksitlenen NADPH miktarı ekstinksiyon katsayısı 6.2 mM⁻¹ cm⁻¹ kullanılarak belirlenmiştir. Enzimin, 1 mg total protein başına dakikada oksitlediği NADPH miktarı, 1 U (μmol NADPH mg protein⁻¹ min⁻¹) olarak hesaplanmıştır.

2.2.2.4 Dehidro askarboat redüktaz (DHAR) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Dehidro Askarboat Redüktaz (DHAR) (EC 1.8.5.1) enzim aktivitesi, Nakano and Asada (1981)' ya göre ölçülmüştür. Reaksiyon karışımı 50 mM Potasyum-Fosfat (K-P) tampon (pH 7), 2,5 mM Glutasyon (GSH), 0,2 mM Dehidro askorbat ve 0,1 mM EDTA içermektedir. Yöntem DHAR enziminin Glutasyon kullanarak Dehidroaskorbatı Askorbat'a dönüşümüne ve Askorbatın 265 nm de ölçümüne dayanır. Askorbatın ekstinksiyon katsayısı $0,98 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak belirlenmiştir.

2.2.2.5 Monodehidro askorbat redüktaz (MDHAR) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Monodehidro Askarboat Redüktaz (MDHAR) (EC 1.6.5.4) enzim aktivitesi, O. Arrigoni ve S. Dipierro'ya Göre 340 nm de ölçülmüştür. Reaksiyon karışımı 50 mM Potasyum-Fosfat (K-P) tampon (pH 7), 0,2 mM NADH, 1 mM Askorbik Asit (AsA) ve 1 unit Askorbat oksidaz (AO) içermektedir. Askorbat Oksidaz, Askorbatı kullanarak Monodehidro Askorbat (MDA) oluşturur. Daha sonra Monodehidro Askorbat Redüktaz NADPH'ı kullanarak MDA'ı Askorbata dönüştürür. 340 nm de NADH ölçümü gerçekleştirilir. NADH'in ekstinksiyon katsayısı $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak belirlenmiştir..

2.2.3. Antioksidant enzimlerin izoenzim tayini

Örneklerden elde edilen protein ekstraktları denaturasyona sebep olmayan koşullarda (SDS içermeyen) poliakrilamid jel elektroforezinde (Native-PAGE) ayrılmış ve araştırılan enzimlere özel boya solüsyonlarıyla boyanmıştır. Örneklerin hazırlanmasında aktivite analizlerinde kullanılan ekstraksiyon prosedürü kullanılmıştır. Native-PAGE Laemmli (1970)'e göre SDS kullanılmadan yapılmıştır.

Jeller Vilbert Lourmat jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve Bio-Profil Bio-1D V11.9 yazılımı kullanılarak bant yoğunlukları analiz edilmiştir.

2.2.3.1 Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzim tayini

Örnekler %12.5' lik ayırma (separating) ve %4' lük hizalama (stacking) jelinde elektroforetik ayırma maruz bırakılmıştır. Her kuyucuğa 50 µg protein yüklenmiştir. SOD boyaması, Beauchamp ve Fridovich'e (1971) göre riboflavin ve nitrobluetetrazolium (NBT) boyası ile belirlenmiştir. Riboflavin ışıkla birlikte süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) üretme özelliğine sahiptir, üretilen $O_2^{\cdot-}$ NBT yi oksitleyerek mavi-mor renkte formazan oluşumuna sebep olur. Boyamanın prensibi jel üzerinde SOD lokalize olmuş bölgelerde NBT oksitlenmesinin inhibisyonu ile beyaz bantlar oluşmasının sağlanmasıdır. Jeller 60 dk karanlıkta boya solüsyonunda bekletildikten sonra ışık altında çalkalanarak bantların oluşması beklenmiştir.

SOD' un izoenzim tipleri Vitória *et al.* (2001)' e göre boya solüsyonuna inhibitörler eklenerek belirlenmiştir. Cu/ZnSOD inhibisyonu için 2 mM KCN, Cu/ZnSOD ve FeSOD inhibisyonu içinde 3 mM H_2O_2 kullanılmıştır. MnSOD aktivitesi her iki inhibitörden de etkilenmemektedir.

2.3. Fotosentetik Parametreler

Fotosentetik parametrelerin tespitinde Walz GFS-3000 taşınabilir gaz değişimi ölçüm cihazı kullanılmıştır. Aşağıda ki parametrelerin ölçümü yapılmıştır.

- 1- Stomatal İletkenlik($mmol\ m^{-2}s^{-1}$) = GH_2O (g_s)
- 2- Fotosentez Hızı ($\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$) = A
- 3- F_v/F_m (Fotosistem II' deki maksimum kuantum verimliliği)
- 4- Elektron Taşınım Oranı ($\mu mol/(m^2\ s)$) = ETR
- 5- Fotokimyasal Olmayan Söndürme = NPQ

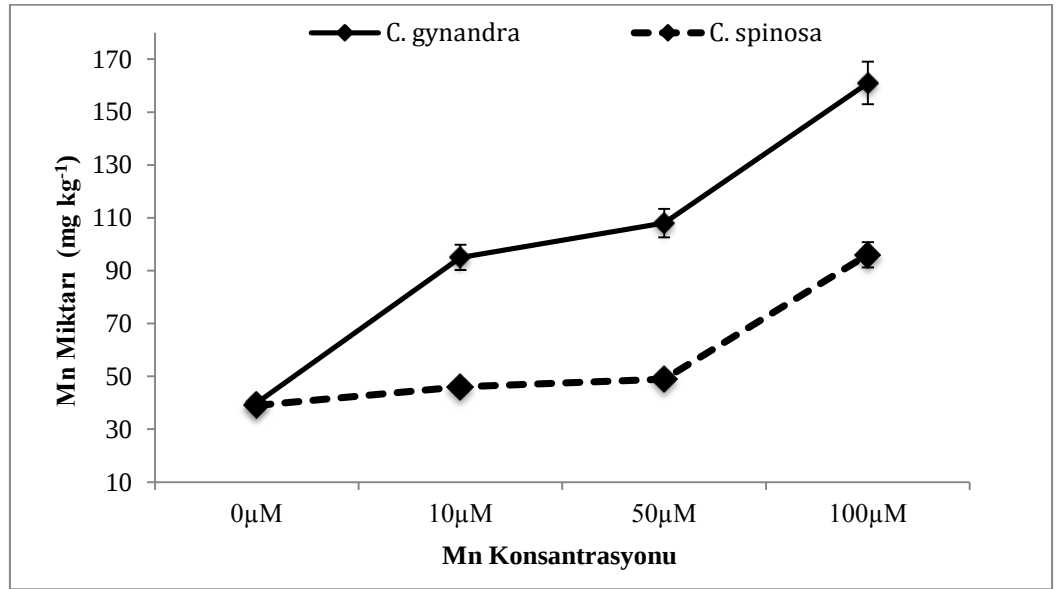
2.4. Mn Miktarının Belirlenmesi

Mn içeriğinin belirlenmesi, Zarcinas et al., (1987)' e göre yapılmıştır. Örnekler' in üzerine 1 ml H_2O_2 ve 4 ml HNO_3 eklenmiş ve bir süre bekletilmiştir. Daha sonra deiyonize su ile 25 ml' ye tamamlanarak, tüplere alınmış ve 30 dk. süre ile mikrodalga fırında yakılmıştır. Yakma işleminin ardından soğumaya bırakılmış ve devamında ise ICP-OES spektrometresinde ölçüm işlemi gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Mn İçeriği (mg kg^{-1})

C. spinosa (C3) ve *C. gynandra* (C4)'nın Mn miktarı dışarıdan uygulanan Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak artmıştır. Her iki tür içinde en yüksek Mn miktarı, 100 μM Mn uygulanmış bitkilerde tespit edilmiştir. Ancak aynı Mn konsantrasyonunda *C. gynandra*'nın Mn miktarı, *C. spinosa*'ya göre %67 daha fazladır. Benzer olarak, 10 ve 50 μM Mn uygulaması heriki türde Mn miktarında artışa sebep olmuş ve bu artış 50 μM için *C. gynandra*'da %62 iken *C. spinosa*'da %20' dir. Diğer yandan Mn uygulaması yapılmayan *C. spinosa* ve *C. gynandra*'nın Mn miktarlarının aynı olduğu tespit edilmiştir (40 mg kg^{-1}).

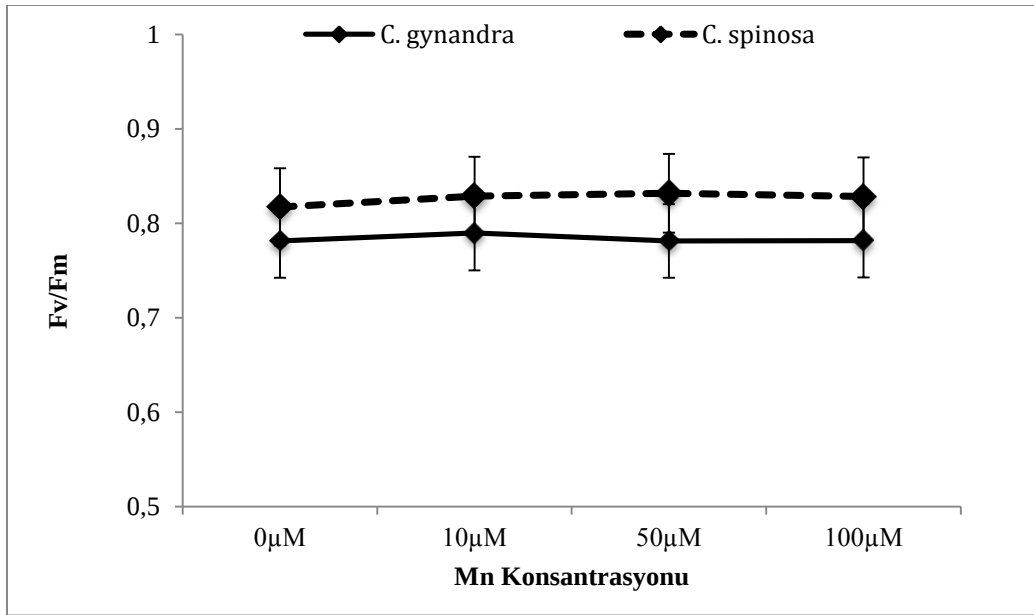


Şekil 3.1: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak *C. spinosa* ve *C. gynandra* bitkilerinde Mn içeriği.

3.2. Fotosentetik Parametreler

3.2.1. Klorofil floresansı

Mn uygulaması, *C. gynandra* ve *C. spinosa*'nın F_v/F_m (Fotosentez II maksimum kuantum verimliliği) değerlerini etkilememiştir.



Şekil 3.2: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak *C. spinosa* ve *C. gynandra* bitkilerinde F_v/F_m miktarının değişimleri.

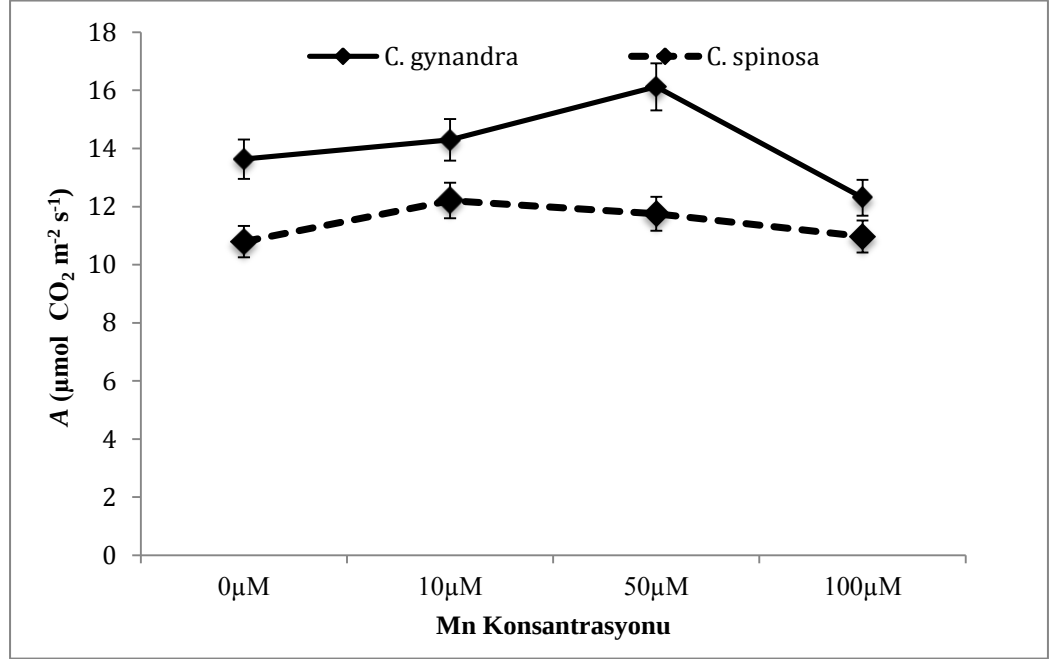
3.2.2. Fotosentez hızı

C. spinosa'da en yüksek fotosentez hızı 10 µM'da, en düşük fotosentez hızı ise 0 µM'da gözlemlenmiştir. 10 µM'a göre 0, 50 ve 100 µM'da sırası ile fotosentez hızı %20, %3,8 ve %11,3 azalmıştır (Bkz. Şekil 3.3).

