

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**BİTKİLERDE KÖK SENESENSİNDE ANTİOKSİDAN
SAVUNMA SİSTEMİNİN ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

Çağdaş Kera YÜCEL

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Melike BOR

Assoc. Prof. Dr. Peter RYSER

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.01.00

Sunuş Tarihi: 30.11.2012

**Bornova-İZMİR
2012**

Çağdaş Kera Yücel tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan "Bitkilerde Kök Senesensinde Antioksidan Savunma Sisteminin Rolünün İncelenmesi" 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 30.11.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Filiz Ozdemir

Raportör Üye : Doç. Dr. Melike Bor

Uye : Yrd. Doç. Dr. Çağlar Karakaya



ÖZET

BİTKİLERDE KÖK SENESENSİNDE ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİNİN ROLÜNÜN İNCELENMESİ

YÜCEL, Çağdaş Kera

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Melike BOR

İkinci Danışmanı: Assoc. Prof. Dr. Peter Ryser

Kasım 2012, 60 sayfa

Bitkilerde senesens, yaşlanmayla ilişkili olduğu kadar mevsimsel değişimin de içinde bulunduğu çevresel etkenler tarafından da uyarılmaktadır. Günlerin kısalması ve havaların soğumasıyla bu doğal süreç başlamaktadır. Senesens esnasında metabolizma ve gen ifadelerinde gözlenebilir değişiklikler olmaktadır. Senesens süreci yaprak ve toprak üstü organlarda daha iyi bilinmesine rağmen köklerde bu sürecin nasıl işlediği bilinmemektedir.

Mevsimsel değişime bağlı senesens sürecinde oksidatif stres ve antioksidan enzimlerin önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda kök yaşam döngüleri farklı olan *Sparganium androcladum* (Engelmann) Morong, *Rhynchospora alba* (L.) Vahl, *Scirpus microcarpus* J. Presl ve *Carex exilis* Dewey gibi çok yıllık sulak alan bitkilerinden ilkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde örnekleme yapıldı. Örneklerde, peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT) ve glutasyon redüktaz (GR) enzimlerinin aktiviteleri, lipid peroksidasyon düzeyleri ve köklerin canlılık yüzdeleri incelendi.

Genel olarak, POX, APX, CAT ve GR aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu değerleri *S. androcladum* ve *R. alba* ile *S. microcarpus* ve *C. exilis*'te benzer düzeylerde değişim gösterdi. İlk grubun kök sistemleri sonbaharda canlılığını yitirken, ikinci gruptaki türlerde kök sistemleri kış aylarında da canlı kalabilmektedir. Senesens sürecinin incelenmesinde ve ayırd edilmesinde antioksidan enzim değerlerinin belirleyici olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Senesens, mevsimsel değişim, antioksidan enzim sistemleri, lipid peroksidasyonu.

ABSTRACT**INVESTIGATING THE ROLE OF ANTIOXIDANT DEFENSE
SYSTEM AT ROOT SENESCENCE IN PLANTS**

YÜCEL, Çağdaş Kera

MSc in Biology, Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Melike BOR

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Peter Ryser

November 2012, 60 pages

In plants, senescence which is associated with aging is also stimulated by environmental factors such as the seasonal changes. Shortening of the days and the decrease in overall temperature initiates this natural process. Changes in metabolism and gene expression are observed during senescence. The senescence process and related mechanisms are better known in the above-ground organs and leaves as compared to that of the roots.

The senescence process which is a consequence of seasonal changes is believed to be related to oxidative stress and antioxidant enzymes. In this study we used perennial wetland plants *Sparganium androcladum* (Engelmann) Morong, *Rhynchospora alba* (L.) Vahl, *Scirpus microcarpus* J. Presl and *Carex exilis* Dewey which have different root survival strategies. Samplings were done during spring, summer and autumn seasons. The activities of peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR), Lipid peroxidation levels and root vitality percentage tests were also performed in the samples.

In general terms the activities of POX, APX, CAT, GR and the lipid peroxidation levels in *S. androcladum* with *R. alba* and *S. microcarpus* with *C. exilis* were similar and showed the same trend. Root senescence in the first group root senescence starts at autumn season while roots can survive during winter time in the second group. In accordance with our findings we could propose that antioxidative enzymes can be used as markers of root senescence levels in these plants.