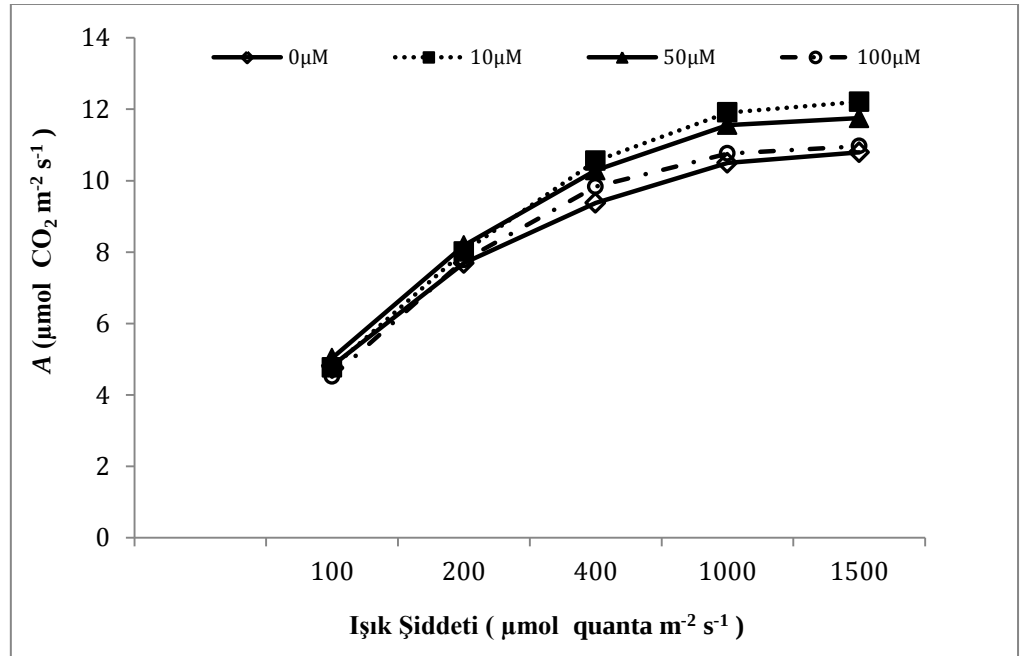
C. spinosa'nın aksine *C. gynandra*'da en yüksek fotosentez hızı 50 µM'da, en düşük fotosentez hızı ise 100 µM'da gözlemlenmiştir. 50 µM'a göre 0, 10 ve 100 µM gruplarında sırası ile fotosentez hızı %19, %11,4 ve %33 azalmıştır (Bkz. Şekil 3.3).

İki bitkinin maksimum fotosentez hızları (*C. spinosa* için 10 µM, *C. gynandra* için 50 µM) karşılaştırıldığında *C. gynandra*'nın %25 oranında daha

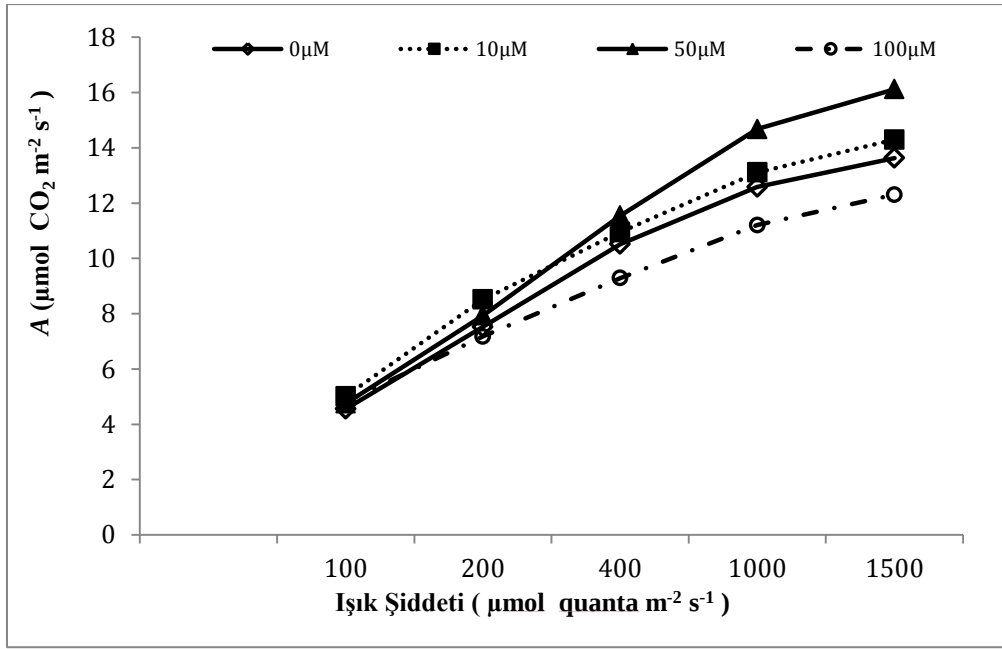
fazla fotosentez hızına sahip olduğu belirlenmiştir. Her iki bitkinin farklı ışık şiddetlerinde ki fotosentez hızları şekil 3.4 ve 3.5' te verilmiştir.



Şekil 3.3: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak *C.spinosa* ve *C. gynandra* bitkilerinde net fotosentez hızında meydana gelen değişimler.



Şekil 3.4: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak *C.spinosa* bitkisinin farklı ışık şiddetlerinde ki net fotosentez hızında meydana gelen değişimler.

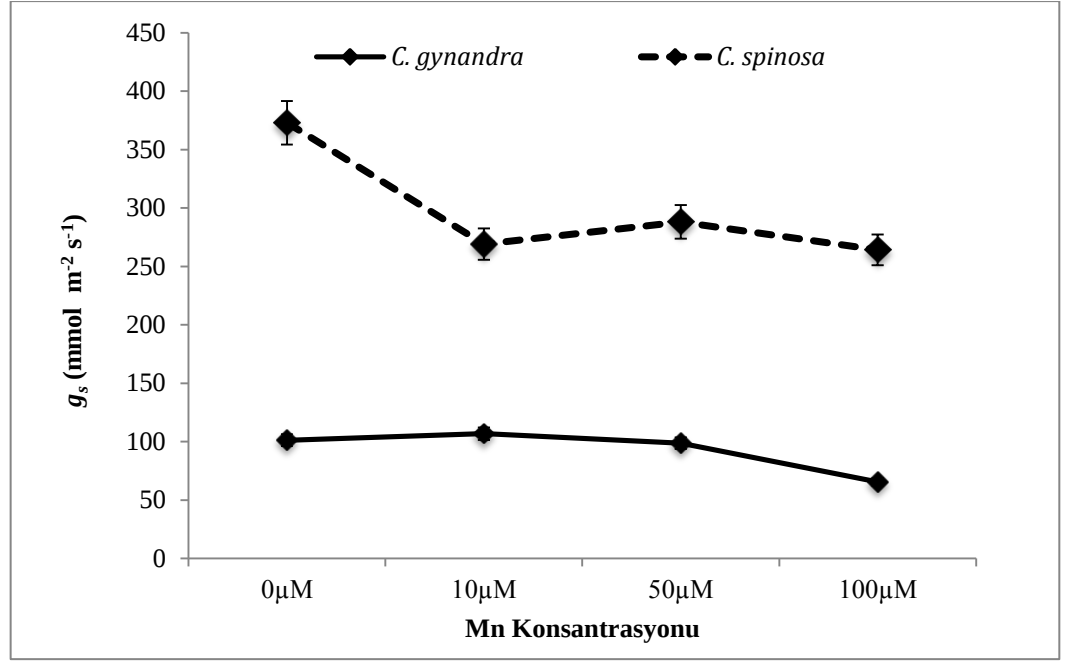


Şekil 3.5: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak *C.gynandra* bitkisinin farklı ışık şiddetlerinde ki fotosentez hızında meydana gelen değişimler.

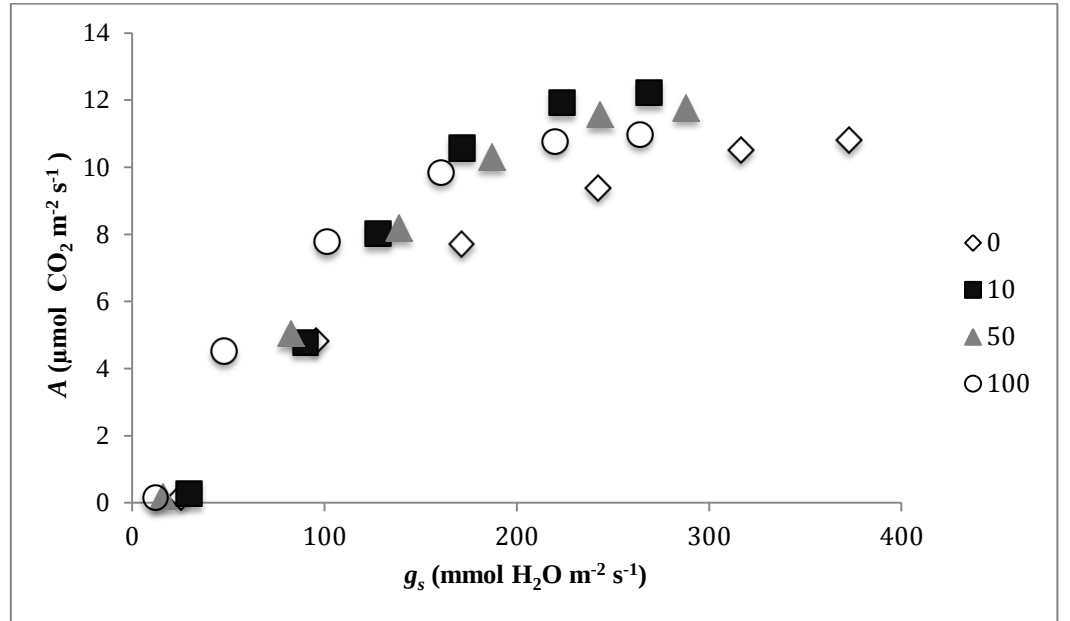
3.2.3. Stomatal iletkenlik

Mn uygulaması yapılmayan (0 μM) *C. spinosa*'nın stoma iletkenliği 372 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ iken *C. gynandra*'nın 102 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Uygulanan Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak ise her iki türün stomatal iletkenliği azalmıştır. 0 μM ile karşılaştırıldığında bu azalma, 10 μM Mn uygulanmış *C. spinosa*'da %38 iken *C. gynandra*'da %5' dir. Her iki türde en düşük stoma iletkenliği, en yüksek Mn uygulamasında (100 μM) gözlenmiştir.

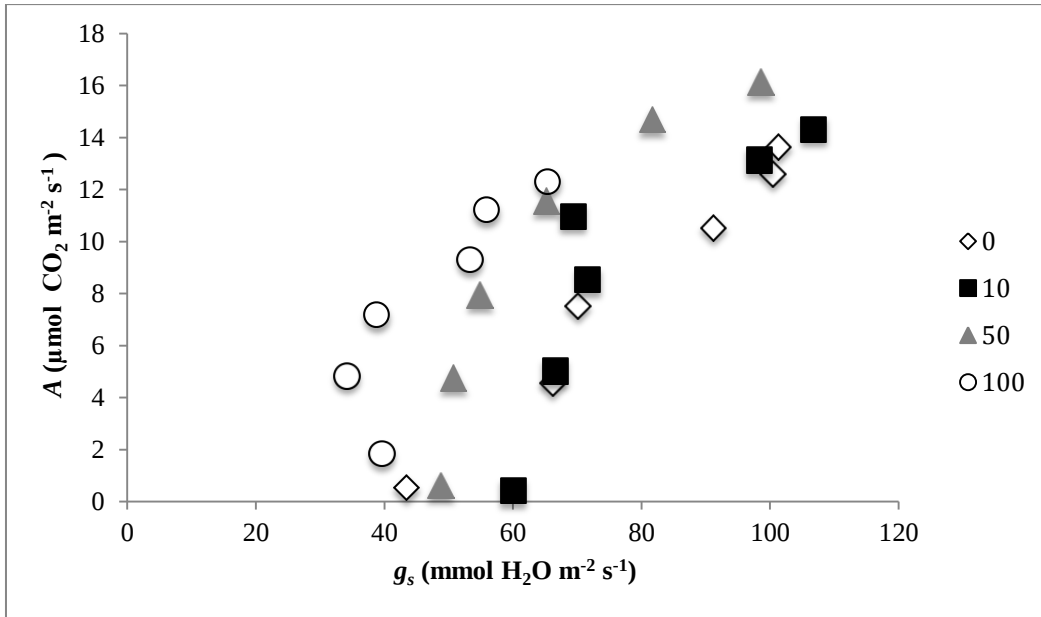
Her iki bitkininde fotosentez hızlarına karşı stomatal iletkenlikleri Şekil 3.7 ve 3.8' de verilmiştir.



Şekil 3.6: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak *C.spinosa* ve *C. gynandra* bitkilerinde stomatal iletkenliklerinde meydana gelen değişimler.



Şekil 3.7: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak *C. spinosa* bitkisinin fotosentez hızı ile stomatal iletkenliği arasındaki ilişki.

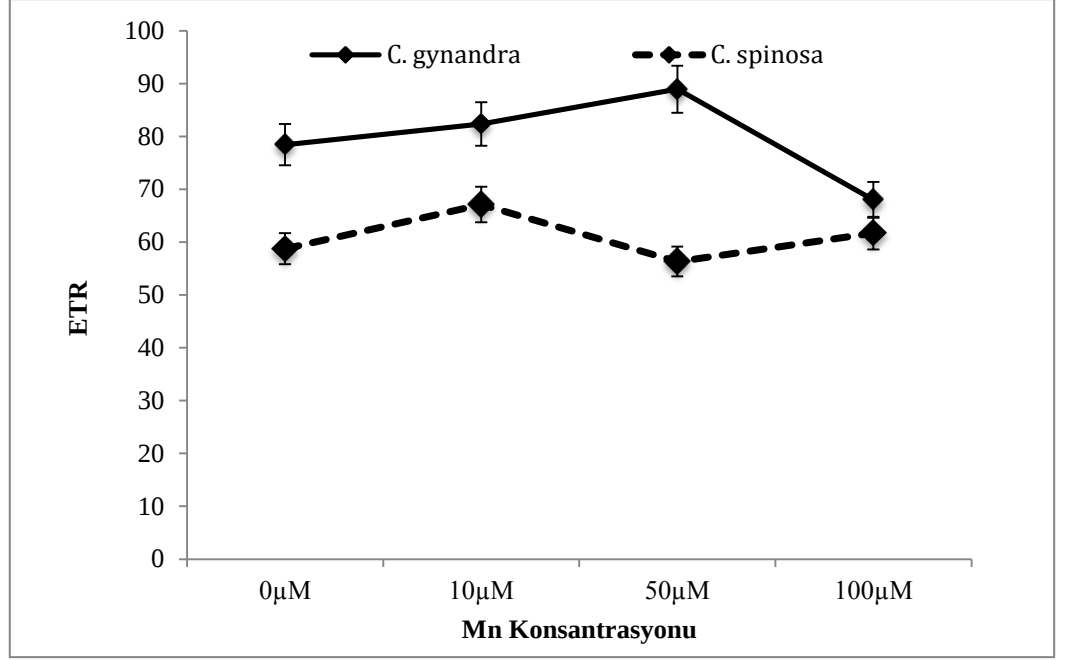


Şekil 3.8: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak *C.gynandra* bitkisinin fotosentez hızı ile stomatal iletkenliği arasındaki ilişki.

3.2.4. Elektron taşınım oranı

Fotosentez hızına benzer olarak; *C. spinosa*’da, en yüksek ETR 10 μM’da gözlenmiştir. Ayrıca 0 ve 50 μM uygulanmış grupların elektron taşınım oranlarının benzer olduğu bulunmuştur. 10 μM’a göre bu iki grupta ki ETR oranı, %17, 100 μM da ise %9’ azalmıştır.

C. spinosa’dan farklı olarak *C. gynandra*’da en yüksek ETR, 50 μM Mn uygulamasında gözlenmiştir. Ancak 50 μM’a göre 100 μM’da ETR %30,7 azalmıştır.

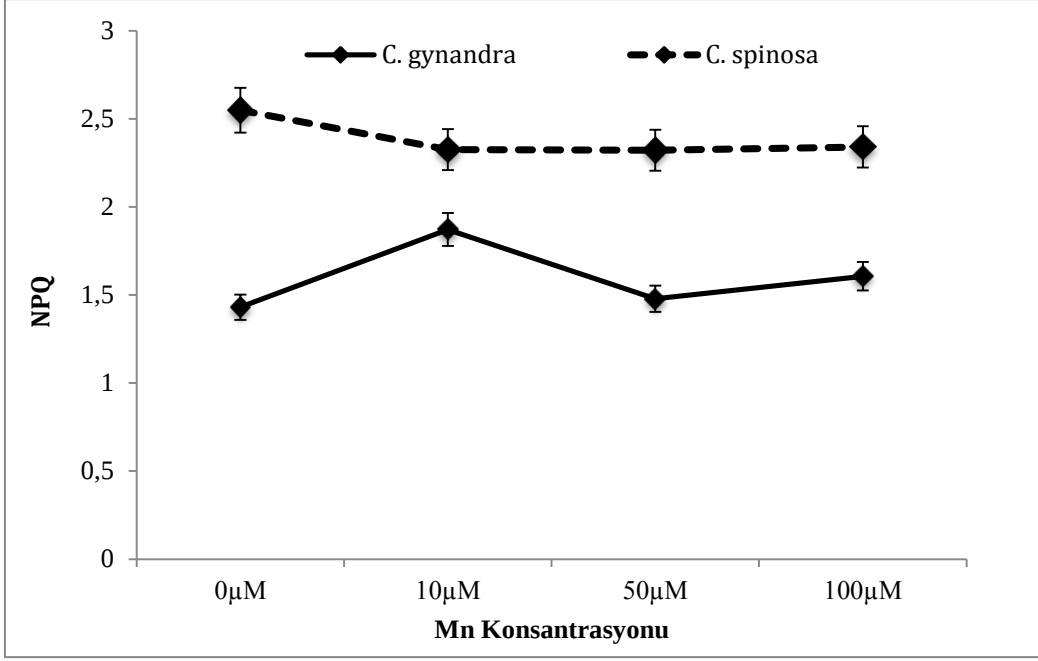


Şekil3.9: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağı olarak *C.spinosa* ve *C. gynandra* bitkilerinde elektron taşıma oranlarında meydana gelen değişimler.

3.2.5. Fotokimyasal olmayan söndürme

C. spinosa’ da, uygulanan Mn miktarında ki artış ile fotokimyasal olmayan söndürmede (non-photochemical quenching (NPQ)) 0 µM, 10 µM ve 50 µM da düşüş gerçekleşmiştir. En fazla fotokimyasal olmayan söndürme ise 0 µM’ da gözlenmiştir.

C. spinosa’ dan farklı olarak *C. gynandra* da, en yüksek fotokimyasal olmayan söndürme 10 µM’ da gözlenmiştir. 0 µM ve 50 µM gruplarının fotokimyasal olmayan söndürme oranları birbirine benzerdir. Bu gruplarda ki NPQ oranı 10 µM’ a göre %27 azalırken, 100 µM’ da %16 azalmıştır.



Şekil3.10: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak *C.spinosa* ve *C. gynandra* bitkilerinde fotokimyasal olmayan söndürme seviyelerinde meydana gelen değişimler.

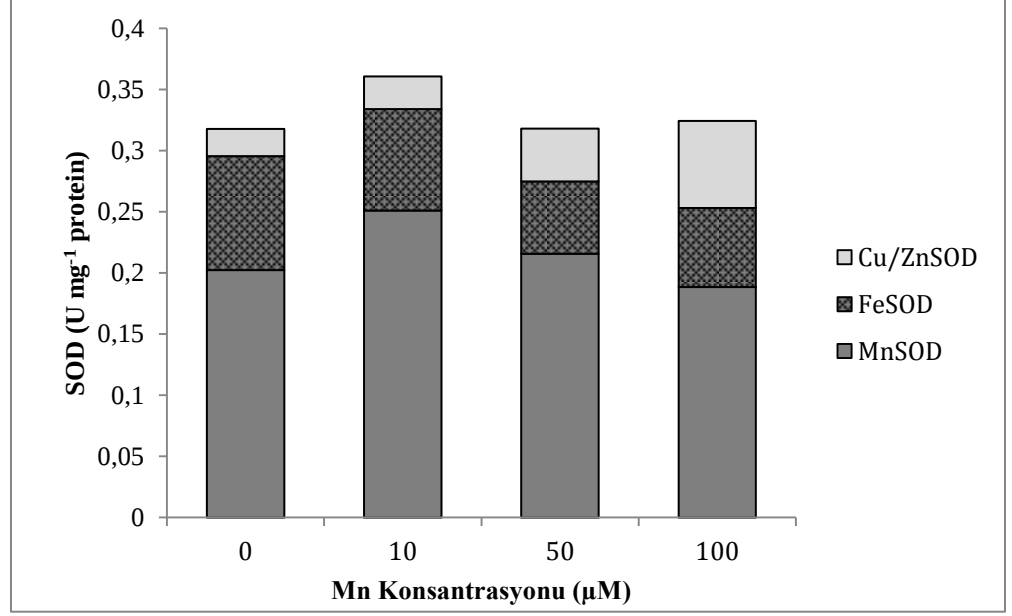
3.3. Enzim ve İzoenzim Aktiviteleri

3.3.1. SOD aktivitesi ve izoenzimleri

SOD enzimine ait elektroforetik ayırmda Mn uygulaması sonucunda *C. spinosa*' da 5 farklı SOD izoenzimi (MDSOD1, FeSOD1, FeSOD2, Cu/ZnSOD3, Cu/ZnSOD6), *C. gynandra*' da ise 6 farklı SOD izoenzimi (MnSOD2, Cu/ZnSOD1, Cu/ZnSOD2, Cu/ZnSOD4, Cu/ZnSOD5, Cu/ZnSOD7) belirlenmiştir.

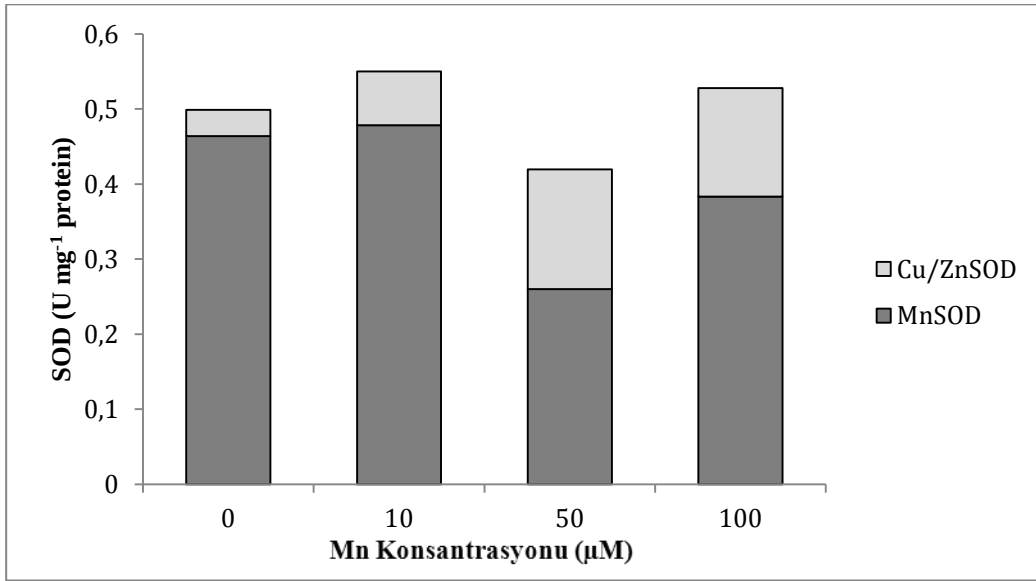
MnSOD1 10, 50 ve 100 µM gruplarında uygulanan Mn konsantrasyonlarda ki artışa bağlı olarak azalmıştır *C. spinosa*' da en yüksek MnSOD1 aktivitesi, 10 µM' da, en düşük ise 100 µM' da gözlenmiştir. MnSOD1 aktivitesi 10 µM' a göre 0, 50 ve 100 µM' da sırası ile %25, %19 ve %16 azalmıştır. MnSOD1' in aksine, toplam Cu/ZnSOD aktivitesi ise 10, 50 ve 100 µM gruplarında uygulanan Mn konsantrasyonlarda ki artışa bağlı olarak artmıştır. En yüksek Cu/ZnSOD3 ve Cu/ZnSOD6 aktivitesi 100 µM' da, en düşük ise 0 µM' da belirlenmiştir. Cu/ZnSOD3 aktivitesi 100 µM Mn uygulaması ile karşılaştırıldığında 0 ve 10 µM' da 3 kat artarken 50 µM' da 1,5 kat artmıştır. Cu/ZnSOD6 aktivitesi ise 100 µM

Mn uygulaması ile karşılaştırıldığında 0 ve 10 μM ' da 3,5 ve 2 kat artarken 50 μM ' da 1,5 kat artmıştır. En yüksek FeSOD aktivitesi, 0 μM ' da en düşük ise 50 μM ' da belirlenmiştir.

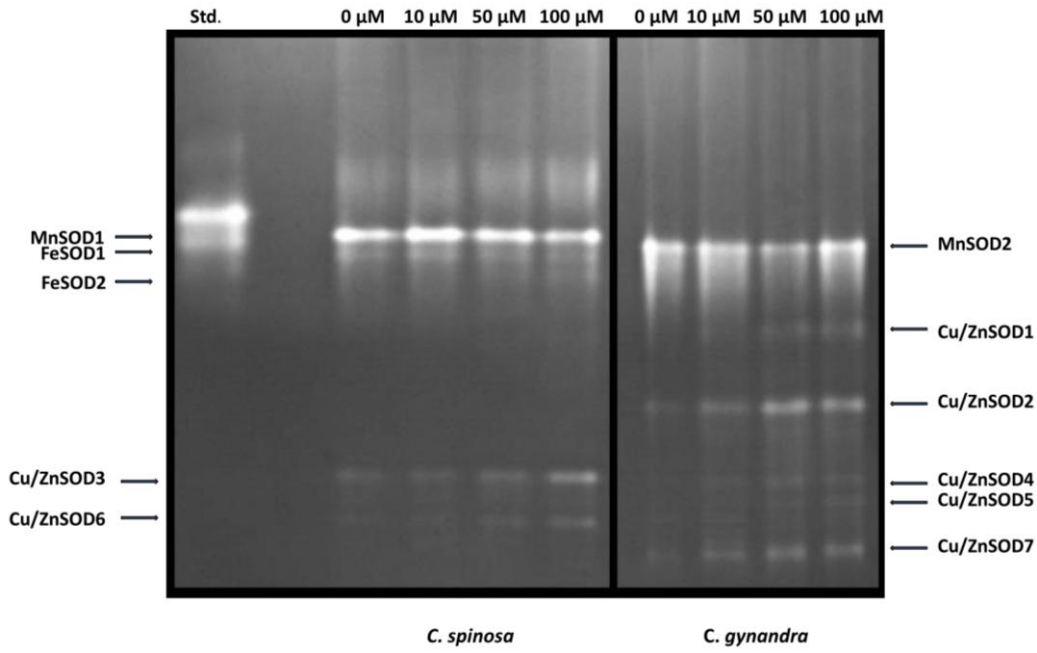


Şekil 3.11: *C. spinosa* bitkisinin SOD izoenzimleri, ve bu izoenzimlerin aktivitesinin uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak değişimleri.