Key words: Senescence, seasonal changes, antioxidative enzymes, lipid peroxidation.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda desteğini her an hissettiğim, bilim aşkını bana aşılayan ve bu alanda birçok kapının açılmasında büyük katkısı olan değerli hocam Doç. Dr. Melike BOR' a, çalışmalarım süresince hiçbir desteği esirgemeyen, engin bilgi birikimiyle beni yönlendiren, paylaştığı hayat tecrübeleriyle hayatıma yön vermeme yardımcı olan değerli hocam Dr. Peter RYSER' a teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında laboratuvar imkanlarını sağlayan Prof. Dr. Kabwe NKONGOLO ve Prof. Dr. Abdel OMRI' ye, laboratuvar çalışmalarında hiçbir yardımını esirgemeyen Araş. Gör. Paul Michael' e teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında değerli bilgi ve görüşlerini paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR ve Prof. Dr. İsmail TÜRKAN'A teşekkür ederim.

Desteklerini her an hissettiğim değerli arkadaşlarım Josef MACLEOD, Tuğba KARABUDAK, Levent SOYLU, Ahad HASANİN ve Kierann SANTALA ile bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eğitim hayatım süresince hiçbir desteğini esirgemeyen ve bana olan inançlarını kaybetmeyen annem Meryem YÜCEL, babam Ahmet YÜCEL ve canım kardeşim Mahir Can YÜCEL' e minnetimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	xi
ŞEKİLLER_DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Senesens.....	1
1.1.1 Senesens ve Serbest Radikaller (ROS)	3
1.2. Antioksidan Enzimler	6
1.2.1 Peroksidaz (POX; EC 1.11.1.7).....	7
1.2.2 Askorbat Peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11)	8
1.2.3 Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6)	10
1.2.4 Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1).....	12
1.2.5 Glutasyon Redüktaz (GR; EC 1.6.4.2).....	13
1.3. Lipid Peroksidasyonu	15
1.4 Mevsimsel Değişim ve Kök Senesensi.....	17
1.5 Senesens ve Abiyotik Stres İlişkisi.....	19
2. MATERYAL VE METOD	21

İÇİNDEKİLER (devam)

2.1 Bitki Materyali ve Örnekleme Planı	21
2.2 Canlılık Testi.....	22
2.3 Homojenizasyon.....	22
2.4 Protein tayini	22
2.5 Peroksidaz (POX; EC 1.11.1.7) Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi	23
2.6 Askorbat Peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi	23
2.7 Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	23
2.8 Glutasyon Redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi	23
2.9 Lipid Peroksidasyonu Tayini	24
2.10 İstatistiksel Analizler.....	24
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	25
3.1 Canlılık Testi.....	25
3.2 Total Protein Miktarı Sonuçları	26
3.3 Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	27
3.3.1 Peroksidaz (POX) Aktivite Sonuçları	28
3.3.2 Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivite Sonuçları	30
3.3.3 Katalaz (CAT) Aktivite Sonuçları	31
3.3.4 Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivite Sonuçları	33
3.4 Lipid Peroksidasyonu.....	34
KAYNAKLAR DİZİNİ	36
ÖZGEÇMİŞ	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: Bitkilerde H ₂ O ₂ ' in uzaklaştırıldığı temel hücresel yollar. Süperoksit dismutaz-askorbat-glutasyon redüktaz döngüler yer almaktadır.	9
1.2: Glutasyon redüktaz ve hücresel redoks.....	13
1.3: Senesenste lipid yıkımının metabolik yolu.....	15
3.1: İlkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde örnekleme yapılan bitkilerin POX aktiviteleri	29
3.2: İlkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde örnekleme yapılan bitkilerin APX aktiviteleri	31
3.3: İlkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde örnekleme yapılan bitkilerin CAT aktiviteleri	32
3.4: İlkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde örnekleme yapılan bitkilerin GR aktiviteleri	33
3.5: İlkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde örnekleme yapılan bitkilerin MDA içeriği (nmol g yaş ağırlık-1).....	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Çalışmada kullanılan bitkilerin örnekleme tarihleri ve örnekleme yapılan bölge koordinatları.....	21
2.2 Örnekleme yapılan bölgelerdeki ortalama mevsimsel sıcaklık değişimi	21
3:1 İlkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde bitkilerin canlılık yüzdeleri.....	25
3.2: İlkbahar, yaz ve sonbaharda mevsimlerinde örnekleme yapılan bitkilerin total protein miktarları (mg protein ml ⁻¹).....	27
3.3: İlkbahar, Yaz ve sonbaharda örnekleme yapılan bitkilerin POX, APX, CAT ve GR antioksidan aktiviteleri (ünite mg protein ⁻¹).....	28
3.4: İlkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde örnekleme yapılan bitkilere ait MDA içeriği değerleri (nmol g yaş ağırlık ⁻¹).....	34