C. spinosa'nın MnSOD1 aktivitesine benzer olarak; *C.gynandra*'da da MnSOD2 aktivitesi en yüksek 10 μM ' da belirlenmiştir, ancak *C. spinosa*'dan farklı olarak en düşük aktivite 50 μM ' da belirlenmiştir. MnSOD2 aktivitesi 10 μM 'a göre 0, 50 ve 100 μM ' da sırası ile %2, %44 ve %28 azalmıştır. *C. gynandra*'da, toplam Cu/ZnSOD aktivitesi en yüksek 50 μM ' da, en düşük ise 0 μM ' da belirlenmiştir. Cu/ZnSOD1 aktivitesi sadece 50 ve 100 μM ' da belirlenmiştir, bu izoenzimin aktivitesi 100 μM ' da 50 μM ' a göre %33 artmıştır. En yüksek Cu/ZnSOD2 aktivitesi 50 μM ' da belirlenmiş ve 0, 10 ve 100 μM ' a göre sırası ile 50 μM ' da 7, 2 ve 1,5 kat artmıştır. Cu/ZnSOD1'e benzer olarak Cu/ZnSOD4 izoenzimi 50 ve 100 μM ' da görülmüştür, bu izoenzimin aktivitesi 50 μM ' da 100 μM ' a göre %50 artmıştır. Cu/ZnSOD1 ve Cu/ZnSOD4'e benzer olarak Cu/ZnSOD5 izoenzimi, sadece 50 ve 100 μM ' da belirlenmiş, 100 μM ' da 50 μM ' a göre %41 artmıştır. En yüksek Cu/ZnSOD7 aktivitesi 50 μM ' da belirlenmiş ve 0, 10 ve 100 μM ' a göre sırası ile 50 μM ' da 1,8, 1 ve 1,3 kat artmıştır.



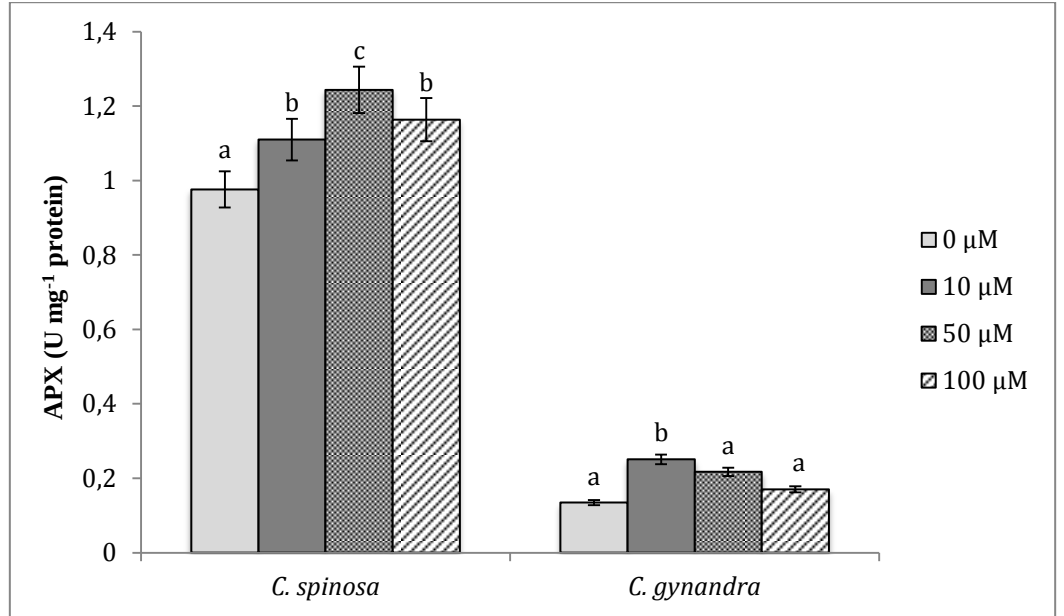
Şekil 3.12: *C. gynandra* bitkisinin SOD izoenzimleri, ve bu izoenzimlerin aktivitesinin uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak değişimleri.



Şekil 3.13: *C. spinosa* ve *C. gynandra* bitkilerinin SOD izoenzimleri, ve bu izoenzimlerin aktivitesinin uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak değişimleri.

3.3.2. APX aktivitesi

C. spinosa' da en yüksek APX aktivitesi, 50 μM Mn uygulanan grupta belirlenmiştir. 0 μM , 10 μM ve 100 μM Mn uygulanmış bitkilerin APX aktivitesi 50 μM 'a göre sırasıyla %27, %12 ve %6,8 azalmıştır. *C. gynandra*' da en yüksek APX aktivitesi 10 μM ' da gözlenmiştir. Diğer yandan uygulanan Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak APX aktivitesi azalmıştır. Mn uygulanmamış bitkilerin APX aktivitesi ise 10 μM grubuna göre %92 azalırken, 50 ve 100 μM 'a göre sırasıyla %53 ve %30 azalmıştır. İki bitkinin bazal seviyeleri karşılaştırıldığında, APX aktivitesinin *C. spinosa*' da daha fazla olduğu görülmektedir.

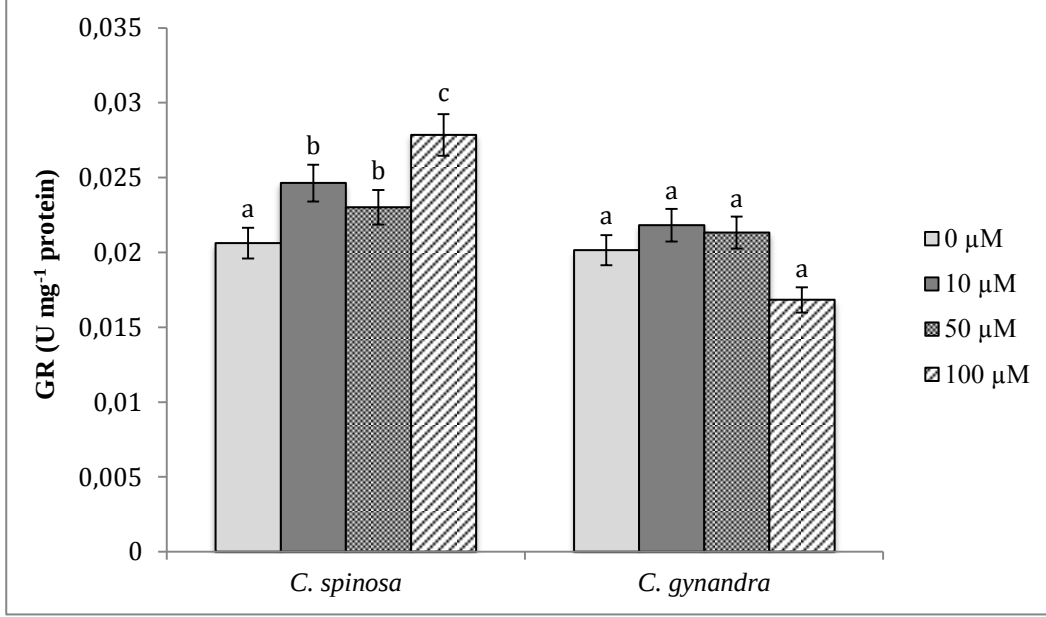


Şekil 3.13: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak *C. spinosa* ve *C. gynandra* bitkilerinde APX aktivitesinin değişimleri. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$).

3.3.3. GR aktivitesi

C. spinosa' da en fazla GR aktivitesi 100 μM uygulama grubunda belirlenmiştir. 0 μM , 10 μM ve 50 μM uygulama gruplarının GR aktivitesi ise 100 μM grubuna göre sırası ile %35, %12,5 ve %17 azalmıştır. 0 μM , 10 μM ve 50 μM Mn uygulaması *C. gynandra*'nın GR aktivitesinde herhangi bir değişikliğe

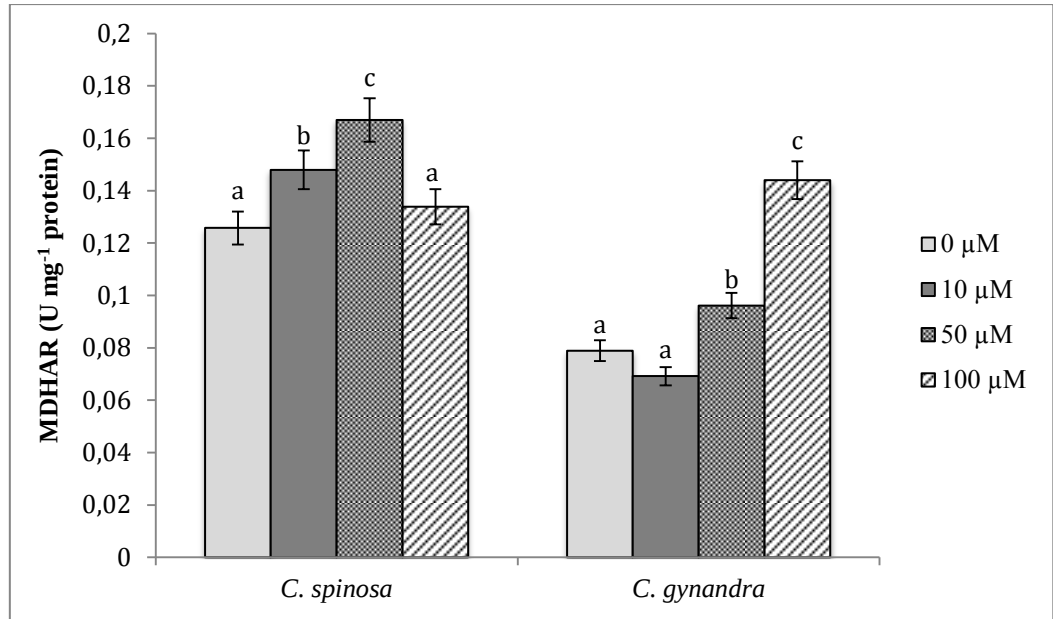
neden olmamıştır. Ancak 100 μM Mn, diğer gruplarla karşılaştırıldığında GR aktivitesini belirgin olarak azaltmıştır.



Şekil 3.14: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak *C.spinosa* ve *C. gynandra* bitkilerinde GR aktivitesinin değişimleri. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p<0.05$).

3.3.4. MDHAR aktivitesi

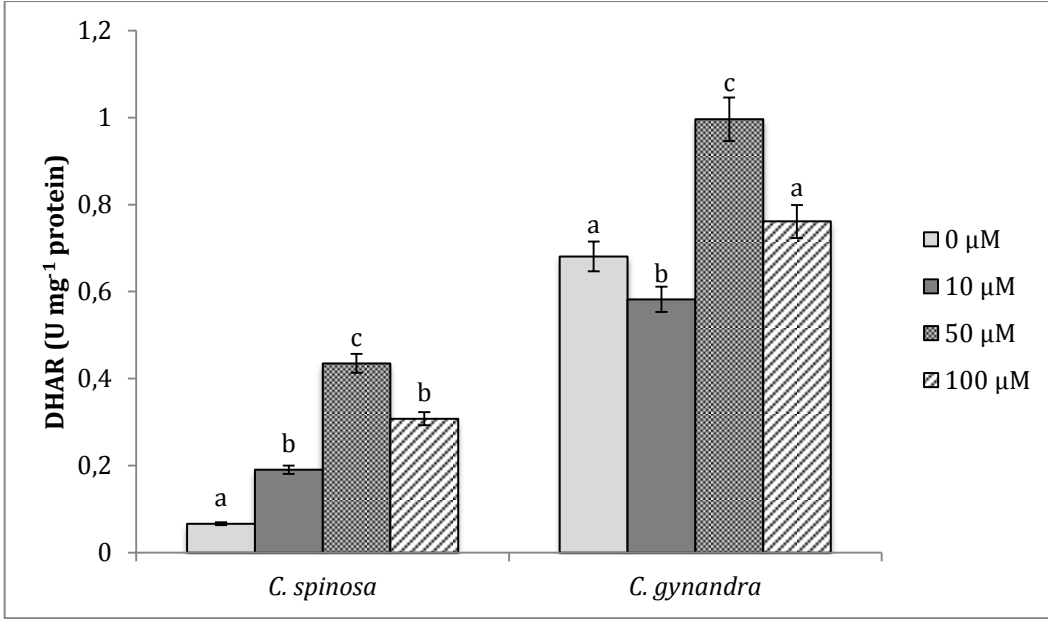
C. spinosa' da, Mn uygulama miktarında ki (0 10 ve 50 μM) artışa bağlı olarak MDHAR aktivitesi artmıştır. Ancak 100 μM Mn uygulaması, MDHAR aktivitesini azaltmıştır. MDHAR aktivitesinin en yüksek olduğu 50 μM grubu ile karşılaştırıldığında 100 μM Mn, MDHAR aktivitesini % 23 azaltmıştır. *C. gynandra*' da, en düşük MDHAR aktivitesi 0 ve 10 μM uygulama gruplarında gözlenirken en yüksek aktivite 100 μM grubunda gözlenmiştir. 10 μM ' a göre 100 μM ' da MDHAR %57 artmıştır. İki bitkinin MDHAR aktivitesi karşılaştırıldığında *C. spinosa*' nın (100 μM hariç) MDHAR aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.15: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak *C.spinosa* ve *C. gynandra* bitkilerinde MDHAR aktivitesinin değişimleri. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p<0.05$).