KISALTMALAR

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
TTC	Trifeniltetrazolyum Klorid
MS	Malat Sentaz
ICL	İzositrat Liyaz
$^1\text{O}_2$	Tekli Oksijen
HO_2^-	Hidroperoksil
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
$\bullet\text{OH}$	Hidroksil
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri
$\text{RO}\bullet$	Alkoksil Radikalleri
$\text{ROO}\bullet$	Peroksil Radikalleri
CAT	Katalaz
POX	Peroksidaz
APX	Askorbat Peroksidaz
GPX	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
GPX	Glutasyon Peroksidaz
H_2O_2	Hidrojen Peroksit

1. GİRİŞ

Yaşlanma ve ölüm yaşayan tüm organizmaların gelişiminde gerekli ve doğal bir safhadır. Canlılarda bu süreçlerin aydınlatılması için yürütülen birçok bilimsel araştırma bulunmaktadır. Bitkilerde senesense yol açan ve ilerlemesine neden olan süreçlerin tanımlanmasına yönelik çeşitli bilgiler bulunmasına rağmen, bu alandaki birçok soru henüz yanıtlanabilmiş değildir. Senesens konusunda elde edilecek yeni bilgiler tarımsal üretim için son derece önemlidir. Bu bilgiler çiçeklenme, meyve oluşumu, tohum bağlanması ve ürünlerin depolanması sırasındaki kayıpları engellemek, ürün kalitesini (Nelson, 1988; Chandlee, 2001; Nam, 1997) ve stres toleransını (Lim et al., 2003) arttırmak için kullanılabilir. Bununla birlikte senesens sürecinin iyi bilinmesi bu sürecin ıslah programları ve genetik mühendisliği ile düzenlenebilme olasılığını da arttırmaktadır (Quirino et al., 2000).

1.1 Senesens

Senesens gün uzunluğundaki değişim ve havalarda soğumasıyla bitkilerin ölümüne öncülük eden son basamak olarak önerilmektedir. Bu proses karmaşık olmakla birlikte tıpkı diğer canlılarda olduğu gibi bitkilerde de yaşam süresince gelişim basamaklarının düzenlenmesinde önemli bir işleve sahiptir. Senesens sürecinde makromoleküllerin koordine bir şekilde degradasyonu ve senesense uğrayan dokudan azot, karbon, mineraller gibi geri kazanılan nutrientlerin diğer bitki dokularına taşınımı gerçekleşir (Noodén, 1988; Buchanan-Wollaston, 1997). Bununla birlikte, senesens fotosentezin duraksaması, organel yapılarının bozulması, lipid peroksidasyonunda artış, membran geçirgenliğinin azalması, klorofil, RNA ve protein miktarlarında azalma ile karakterize edilir (Lohman et al., 1994; Buchanan-Wollaston, 1997). Farklı etmenlere yanıt olarak devreye giren senesens süreci şu şekilde sınıflandırılabilir;

- Çok yıllık otsu bitkilerin toprak üstü sürgünlerinde senesens,
- Mevsimsel yaprak senesensi,
- Kademeli yaprak senesensi,
- Etsi ve kuru meyvelerin senesensi,
- Depo kotiledonlarının ve çiçek organlarının senesensi,
- Özel hücre tiplerinin senesensi.