3.3.5. DHAR aktivitesi

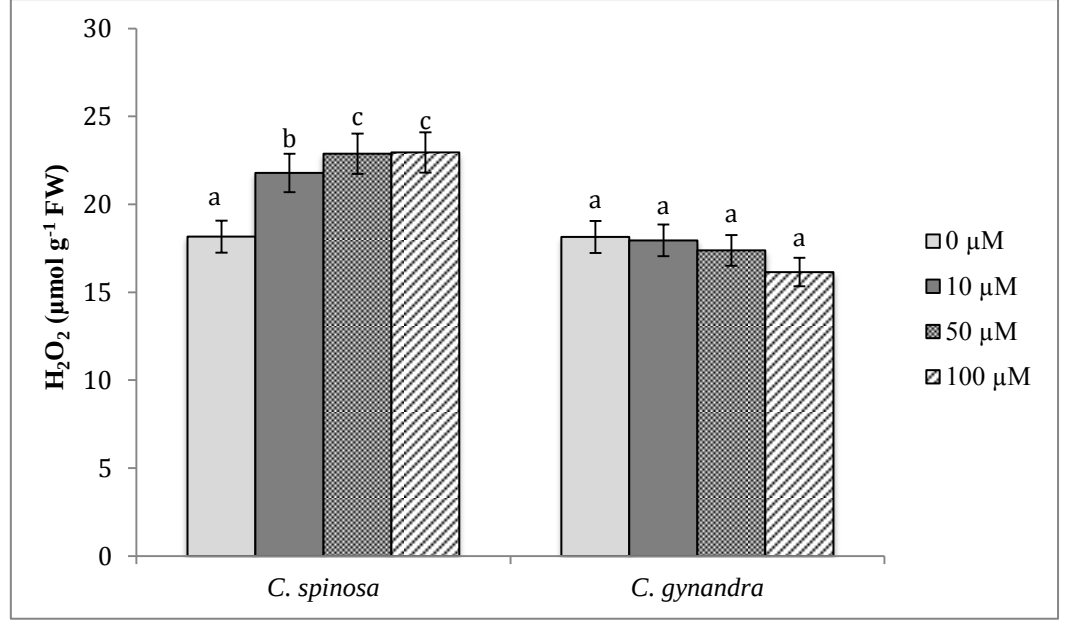
C. spinosa' da, Mn uygulama miktarında ki (0 10 ve 50 μM) artışa bağlı olarak DHAR aktiviteside artmıştır. En yüksek DHAR aktivitesi, MDHAR aktivitesine benzer olarak 50 μM uygulama grubunda gözlenmiştir. Ancak 100 μM Mn uygulaması 0 ve 10 μM ' a göre MDHAR aktivitesini %80 ve %36 arttırırken da 50 μM ' a göre %43 azalmıştır. *C. gynandra*' da en fazla DHAR aktivitesi 50 μM , en düşük aktivite 10 μM ' da gözlenmiştir. 10 μM ' a göre 0 μM , 50 μM ve 100 μM ' da sırası ile DHAR aktivitesi %14, %44 ve %26 artmıştır. İki bitkinin DHAR aktivitesi karşılaştırıldığında *C. gynandra*' nın DHAR aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.16: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak *C.spinosa* ve *C. gynandra* bitkilerinde DHAR aktivitesinin değişimleri. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).

3.3.6. H₂O₂ miktarı

C. spinosa bitkilerinin H₂O₂ miktarı Mn konsantrasyonunda ki (0 10 ve 50 μM) artışa bağlı olarak artmıştır. 100 μM Mn uygulaması, 10 ve 50 μM' a göre H₂O₂ miktarını %5 ve %3 artırmıştır. *C. spinosa* 'nın aksine *C. gynandra* ' da H₂O₂ miktarı Mn uygulaması ile değişmemiştir.

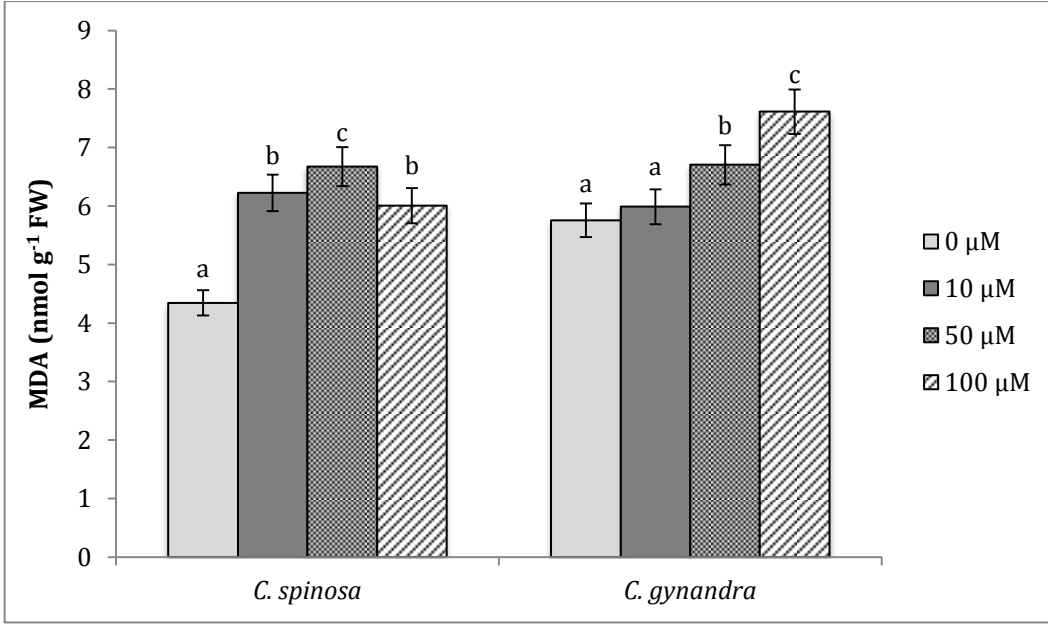


Şekil 3.17: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak *C. spinosa* ve *C. gynandra* bitkilerinde H_2O_2 değişimleri. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$)

3.3.7. Lipid peroksidasyonu

C. spinosa' da en yüksek lipid peroksidasyonu 50 μM , en düşük ise 0 μM uygulama grubunda gözlenmiştir. 10 μM , 50 μM ve 100 μM Mn uygulamasıyla hücrelerin lipid peroksidasyonu seviyeleri değişmemiştir. Ancak Mn uygulaması yapılmayan bitkilerdeki lipid peroksidasyon seviyesi, 10 μM 'a göre %46 azalmıştır.

C. gynandra'nın, lipid peroksidasyonu seviyeleri, Mn uygulama miktarında ki artışa bağlı olarak artmıştır. 0 μM ile 10 μM arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak 100 μM 'da lipid peroksidasyon seviyesi 10 μM 'a göre %21 oranında artmıştır.



Şekil 3.18: Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak *C.spinosa* ve *C. gynandra* bitkilerinde TBARS miktarının değişimleri. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$)

4. TARTIŞMA

Farklı Mn konsantrasyonlarının C₃ ve C₄ bitkilerinin fotosentez mekanizması üzerindeki etkileri daha önce NAD-ME C₄ bitkileri olan *Pennisetum glaucum*, *Amaranthus hypochondriacus*, NADP-ME C₄ bitkileri olan *Zea mays*, *Sorghum bicolor* ve C₃ bitkisi olan *Triticum aestivum*, *Cucurbita pepo*' da çalışılmıştır (Kering *et al.*, 2008). Bu çalışmanın sonucunda, farklı Mn konsantrasyonlarının C₃, NADP-ME tipi C₄ ve NAD-ME tipi C₄ bitkileri üzerinde farklı etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca *Oryza sativa*, *Citrus grandis* ve tütün bitkilerinde de Mn eksikliği ve toksisitesinin antioksidant sistem üzerindeki etkileri de belirlenmiştir (Srivastava and Dubey ,2011; Li *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 1998). Araştırmamızda ise aynı cinse ait, karboksilasyon yolları farklı, iki ayrı tür kullanılarak (*C. spinosa*- C₃ ve *C. gynandra*-C₄) Mn eksikliğin ve toksisitesinin benzer genetik temele sahip bitkilerin fotosentez mekanizmaları üzerindeki etkisi, antioksidan savunma sistemi ile ilişkilendirilerek çalışılmıştır.

Dışarıdan Mn uygulamasının, Mn içeriği üzerine etkisi ile ilgili olarak C₃ bitkisi olan *Vitis vinifera*' da yapılan çalışmada, Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak Mn içeriğinin arttığı belirlenmiştir (Yao *et al.*, 2012). Aynı şekilde, C₄ bitkisi olan *Zea mays*' da da Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak Mn içeriğinin arttığı belirlenmiştir (Kering *et al.*, 2008). Benzer olarak çalışmamızda hem C₃ bitkisi olan *C. spinosa*' da hemde C₄ bitkisi olan *C. gynandra*' da Mn konsantrasyonunda ki artışa paralel olarak Mn içeriğinin arttığı belirlenmiştir.

Klorofil floresans parametrelerinden biri olan Fv/Fm, fotosistem II (PSII)' nin stres altında gördüğü hasarı belirlemek için kullanılmaktadır. PSII' de oluşan hasar çeşitli mekanizmalarla giderilmezse fotoinhibisyona sebep olmaktadır. PSII' nin fotosentetik verimi kuraklık, tuzluluk gibi çevresel faktörler ile düşmektedir (Flanagan and Jefferiers, 1988). C₄ bitkilerinin, C₃ bitkileri ile karşılaştırıldıklarında aşırı foton yüklemesinden kaynaklanan strese bağlı inhibisyonu daha iyi engelledikleri bilinmektedir (Nayyar and Gupta, 2006). Fv/Fm ile ilgili olarak C₃ bitkisi olan çeltikte yapılan bir çalışmada Mn

konsantrasyonunda ki azalmaya veya artışa bağlı olarak F_v/F_m değerinde önemli bir değişiklik görülmemiştir (Lidon *et al.*, 2004). C_4 bitkilerinde Mn uygulaması sonucunda F_v/F_m değerinde ki değişiklikler ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu verilere benzer olarak çalışmamızda C_3 bitkisi olan *C. spinosa*' da ve C_4 bitkisi olan *C. gynandra*' da uygulanan Mn konsantrasyonunda ki değişime bağlı olarak F_v/F_m değerinde önemli bir fark gözlenmemiştir.

Fotosentez çevresel faktörlerden en çok etkilenen metabolik süreçlerden biridir. Fotosentez hızı ile ilgili olarak, C_3 karboksilasyon yoluna sahip olan *Triticum aestivum*' da, Mn konsantrasyonunda ki azalmaya bağlı olarak fotosentez hızı $5 \mu M$ ' da en yüksek seviyeye ulaşmış daha sonrasında ise düşüş gözlenmiştir (Kering *et al.*, 2008). Çalışmamızda C_3 bitkisi olan *C. spinosa*' da ise en yüksek fotosentez hızı $10 \mu M$ ' da belirlenmiştir. C_3 bitkisi olan *Triticum aestivum* ile yapılan çalışmada, fotosentez hızının Mn' ın aşırı birikimi sonucunda bir noktaya kadar ($80 \mu M$) artış gösterdiği ancak bu noktadan sonra düştüğü belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada C_3 özelliklerine sahip olan *Cucurbita pepo*' da artan Mn konsantrasyonuna bağlı olarak fotosentez hızında düşüş gözlenmiştir (Kering *et al.*, 2008). Literatüre paralel olarak çalışmamızda C_3 bitkisi olan *C. spinosa*' da fotosentez hızı $10 \mu M$ Mn uygulamasıyla karşılaştırdığımızda artan Mn konsantrasyonu ile 50 ve $100 \mu M$ da düşmüştür. C_4 özelliği gösteren *Pennisetum glaucum*' da $50 \mu M$ Mn konsantrasyonuna kadar fotosentez hızının arttığı ancak bu noktadan sonra düştüğü belirlenmiştir (Kering *et al.*, 2008). Aynı şekilde *C. gynandra*' nın fotosentez hızı $50 \mu M$ Mn uygulamasına kadar artış göstermiş sonrasında düşüş gözlenmiştir. C_3 bitkileri ile karşılaştırıldığında *C. gynandra* gibi C_4 NAD-ME bitkilerinin yüksek Mn konsantrasyonlarında daha verimli fotosentez yapabilmeleri Mn' nın NAD-ME dekarboksilasyon enziminin bir kofaktörü olmasına bağlanabilmektedir.

Stomatal iletkenlik (g_s), özellikle C_3 bitkilerinde gaz alışverişini etkileyerek fotosentez hızını belirleyen önemli bir etmendir. Lidon *et al.*, (2004) tarafından gerçekleştirilen çalışmada C_3 bitkisi olan *Oryza sativa*' ya 21 gün süre ile farklı konsantrasyonlarda ($0.125, 0.5, 2, 8, 32 \text{ mg l}^{-1}$) Mn uygulaması yapılmış ve 21. günde stomatal iletkenlik, elektron taşıyıcıları ve NPQ ölçülmüştür. 21. günde uygulanan Mn konsantrasyonunda ki azalmaya bağlı olarak 2 mg l^{-1} de stomatal

iletkenlik en yüksek seviyeye ulaşmış daha sonrasında ise düşüş belirlenmiştir (Lidon *et al.*, 2004). Çalışmamızda C_3 bitkisi olan *C. spinosa*' da Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak stomatal iletkenlikte $10 \mu\text{M}$ da düşüş gözlenirken daha sonrasında ise önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Kering *et al.*, (2008)' in çalışmasında, C_4 bitkisi olan *Sorghum bicolor*' da Mn konsantrasyonunda ki azalmaya bağlı olarak stomatal iletkenlikte düşüş gözlenirken Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak stomatal iletkenlikte bir noktaya kadar artış gözlenmiş ($5 \mu\text{M}$) ancak bu noktadan sonra düşüş olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada C_4 bitkisi olan *C. gynandra*' da, Mn konsantrasyonunda ki azalmaya bağlı olarak stomatal iletkenlikte önemli bir değişiklik (0 ve $10 \mu\text{M}$) gözlenmezken, Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı (50 ve $100 \mu\text{M}$) olarak stomatal iletkenlikte düşüş belirlenmiştir.

Uygulanan Mn konsantrasyonlarına bağlı olarak fotosentezde elektron taşınım oranı (ETR) ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Lidon *et al.*, (2004)' un yukarıda anlatılan çalışmasında 21. günde elektron taşıyıcıları (sitokrom *b*, *f* ve plastosiyanin) miktarı $0.5\text{-}2 \text{ mg l}^{-1}$ arasında en yüksek seviyeye ulaşmış sonrasında düşüş göstermiştir. Çalışmamızda C_3 bitkisi olan *C. spinosa*' da Mn konsantrasyonunda ki azalmaya veya artışa bağlı olarak $10 \mu\text{M}$ ' da en yüksek elektron taşınım oranı gözlenmiş sonrasında ise düşüş belirlenmiştir. Çalışmamızda C_4 bitkisi olan *C. gynandra*' da Mn eksikliğine bağlı olarak düşüş belirlenmiştir. Yine bu bitkide Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak elektron taşınım oranı bir noktaya ($50 \mu\text{M}$) kadar artmış ancak bu noktadan sonra düşüş göstermiştir.

C. spinosa ve *C. gynandra* bitkilerinin fotosentez hızına karşı stomatal iletkenlikleri arasındaki ilişki incelendiğinde özellikle iki nokta ilgi çekmektedir (Bkz. Şekil 3.7 ve 3.8). Dikkat çeken ilk nokta; *C. spinosa*' nın $0 \mu\text{M}$ grubunun stomatal iletkenliğinin, diğer gruplara göre yüksek olmasına rağmen ($10 \mu\text{M}$ ' göre %38 fazla) fotosentez hızının daha düşük olmasıdır. Bu veri göstermektedir ki fotosentez hızında ki azalma stomatal bir kısıtlamadan kaynaklanmamaktadır. Bu durum göze alındığında fotosentez hızında ki düşüş ışık reaksiyonları yada karbon reaksiyonlarında ki bir kısıtlamaya bağlanabilir.

0 μM grubunda fotosentez hızının en yüksek olduğu 10 μM grubuna göre ETR' de düşüş gözlenmesi ışık reaksiyonlarında bir aksama olduğunu göstermektedir. Dikkat çeken diğer bir nokta ise, *C. gynandra*' da 100 μM Mn uygulanmış grupta stomatal iletkenliğin yine diğer gruplara göre düşük olmasıdır (50 μM ' a göre %33,7 düşük). *C. gynandra*' da 100 μM Mn konsantrasyonunda fotosentez hızının düşmesi stomatal bir kısıtlamayı işaret etmektedir. Buna benzer olarak Suresh *et al.*, (1987) *Glycine max* bitkisinde yaptığı çalışmada artan Mn konsantrasyonu ile birlikte stomatal iletkenlikte azalma belirlemiştir. Buna ek olarak 100 μM ' da ETR' nin en düşük seviyede olması ışık reaksiyonlarında da bir aksama olduğunu göstermektedir.

Fotokimyasal olmayan söndürme (NPQ) ile ilgili olarak, C_3 bitkisi olan *Oryza sativa*' ya 21 gün süre ile farklı konsantrasyonlarda (0.125, 0.5, 2, 8, 32 mg l^{-1}) Mn uygulaması yapılmış ve 21. günde fotokimyasal olmayan söndürme seviyeleri ölçülmüştür. 21. günde, fotokimyasal olmayan söndürme 2 mg l^{-1} de en yüksek seviyeye ulaşmış sonrasında düşüş gözlenmiştir. Çalışmamızda C_3 bitkisi olan *C. spinosa*' da uygulanan Mn konsantrasyonunda ki düşüşe bağlı olarak fotokimyasal olmayan söndürmede artış belirlenmiştir. Aynı bitkide Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak fotokimyasal olmayan söndürmede düşüş gözlenmiştir. C_4 bitkilerinde Mn uygulaması sonucunda NPQ seviyelerindeki değişiklikler ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda C_4 bitkisi olan *C. gynandra*' da en yüksek fotokimyasal olmayan söndürmenin gözleendiği 10 μM ' a göre, uygulanan Mn konsantrasyonunda ki azalmaya veya artışa bağlı olarak, fotokimyasal olmayan söndürme seviyelerinde düşüş gözlenmiştir.

SOD, Mn eksikliği veya fazlalığının neden olduğu oksidatif strese karşı bitkilerin oluşturduğu antioksidant savunma sisteminde önemli bir yere sahiptir (Yu *et al.*, 1998; Millaleo *et al.*, 2010). Mn' nın aşırı birikimine karşı, bu enzimin aktivitesinin tetiklenmesi bitki savunmasındaki önemini belirtmektedir (Srivastava and Dubey, 2011). Yu *et al.* (1998)' un çalışmasında, Mn eksikliği olan tütünün (C_3) total SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre düştüğü gösterilmiştir. Benzer olarak; çalışmamızda C_3 bitkisi olan *C. spinosa*' da en

yüksek total SOD aktivitesinin görüldüğü 10 μM ' a göre, 0 μM ' grubunda total SOD aktivitesinde düşüş belirlenmiştir. Total SOD aktivitesinde ki bu düşüş SOD enziminin önemli bir kofaktörü olan Mn eksikliğine bağlanabilir. Sarita ve Dubey (2011)' in çalışmasında, C_3 bitkisi olan *Oryza sativa*' da Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak total SOD aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada bitkiler, Mn uygulamasının 10. ve 20. gününde analiz edilmiş, analizler sonucunda Mn uygulamasının 20. gününde bitkinin total SOD aktivitesinde 10. güne göre önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Sarita and Dubey, 2011). Başka bir C_3 türü olan asma (*Vitis vinifera*) da ise uygulanan Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak SOD enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir (Yao *et al.*, 2011). Bununla paralel olarak çalışmamızda, *C. spinosa*' da uygulanan Mn miktarının artmasıyla (50 ve 100 μM) total SOD aktivitesinde 10 μM ' a göre düşüş belirlenmiştir. C_4 bitkilerinde Mn uygulaması sonucunda total SOD aktivitesindeki değişiklikler ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. C_4 bitkisi olan *C. gynandra*' da uygulanan Mn konsantrasyonunda ki azalmaya bağlı olarak total SOD aktivitesinde düşüş belirlenmiştir. Ayrıca, *C. spinosa*' ya benzer olarak *C. gynandra*' da da uygulanan Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak total SOD aktivitesinde 10 μM ' a göre düşüş belirlenmiştir.

Mn' nın SOD izoenzimleri üzerine etkisi incelendiğinde, Srivastava and Dubey (2011) tarafından C_3 bitkisi olan çeltikte yapılan çalışmada uygulanan Mn konsantrasyonunda ki azalmaya bağlı olarak MnSOD, Cu/ZnSOD ve FeSOD da düşüş belirlenmiştir. Çalışmamızda C_3 bitkisi olan *C. spinosa*' da Mn konsantrasyonunda ki azalmaya bağlı olarak SOD izoenzimleri arasında MnSOD ve Cu/ZnSOD aktivitesinde 10 μM ' a göre düşüş görülürken, FeSOD' da artış belirlenmiştir. Srivastava and Dubey (2011) tarafından C_3 bitkisi olan çeltikte yapılan çalışmada Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak Cu/ZnSOD aktivitesinde artış gözlenmiş, MnSOD ve FeSOD aktivitesi ise bir noktaya kadar atmış (3 mM Mn) ve bu noktadan sonra önemli bir değişiklik olmamıştır. Çalışmamızda C_3 bitkisi olan *C. spinosa*' da Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak MnSOD aktivitesinde 10 μM ' a kadar artış gözlenmiş sonrasında ise düşüş belirlenmiş, en düşük FeSOD aktivitesi 100 μM ' da gözlenmiş, Cu/ZnSOD aktivitesinde ise artış belirlenmiştir. C_4 bitkileri ile ilgili olarak Mn' ın SOD

izoenzimleri üzerine etkisini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda C₄ bitkisi olan *C. gynandra*' da uygulanan Mn konsantrasyonunda ki azalmaya bağlı olarak MnSOD aktivitesinde belirgin bir değişiklik gözlenmezken, Cu/ZnSOD aktivitesinde belirgin bir düşüş gerçekleşmiştir. uygulanan Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak MnSOD aktivitesinde 10 μM ' a göre düşüş, Cu/ZnSOD aktivitesinde ise 10 μM ' a göre artış belirlenmiştir.

APX, kloroplastlardaki su-su döngüsünde ve ASC-GSH döngüsünde H₂O₂' nin süpürülmesinde önemli rol oynamaktadır (Gill and Tuteja, 2010). APX, H₂O₂ ye olan yüksek ilgisi ile bitkilerin stres altında ROS düzenlenmesinde CAT ve POX' dan daha önemli bir yere sahiptir. Bitkilerin farklı streslere karşı APX aktivitelerini arttırdığı bilinmektedir (Mittler and Zilinkas, 1992; Hernandez *et al.*, 1995; Noctor and Foyer, 1998). C₃ bitkisi olan tütün' de yapılan bir çalışmada Mn konsantrasyonunda ki azalmaya bağlı olarak kontrol grubuna göre APX aktivitesinde düşüş belirlenmiştir (Yu *et al.*, 1998). Bu verilere benzer olarak çalışmamızda da C₃ bitkisi olan *C. spinosa*' nın APX aktivitesi 10 μM ' a göre 0 μM Mn uygulamasıyla azalmıştır. Diğer yandan C₃ bitkisi çeltikte (*Oryza sativa*) Mn konsantrasyonunda ki artış APX aktivitesini arttırmıştır (Srivastava and Dubey, 2011). *C. spinosa*' da en yüksek APX aktivitesi 50 μM Mn uygulamasında ölçülmüş ve Mn konsantrasyonunun daha da yükseltilmesi ile APX aktivitesi azalmıştır. C₄ bitkilerinde Mn uygulaması sonucunda APX aktivitesindeki değişiklikler ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. *C. gynandra*' nın APX aktivitesi Mn eksikliğinde 10 μM ' a göre daha düşüktür. Aynı bitkide uygulanan Mn konsantrasyonunda ki artış, APX aktivitesini düşürmüştür.

GR enzimi GSH' ın rejenerasyonunu sağlayarak ASC-GSH yolunun işleminde önemli bir role sahiptir (Rao and Reddy, 2008). C₃ bitkisi *Oryza sativa* ile yapılan bir çalışmada uygulanan Mn konsantrasyonunda ki artışla beraber GR aktivitesi de yükselmiştir (Srivastava and Dubey, 2011). C₃ bitkisi *Citrus grandis* ile yapılan başka bir çalışmada Mn konsantrasyonunda ki artışın kontrol grubuna göre GR aktivitesini değiştirmediği belirlenmiştir (Li *et al.*, 2010). Çalışmamızda *C. spinosa*' da uygulanan Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak GR aktivitesinde arttığı belirlenmiştir. C₄ bitkilerinde Mn uygulaması sonucunda GR aktivitesindeki değişiklikler ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma

bulunmamaktadır. *C. gynandra*' da uygulanan Mn konsantrasyonunda ki azalmaya veya artışa bağlı olarak GR aktivitesinde belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

Su-su döngüsü sonucunda askorbik asit (AsA), monodehidroaskorbik asit (MDHA) radikale yükseltgenir. MDHA, ferrodoksinin indirgenmesiyle (Miyake ve Asada, 1994; Rizhsky, Liang ve Mittler, 2003) ya da monodehidro askorbat redüktaz (MDHAR) enziminin katalizlemesiyle NAD(P)H ile tekrar AsA' ya indirgenir (Sano *et al.*, 2005; Asada 2006). C_3 bitkisi *Oryza sativa*' da Mn konsantrasyonunda ki azalma MDHAR aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır (Srivastava and Dubey, 2011). Çalışmamızda *C. spinosa*' da uygulanan Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak MDHAR aktivitesi bir noktaya kadar artmış (50 μ M) ancak daha sonrasında düşmüştür. C_4 bitkilerinde Mn uygulaması sonucunda MDHAR aktivitesindeki değişiklikler ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda C_4 bitkisi olan *C. gynandra*' da uygulanan Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak MDHAR aktivitesi artmıştır.

DHAR enzimi, su-su döngüsünde dehidro askorbat' ın (DHA) üretildiği durumda GSH'ı elektron vericisi olarak kullanarak DHA' yı ASA' ya indirger (Asada, 2006). *Oryza sativa* ile yapılan çalışmada Mn konsantrasyonunda ki azalmaya bağlı olarak DHAR aktivitesinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Srivastava and Dubey, 2011). Çalışmamızda *C. spinosa*' da Mn konsantrasyonunda ki azalmaya bağlı olarak MDHAR aktivitesi ile benzer olarak DHAR aktivitesinde de düşüş belirlenmiştir. *C. spinosa*' da Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak DHAR aktivitesi bir noktaya kadar artmış (50 μ M) ama aşırı Mn uygulaması DHAR aktivitesini azaltmıştır. C_4 bitkilerinde Mn uygulaması sonucunda DHAR aktivitesindeki değişiklikler ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmasada, C_4 bitkisi olan *C. gynandra*' da en yüksek DHAR aktivitesinin olduğu 50 μ M' a göre uygulanan Mn konsantrasyonunda ki değişime bağlı olarak DHAR aktivitesinde düşüş belirlenmiştir.

GR, DHAR ve MDHAR su-su döngüsünde aktif olarak çalışan enzimlerdir. Çalışmamızda *C. spinosa*' da 0 μ M Mn konsantrasyonunda GR, DHAR ve

MDHAR aktivitelerinde düşüş gözlenmiştir. Bu bitkide Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak GR aktivitesinde artış gözlenmiş, MDHAR ve DHAR enzimlerinin aktiviteleri 50 μM ' a kadar artmış ancak daha sonrasında düşüş belirlenmiştir. Bu durum 50 μM Mn konsantrasyonuna kadar *C. spinosa*'nın su-su döngüsündeki tüm enzimlerinin birbirleriyle uyumlu olarak çalıştığını göstermektedir. Ancak, aynı uyum *C. gynandra* 'nın sadece APX ve GR aktiviteleri arasında gözlenmiştir.