Senesens genetik olarak kodlandığı için bu prosesler öngörülebilir. Sitolojik düzeyde bazı organeller parçalanırken diğerleri aktif kalır. Nukleus da geç parçalanan organellerden biridir. Çünkü nükleusun senesens işlemi süresince varlığı diğer organellerin bütünlüklerinin kontrollü bir şekilde bozulması açısından önemlidir (Gan and Amasino, 1997). Senesense uğrayan bir organda mRNA düzeyinin önemli ölçüde azalması buna karşın belirli özgün mRNA transkriptlerinin aşırı derecede artışı şaşırtıcı değildir. Senesens esnasında ifadelerinde azalma gözlenen genlere senesenste aktivitesi azalan genler (SDG'ler) denir. SDG'ler özellikle fotosentez ile ilgili proteinleri kodlayan genleri içerir.

Senesenste ifadeleri artan genler ise senesensle ilgili genler (SRG'ler) adını alır. Proteazlar, ribonükleazlar ve lipazlar gibi hidrolitik enzimler ile 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit sentaz (ACC sentaz) ve 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit oksidaz (ACC oksidaz) gibi etilen biyosentezi için gerekli enzimleri kodlayan genler bu grup içinde yer alır. Senesensle ilişkili genler (SAG'ler) senesenste ikincil derecede görev alırlar (Noodén, 1988).

Senesens sürecinde gerekli enerjinin en önemli kaynağı tilakoid membranlarında dahil olduğu hücre içi membran sistemlerinden metabolize edilen lipid molekülleridir (Buchanan-Wollaston, 1997). Total tilakoid lipidlerinin % 40-50' sini oluşturan galaktolipidler senesens süresince solunum için enerji sağlanması amacıyla glikoneojenez yoluyla şekerlere dönüştürülebilir (Landolt and Matile, 1990; Smart, 1994). Bu proses yağ asidi β -oksidasyonu ve glikolat döngüsü enzimlerinin de yer aldığı yağlı tohumlarda bulunan glikozomlarındaki gibi senesense uğrayan yapraklarda da gerçekleşmektedir (Landolt and Matile, 1990). Malat sentaz (MS) ve izositrat liyaz (ICL) gibi glioksilat döngüsü anahtar enzimlerinin gen ifadeleri arttığı ve enzimlerin miktarı da senesense uğrayan dokularda artmaktadır (Pistelli et al., 1996; Buchanan-Wollaston, 1997).

Kök senesensi, ne lateral köklerde ne de yanal köklerde anlaşılabilmiş değildir. Yapraklarda ise hücreler yaprak absisyonundan sonra da canlı kalabilirler. Çeşitli kök işlevleri bütün hücreler ölmeden önce durmaktadır (North and Nobel, 1996). Ölü ve canlı köklerin ayırımı çoğu kök çalışmasının esas bir parçasıdır. Kök dinamikleriyle yapılan çalışmalar kök fizyolojisi ve işlevindeki değişikliklerin ilişkilendirilmesiyle geliştirilebilir.

Senesens çalışmalarında bitki dokularının canlılık düzeyinin anlaşılması önemlidir bu amaçla trifeniltetrazolyum klorid (TTC)'nin indirgenmesini temel alan yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır (Steponkus PL and Lanphear, 1967; Sulpice et al., 1998; Takeda et al., 1993; Caldwell, 1993; Coria et al., 1998; Hiltbrunner and Fluckiger, 1996; Porter et al., 1994; Schrazi and Muir, 1998). TTC, formazana indirgenene kadar renksizdir, indirgendikten sonra açık kırmızı renk alır ve fotometrik olarak ölçülebilir (Steponkus and Lanphear, 1967). Bitki dokularında TTC çoğunlukla dehidrogenaz enzimleriyle indirgenir, bu enzimlerin çoğu da mitokondri ile ilişkilidir. Ayrıca, TTC indirgenmesi canlılığın belirlenmesinde kullanılır. Yine de TTC indirgenmesiyle kök ölüm kapasitesinin belirlenmesi tam olarak kayda değer değildir. Solunum metabolik aktivitenin değerlendirilmesinde bir standart olarak kabul edilir, fakat bilindiği kadarıyla solunum ve TTC indirgenmesi arasında bir ilişki henüz bilinmemektedir. TTC indirgenmesi ince köklerin canlı-ölü ayrımını yapılmasında kullanılmıştır (Joslin and Henderson, 1984; Knievel, 1973, Clemensson-Lindell, 1994). Wang ve arkadaşları (1995) köklerin canlılık durumunu belirlemek için TTC' nin indirgenme kabiliyetini kullanmışlardır. Ağaç kökleriyle çalışan bu araştırmacılar koyu kahverengi ve siyah renge sahip köklerin % 12-28' inin TTC indirgenmesine cevap verdiği görülmüştür. Dolayısıyla ölü oldukları düşünülen köklerin %12-28' inin ölümü şüphelidir.