Bitki hücrelerinde H_2O_2 birikiminin iki türlü etkisi olabilmektedir; birincisi hücreye zarar veren oksitleyici olarak davranması ve Fenton reaksiyonuna yol açarak $\text{OH}^\cdot$ radikali üretmesidir, ikincisi ise ikincil mesajcı olarak gen ifadesini düzenlemesidir (Miller *et al.*, 2010). C_3 bitkisi olan *Oryza sativa*' da Mn konsantrasyonunda ki azalmaya bağlı olarak bitkinin H_2O_2 içeriğinde düşüş gözlenmiştir (Srivastava and Dubey, 2011). Bu verilerle benzer olarak, çalışmamızda yine bir C_3 bitkisi olan *C. spinosa*' da Mn konsantrasyonunun azalması H_2O_2 içeriğini azaltmıştır. Ayrıca *C. spinosa*' da uygulanan Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak H_2O_2 içeriğinde bir noktaya kadar (50 μM) artış gerçekleşmiş ancak aşırı Mn uygulaması H_2O_2 miktarını azaltmıştır. C_4 bitkilerinde Mn uygulaması sonucunda H_2O_2 içeriğinde ki değişiklikler ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. C_4 bitkisi olan *C. gynandra*' da uygulanan Mn konsantrasyonunda ki değişime bağlı olarak H_2O_2 içeriğinde önemli bir farklılık gözlenmemiştir.

Çalışmamızda C_3 bitkisi olan *C. spinosa*' da Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak 100 μM ' da H_2O_2 seviyesi düşükken total SOD ve APX enzim aktivitelerininde düşük olması ilgi çekicidir. Burada Mn' ın aşırı birikiminin ROS üretimini sınırladığı daha önce yapılan çalışmalardan bilinmektedir. Lidon and Teixeira (2000)' nın C_3 bitkisi olan *Oryza sativa* ile yaptığı çalışmada tillakoyid lamellerinde Mn konsantrasyonunda ki artışın Mehler reaksiyonlarını engelleyerek ROS üretimini sınırladığı belirlenmiştir. Çalışmamızda bulduğumuz verilerde Lidon and Teixeira' nın elde ettiği verileri desteklemektedir.

Lipid peroksidasyonu, pek çok çalışmada oksidatif hasarın belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada lipid peroksidasyonu seviyesi TBARS miktarı ölçülerek belirlenmiştir. C_3 bitkisi olan asmada (*Vitis vinifera*)

yapılan bir çalışmada Mn eksikliği sonucunda TBARS miktarında düşüş gözlenmiştir (Yao *et al.*, 2012). Çalışmamızda C₃ bitkisi olan *C. spinosa*' da Mn konsantrasyonunda ki azalmaya bağlı olarak TBARS miktarı düşerken Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak TBARS miktarında bir noktaya kadar artmış (50 µM) ancak aşırı Mn uygulaması TBARS miktarını azaltmıştır. C₄ bitkilerinde Mn uygulaması sonucunda TBARS miktarında ki değişiklikler ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda C₄ bitkisi olan *C. gynandra*' da Mn konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak TBARS miktarında artış gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR

Sonuç olarak; 50 μ M Mn uygulanmasıyla C_3 bitkisi *C. spinosa*'nın ETR' sinin en düşük olduğu 50 μ M Mn konsantrasyonunda lipid peroksidasyon seviyesinin de en fazla olduğu gözlenmiştir. Bu durum, C_3 bitkilerinde redoks dengesinin korunmasında ETR' nin devamlılığının önemini göstermektedir. Aynı konsantrasyonda su-su döngüsünün en önemli enzimlerinden olan APX' un aktivitesinde en yüksek seviyeye ulaşması bitkinin oksidatif stresi engellemeye çalışmasının bir göstergesi olabilir. Buna benzer olarak 100 μ M Mn konsantrasyonunda *C. gynandra*'nın da ETR' si en düşük, lipid peroksidasyonu ise en yüksek seviyededir. Ancak *C. spinosa*'nın aksine *C. gynandra*'nın APX aktivitesinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu durum, *C. spinosa* ile karşılaştırıldığında *C. gynandra*'nın ETR' sindeki ani düşüşü (%30.7) açıklamaktadır. Bu çalışma; oksidatif stresin neden olduğu hasarın antioksidant enzimler tarafından engellenerek redoks dengesinin sağlanmasının, fotosentezin devamlılığı için gerekliliğini göstermektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Allen, J.P. and Forsberg, J.**, 2001, Molecular recognition in thylakoid structure and function, *Trends In Plant Science*, 6, Sweden,317-326p.
- Apel, K., and Heribert, H.**, 2004, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annual review of plant biology*, 55, Switzerland, 373-399p.
- Arthur, M. and Melvin, C.**, 1952, Chemistry of the Metal Chelate Compounds, 74, California, 473p.
- Arrigoni, O., Dipierro, S. and Borracino, G.**, 1981, Ascorbate free radical reductase:A key enzyme of the ascorbic acid system, *FEBS Letters*,125, Italy, 242-244p.
- Asada, K.**, 2006, Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, *Plant physiology*, 141:391-6p.
- Ball, L., Accotto, G., Bechtold, U., Creissen, G., Funck, D., Jimenez, A., Kular, B., Leyland, N., Mejia-Carranza, J., Reynolds, H., Karpinski, S. and Mullineaux, P.M.**, 2004, Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in Arabidopsis., *Plant Cell*, 16, United Kingdom, 2448–2462p.
- Barber J., Hankamer, B. and Morris E.P.**, 1999, Revealing the structure of the oxygen-evolving core dimer of photosystem II by cryoelectron crystallography, *Nature Structural Biology*, 6, London,560-564p.
- Beuchamp, C. and Fridovich, I.**, 1973, Isoenzymes of superoxide dismutase from wheat germ, *Biochim. Biophys. Acta*, 317, 50–64p
- Blankenship, R.E. and Prince, R.C.**, 1985, Excited-state redox potentials and the Z scheme of photosynthesis, *Trends Biochemica Science*, 10, USA,382-383p.
- Bradford, M.M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein–dye binding, *Anal. Biochem.*, 72:248–254p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Brown, N.J., Parsley, K. and Hibberd, J.M.,** 2005, The future of C₄ research – maize, Flaveria or Cleome, *Trends in Plant Science*, 10, United Kingdom, 215-221p.
- Chew, O., Whelan, J. and Millar, A.H.,** 2003, Molecular definition of the ascorbate glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria dual targeting of antioxidant defenses in plants, *J. Biol. Chem.*, 278, Australia, 46869–46877p.
- Chitnis, P.R.,** 2001, Photosystem I: Function and physiology, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52:593-626p.
- Constantopoulus, G.,** 1970, Lipid metabolism of manganese deficient algae, *Plant Physiology*, 45:76–80p.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B. and del Río, L.A.,** 2001, Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells, *Trends in Plant Science*, 6, Spain, 145–150p.
- Dağdelen, N., Yılmaz, E., Sezgin, F. ve Gürbüz, T.,** 2006, Water-yield relation and water use efficiency of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and second crop corn (*Zea mays* L.) in western Turkey, *Agric. Water. Manag.*, 82, Turkey, 63-85p.
- Davidson, J.F. and Schiestl R.H.,** 2001, Mitochondrial Respiratory Electron Carriers Are Involved in Oxidative Stress during Heat Stress in *Saccharomyces cerevisiae*, Society, 21, Boston, 8483-8489p.
- De Pinto, M.C., Francis, D. and De Gara, L.,** 1999, The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells, *Protoplasma*, 209, Cardiff, 90–97p.
- del Río, L.A., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Pastori, G.M., Bueno, P. and Lopez-Huertas, E.,** 1996, Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants, *Biochemical Society Transactions*, 24, Spain, 434–438p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dietz, K., Simone, J., Oelze, M., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S.M.N. and Baier, M.F.I.**, 2006, The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism, *Journal of experimental botany*, 57, Germany, 1697-709p.
- Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S. and Smirnov, N.**, 2007, Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L- galactose phosphorylase are required for ascorbate bio- synthesis and seedling viability, *Plant J.*, 52, United Kingdom, 673-689p.
- Dron, M., Clouse, S.D., Dixon, R.A., Lawton, M.A. and Lamb, C.J.**, 1988, Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense gene promoter in electroporated protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* , 85, San Diego, 6738-6742p.
- Edwards G. and Walker D.**, 1983, C₃, C₄: mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Ehleringer, J.R., Cerling, T.E. and Helliker, B.R.**, 1997, C₄ photosynthesis, atmospheric CO₂, and climate, *Oecologia*, 112, Utah, 285-299p.
- Fahey, R.C.**, 2001, Novel thiols of prokaryotes, *Annu. Rev. Microbiol.*, 55:333-356p.
- Fecht-Christoffers, M., Führs, H., Braun, H. and Horst, W.**, 2006, The role of hydrogen peroxide-producing and hydrogen peroxide-consuming peroxidases in the leaf apoplast of cowpea in manganese tolerance, *Plant Physiology*, 140, 1451-1463p.
- Ferreira, K.N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J. and Iwata S.**, 2004, Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center, *Science*, 303, London, 1831-1838p.
- Flanagan, L.B. and Jefferies, R.L.**, 1988, Stomatal limitation of photosynthesis and reduced growth of the halophyte *Plantago maritima* L. at high salinity, *Plant Cell Environ.*, 11:239-245p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Foy, C.D., Chaney, R.I.L. and White, M.C.,** 1978, The physiology of metal toxicity in plants, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, Maryland, 511–566p.
- Foyer , C.H. and Halliwell , B.,** 1976, The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts. *Planta* , 133, United Kingdom, 21–25p.
- Foyer, C.H. and Noctor, G.,** 2005, Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses, *The Plant Cell*, 17, United Kingdom, 1866–1875p.
- Foyer, C. and Noctor, G.,** 2009, Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications., *Antioxidants & Redox signaling*, 11, United Kingdom, 861-905p.
- Frendo, P., Harrison, J., Norman, C., Hernandez–Jimenez, M.J., Van de Sype, G., Gilabert, A. and Puppo, A.,** 2005, Glutathione and homoglutathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula*., *Mol Plant Microb Int* ,18, France, 254– 259.
- Gill, S.S. and Tuteja, N.,** 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiol. Biochem.*, 48, India, 909-930p.
- Green, B.R. and Durnford, D.G.,** 1996, The chlorophyll carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, Canada, 685-714p.
- Grossman, A.R., Bhaya, D., Apt, K.E. and Kehoe, D.M.,** 1995, Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: Diversity, control, and evolution, *Annual Reviews*, 29, California, 231-288p.
- Hai-hua, W., Tao, F., Xi-xu, P., Ming-li Y., Ping-lan, Z. and Xin-ke, T.,** 2009, Ameliorative Effects of Brassinosteroid on Excess Manganese-Induced Oxidative Stress in *Zea mays* L. Leaves, *Agricultural Sciences in China*, 8, 1063-1074p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hall, J.C., Sytsma, K.J. and Iltis, H.H.**, 2002, Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence data, *American Journal of Botany*, 89, Wisconsin, 1826-1842p.
- Hattersley, P.W.**, 1992, C4 photosynthetic pathway variation in grasses (Poaceae): its significance for arid and semi-arid lands, Desertified grasslands: their biology and management. London: Academic Press, 181–212p.
- Hernandez, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F. and del Río, L.A.**, 1995, Salt induced oxidative stress in chloroplast of pea plants, *Plant Sci.*, 105, Spain, 151–167p.
- Hibberd, J.M., Sheehy J.E., and Langdale J.**, 2008, Using C4 photosynthesis to increase the yield of rice-rationale and feasibility. *Current opinion in plant biology* 11, United Kingdom, 228-31p.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I.**, 1950, The water culture method for growing plants without soil, Calif. Agric. Exp. Stn. Circ., 347, USA, 1–32p.
- Houtz, R.L., Nable, R.O. and Cheniae, G.M.**, 1988, Evidence for effects on the in vivo activity of ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase during development of Mn toxicity in tobacco, *Plant Physiology*, 86, Australia, 1143–1149p.
- Hughes N.P. and Williams R.J.P.**, 1988, An introduction to manganese biological chemistry, International symposium on manganese in soils and plants, 33, Dordrecht, 7–19p.
- Jiménez, A., Hernandez, J.A., del Río, L.A. and Sevilla, F.**, 1997, Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves, *Plant Physiology*, 114, Spain, 275–284p.
- Jordan, D.B. and Ogren, W.L.**, 1981, Species variation in the specificity of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase, *Nature*, 291, USA, 513–515p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W. and Krauss, N.,** 2001, Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature*, 411, Germany, 909-917p.
- Jubany-Marí, T., Munné-Bosch, S., Lopez-Carbonell, M. and Alegre, L.,** 2009, Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L., to summer drought, *Journal of Experimental Botany*, 60, Spain, 107–120p.
- Karpinski, S., Gabrys, H., Mateo, A., Karpinska, B. and Mullineaux, P.M.,** 2003, Light perception in plant disease defence signaling, *Current Opinion in Plant Biology*, 6, Sweden, 390–396p.
- Karplus, P.A., Daniels, M.J. and Herriott, J.R.,** 1991, Atomic structure of ferredoxin-NAD P⁺ reductase: Prototype for a structurally novel flavoenzyme family, *Science*, 251, New York, 60-66.
- Kering, M.K., Lukaszewska, K. and Blevins, D.G.,** 2008, Manganese requirement for optimum photosynthesis and growth in NAD-malic enzyme C-4 species, *Plant Soil*, 316, Oklahoma, 217-226p.
- Kok, B.,** 1957, Absorption Changes induced by the Photochemical Reaction of Photosynthesis, *Nature*, 179:583-584p.
- Kurepa, J., Smalle, J., Van Montagu, M. and Inze, D.,** 1998, Oxidative stress tolerance and longevity in Arabidopsis: the late flowering mutant *gigantea* is tolerant to paraquat., *Plant J*, 14, Belgium, 759–764p.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D.G. and Schroeder, J.I.,** 2003, NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS- dependent ABA signalling in Arabidopsis, *EMBO J.*, 22, USA, 2623-2633p.
- Laemmli, U.K.,** 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:680–685p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lei, Y., Korpelainen, H. and Li, C.,** 2007, Physiological and biochemical responses to high Mn concentrations in two contrasting *Populus cathayana* populations. *Chemosphere*, 68, China, 686-694p.
- Li, Q., Chen, L., Jiang, H., Tang, N., Yang, L., Lin, Z., Li, Y. and Yang, G.,** 2010, Effects of manganese-excess on CO₂ assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport of leaves, and antioxidant systems of leaves and roots in *Citrus grandis* seedlings, *BMC Plant Biology*, doi:10.1186/1471-2229-10-42
- Lidon, F.C. and Teixeira, M.G.,** 2000, Rice tolerance to excess Mn: Implications in the chloroplast lamellae and synthesis of a novel Mn protein, *Plant Physiol. Biochemica*, 38, Portugal, 969-978p.
- Lidon, F.C.,** 2001, Tolerance of rice to excess manganese in the early stages of vegetative growth. Characterisation of manganese accumulation, *Journal of Plant Physiology*, 158:1341-1348p.
- Lidon, F.C, Barreiro, M.G. and Ramalho, J.C.,** 2004, Manganese accumulation in rice: implications for photosynthetic functioning, *Journal of Plant Physiology*, 161, 1235–1244p.
- Liu, Z.J., Guo, Y.K. and Bai, J.G.,** 2010, Exogenous hydrogen peroxide changes antioxidant enzyme activity and protects ultrastructure in leaves of two cucumber ecotypes under osmotic stress, *J. Plant Growth Regul.*, 29, China, 171-183p.
- Macfie, S.M. and Taylor, G.J.,** 1992, The effects of excess manganese on photosynthetic rate and concentration of chlorophyll in *Triticum aestivum* grown in solution culture, *Physiologia Plantarum*, 85, Canada, 467-475p.
- Maggio, A., McCully, M.G., Kerdnaimongkol, K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Joly, R.J.,** 2002, The ascorbic acid cycle mediates signal transduction leading to stress-induced stomatal closure, *Funct Plant Biol* , 29, 845–852p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Marschner, H.**, 1995, Functions of mineral nutrients: micronutrients. In: Mineral Nutrition of higher plants, Academic Press, 324–333p.
- Marshall, D.M., Muhaidat, R., Brown, N.J., Liu, Z., Stanley, S., Griffiths, H., Sage, R.F. and Hibberd, J.M.**, 2007, Cleome, a genus closely related to Arabidopsis, contains species spanning a developmental progression from C₃ to C₄ photosynthesis, *Plant Journal*, 51, United Kingdom, 886-896p.
- Masaaki, T. and Asada, K.**, 1988, Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 267, Japan, 714-722p.
- May, M.J., Hammond–Kosack, K.E. and Jones, J.D.G.**, 1996, Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism and lipid peroxidation in the Cf gene-dependent defence response of tomato cotyledons induced by race specific elicitors of *Cladosporium fulvum.*, *Plant Physiol*, 110, United Kingdom, 1367– 1379p.
- McCain, D.C. and Markley, J.L.**, 1989, More manganese accumulates in maple sun leaves than in shade leaves, *Plant Physiology*, 90, USA, 1417–1421p.
- Menon, A.R. and Yatazawa, M.**, 1984, Nature of manganese complexes in manganese accumulator plant *Acanthopanax sciadophylloides*, *J. Plant Nutrition*, 7, Canada, 961–974p.
- Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Ivanov, A.G., Mora M.L. and Alberdi, M.**, 2010, Manganese as Essential and Toxic Element for Plants: Transport, Accumulation and Resistance Mechanism, *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 10, Chile, 476 – 494p.
- Miller, G., Nobuhiro, S., Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler R.**, 2010, Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses, *Plant, Cell and Environment*, 33, USA, 453-467p.
- Mitchell, P.L. and Sheehy, J.E.**, 2006, Supercharging rice photosynthesis to increase yield. *The New phytologist*, 171, United Kingdom, 688-693p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mittler, R. and Zilinskas, B.A.**, 1992, Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase, *J. Biol. Chem.*, 267, USA, 21802-21807p.
- Mittler, R.**, 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends in plant science*, 7:405-410p.
- Mittler R., Vanderauwer S., Gollery, M. and Breusegem, F. V.**, 2004, Reactive oxygen gene network of plants, 9, USA, 490-498p.
- Mittler, R.**, 2006, Abiotic stress, the field environment and stress combination, *Trends in plant science*, 11:15-19p.
- Miyake, C. and Asada, K.**, 1994, Ferredoxin-dependent photoreduction of monodehydroascorbate radicals in spinach thylakoids, *Plant and Cell Physiology*, 35, Japan, 539–549p.
- Moller, I.M.**, 2001, Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species, *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 561–591p.
- Moller, I.M., Jensen, P.E. and Hansson, A.**, 2007, Oxidative modifications to cellular components in plants, *Annual Review of Plant Biology*, 58, Denmark, 459–481p.
- Moschou, P.N., Paschalidis, K.A., Delis, I.D., Andriopoulou, A.H., Lagiotis, G.D., Yakoumakis, D.I. and Roubelakis-Angelakis, K.A.**, 2008, Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco, *The Plant Cell*, 20, Greece, 1708– 1724p.
- Mukhopadhyay, P.S., Varani, J., Ginsburg, I., Gibbs, D.F., Sulavik, C., Johnson, K.J., Weinberg, J.M., Ryan, U.S. and Ward, P.A.**, 1991, Hydrogen peroxide-induced cell and tissue injury: Protective effects of Mn²⁺, *Inflammation*, 15, Michigan, 291-301p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nakano, Y. and Asada, K.**, 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiol.*, 22 , Japan, 867–880p.
- Nayyar, H. and Gupta, D.**, 2006, Differential sensitivity of C₃ and C₄ plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants, *Env. Exp. Bot.* 58:106-113p.
- Nelson, D.M., Sheng Hu, F., Tian, J., Stefanova, I. and Brown, T.A.**, 2004, Response of C₃ and C₄ plants to middle-Holocene climatic variation near the prairie-forest ecotone of Minnesota, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 13, Minnesota, 562–567p
- Noctor, G. and Foyer, C.H.**, 1998, Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, France, 249–279p.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L. and Foyer, C.H.**, 2002, Drought and oxidative load in the leaves of C₃ plants: a predominant role for photorespiration?, *Annals of Botany*, 89, Yugoslavia, 841–850p.
- Ochuodho, J.O., Modi, A.T. and Beukes M.**, 2006, Accumulation of seed storage proteins in *Cleome gynandra* L. and *Brassica kaber* L., *South African Journal of Botany*, 72, South Africa, 238-244p.
- Okamura, M.Y, Paddock, M.L., Graige, M.S. and Feher, G.**, 2000, Proton and electron transfer in bacterial reaction centers, *Biochimica et Biophysica Acta* , 1458, San Diego, 148-163p.
- Palma, J.M., Corpas, F.J. and del Río, L.A.**, 2009, Proteome of plant peroxisomes: new perspectives on the role of these organelles in cell biology, *Proteomics*, 9, Spain, 2301–2312p.
- Pastore, D., Trono, D., Laus, M.N., Di Fonzo, N. and Flagella, Z.**, 2007, Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria, *Journal of Experimental Botany*, 58, Italy, 195–210p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Paulsen, H.**, 1995, Chlorophyll fl/fc-binding proteins, *Photochemistry and Photobiology*, 62:367-382p.
- Pendias K.**, 2001, Trace Elements in Soil and Plants, CRC Press, 329p.
- Pfeffer, P.E., Tu, S.I., Gerasimowicz, W.V. and Cavanaughk, J.R.**, 1986, In vivo ³¹P NMR studies of corn root tissue and its uptake of toxic metals, *Plant Physiology*, 80, Pennsylvania, 77–84p.
- Pullerits, T. and Sundstrom, V.**, 1996, Photosynthetic light-harvesting pigment-protein complexes: Toward understanding how and why, *American Chemical Society*, 29, Washington, 381-389p
- Raha, S. and Robinson, B.H.**, 2000, Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing, *Trends in Biochemical Sciences*, 25, 502–508p.
- Rao C., A.S.V. and Reddy, A.R.**, 2008, Glutathione reductase: a putative redox regulatory system in plant cells. in: N.A. Khan, S. Singh, S. Umar (Eds.), Sulfur Assimilation and Abiotic Stresses in Plants. Springer, The Netherlands, 111-147p.
- Rhoads , D.M., Umbach , A.L., Subbaiah , C.C. and Siedow , J.N. ,** 2006, Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling, *Plant Physiology*, 141, Arizona, 357–366p.
- Rey , P., Cuine , S., Eymery , F., Garin,J.,Court, M., Jacquot , J.P., Rouhier, N. and Broin, M.**, 2005, Analysis of the proteins targeted by CDSP32, a plastidic thioredoxin participating in oxidative stress responses, *The Plant Journal*, 41, France, 31–42p.
- Rizhsky, L., Liang, H. and Mittler, R.**, 2003, The water–water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress, *Journal of Biological Chemistry*, 278, Israel, 38921–38925p.
- Sano ,S., Tao ,S., Endo ,Y., Inaba ,T., Hossain ,M.A., Miyake ,C., Matsuo ,M., Aoki ,H., Asada ,K. and Saito ,K.**, 2005, Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, Japan, 762– 772p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sage, R.F.**, 2001, C4 plants, *Encyclopedia of Biodiversity*, 1: 575–598p.
- Sage, R.F.**, 2004, The evolution of C4 photosynthesis, *New Phytologist*, 161: 341 – 370p.
- Sage, R.F. and Kubien, D.S.**, 2007, The temperature response of C3 and C4 photosynthesis, *Plant, Cell and Environment*, 30, Toronto, 1086–1106p.
- Schiirmann, P. and Jacquot, J.P.**, 2000, Plant thioredoxin systems revisited, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, Switzerland, 371-400p.
- Schranz, M.E., Lysak, M.A. and Mitchell-Olds, T.**, 2006, The ABC's of comparative genomics in the Brassicaceae: building blocks of crucifer genomes, *Trends in Plants Science*, 11, USA, 535-542p.
- Sezen, S.M. ve Yazar, A.**, 1996, Determination of water-yield relationships of wheat under Cukurova conditions, *Trans. J. agric. For.* 20, Turkey, 41-48p.
- Shi, Q., Zhu, Z., Xu, M., Qian, Q. and Yu, J.**, 2006, Effect of excess manganese on the antioxidant system in *Cucumis sativus* L. under two light intensities, *Environ. Exp. Botany*, 58, China, 197-205p.
- Smirnoff, N.**, 2000, Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule, *Current Opinion in Plant Biology*, 3:229–235p.
- Srivastava S. and Dubey, R.S.**, 2011, Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings, *Plant Growth Regul.*, 64, India, 1-16p.
- Suresh, R., Foy, C.D. and Weidner, J.R.**, 1987, Effects of excess soil manganese on stomatal function in two soybean cultivars, *J Plant Nutr*, 10, USA, 749-760p.
- Tipple B.J. and Pagani M.**, 2007, The early origins of terrestrial C4 photosynthesis, *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 35, Connecticut, 435 – 461p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tommos, C. and Babcock, G.T.**, 1999, Oxygen production in nature: A light-driven metalloradical enzyme process, *Accounts of Chemical Research*, 37, Philadelphia, 18-25p.
- Torres, M.A. and Dangel, J.L.**, 2005, Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development, *Current Opinion in Plant Biology*, 8, USA, 397–403p.
- Triantaphylides, C., Krischke, M., Hoeberichts, F.A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., Van Breusegem, F. and Mueller, M.J.**, 2008, Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photo-oxidative damage to plants, *Plant Physiology*, 148, France, 960–968p.
- Turkan, I., ve Demiral, T.**, 2009, Recent developments in understanding salinity tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, 67, Turkey, 2-9p.
- Van Grondelle, R., Dekker, J. P., Gillbro, T. and Sundstrom V.**, 1994, Energy transfer and trapping in photosynthesis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1187, Amsterdam, 1-65p.
- Vanacker, H.**, 2000, Early H₂O₂ Accumulation in Mesophyll Cells Leads to Induction of Glutathione during the Hyper-Sensitive Response in the Barley-Powdery Mildew Interaction, *Plant Physiology*, 123:1289-1300p.
- Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H.K., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Breusegem, F.**, 2004, Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, 39, Belgium, 45–58p.
- Vieira Dos Santos, C. and Rey, P.**, 2006, Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends in Plant Sciences*, 11, France, 329–334p.
- Vitória, P.A., Lea, P.J. and Azevedo, R.A.**, 2001, Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues, *Phytochemistry*, 57, Brazil, 701–710p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yao, Y., Mou, D., Xu, G., Lutts, S., Achal, V. and Ma, J.,** 2011, Contrasting Performance and Different Tolerance of Chestnut Rose and Grape to Excess Manganese, *J Plant Growth Regul.*, China, DOI: 10.1007/s00344-011-9251-7
- Yu, Q., Osborne, L. and Rengel, Z.,** 1998, Micronutrient deficiency changes activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in tobacco plants, *Journal of Plant Nutrition*, 21, China, 1427-1437p.
- Zarcinas, B.A., Cartwright, B. and Spounce, L.R.,** 1987, Nitric acid digestion and multi-element analysis of plant material by inductively coupled plasma spectrometry, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 18, Australia, 131-146p.
- Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W. and Orth, P.,** 2001, Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution, *Nature*, 409, Germany, 739-743p.

ÖZGEÇMİŞ

Ahmet Dinc, 15.08.1985’da Ankara’da doğmuştur. 2004’te Ankara Anadolu Lisesi’nde orta öğrenim hayatını bitirmiştir. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çevre Biyolojisi Opsiyonundan 2009 yılında mezun olmuştur. 2010 yılında lisansüstü eğitime, Prof. Dr. İsmail Türkan danışmanlığında, Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji A.B.D.’de başlamıştır. Mayıs 2010’da ‘Kserofitik *Gypsophila aucheri* (Caryophyllaceae) bitkisinin çimlenme ve vejetatifbüyümedeki tuz toleransı” adlı sözlü sunumu 20. Ulusal Biyoloji Kongresinde sunulmuştur. “Differences between ROS-scavenging enzymes during seed germination and vegetative growth in a Turkish endangered halophyte *Gypsophila oblongeolata* under salt stress” adlı sözlü sunumu 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants Kongresinde Budapeşte’de sunulmuştur.