1.1.1 Senesens ve Serbest Radikaller (ROS)

Senesens sürecinde hücre seviyesinde, metabolizmada ve gen ifadesinde belirgin değişiklikler meydana gelir (Noodén and Leopold, 1988). Hidrolitik enzimler hücresel proteinlerin, karbonhidratların ve nükleik asitlerin çoğunu parçalar. Parçalanma sonucu oluşan şekerler, nükleozit ve amino asitler floem yoluyla bitkiye geri taşınır ve orada sentez olayları için yeniden kullanılır. Minerallerin çoğu da yaşlanan organlardan bitkinin ana bünyesine geri taşınır. (Buchanan-Wollaston, V., 1997). Bu sırada DNA bileşeni sürekli artmaktadır (Orzáez and Granell, 1997). Bu değişiklikler senesens sürecinde bitki dokularında reaktif oksijen türevlerinin oluşumuna neden olmaktadır (Thompson et al., 1987; Leshem, 1988).

Sonbaharda yaprak döken ağaçlardaki yaprak senesensinin dışsal, monokarpik senesensin içsel olması, çeşitli senesens tiplerinin tetiklenmesinde farklılık olabileceğini gösterir. Bu doğrultuda dışsal faktörler aşırı sıcak ve soğuk, kuraklık, gölgelenme, ozon artışı, nutrient kıtlığı, patojen saldırısı ve yaralanmayı kapsamaktadır (Thoma and Stoddart, 1980). İçsel tetikleyiciler bitki yaşı, üremeyle ilişkili organların gelişim düzeyidir (Noodén, 1988; Gan and Amasino, 1997). Başlangıçtaki uyartıya bakılmaksızın, farklı senesens biçimlerinde genel içsel program ortak olabilir. Bu programda yer alan bir regülatör senesens geni, sonuç olarak senesens ve ölüm meydana getirebilecek ikinci bir gen ifade dizisini başlatabilir.

Konu ile ilgili çalışan araştırmacılar tarafından diğer canlılarda olduğu gibi bitkilerde de hücrede serbest radikallerin birikimi ile yaşlanma arasında bir ilişki olduğu önerilmiş ve bu teoriye “Yaşlanmanın Serbest Radikal Teorisi” adı verilmiştir (Harman, 1956). Reaktif oksijen türlerinin toksik özelliklerine ve yüksek reaktivitelerine bakılarak bu radikallerin birikiminin senesens prosesleri ile ilişkili degradasyon olaylarında rol oynadığı düşünülmektedir.

Aerobik organizmalar solunumda terminal bir oksidan olarak moleküler oksijeni kullanırlar. Ancak, tekli oksijen (1O_2), süperoksit radikali (O_2^-), hidroperoksil radikal (HO_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\bullet OH$) gibi toksik ara ürünlerine indirgenme potansiyeline sahiptir. Bu moleküller genel olarak reaktif oksijen türleri (ROS) olarak isimlendirilir. Tüm ROS’ i çok reaktif moleküllerdir ve DNA, proteinler ve lipidler gibi bir çok biyolojik molekülü okside edebilirler (Dat et al., 2000). Bitki sisteminde ROS üretimine eşlik eden birçok reaksiyon bilinmektedir. Bu reaksiyonlardan bazıları fotosentez ve solunum gibi normal metabolizmada yer alırlar. Oksidatif stresin oluşumu ROS’ nin meydana gelmesi ve detoksifikasyonları arasındaki dengeye bağlıdır (Mittler 2002, Zimmermann and Zentgraf, 2005). Kloroplast ve mitokondri membranlarındaki elektron transport döngüsü süperoksit anyonu ve tekli oksijen gibi ROS oluşumunda çok aktiftir. Hidrojen peroksit gibi radikallerin oluşturulduğu diğer bir kaynak da peroksizomlar (fotoksidasyon ve yağ asidi β -oksidasyonu), hücre zarı ve hücre duvarıdır (Mittler, 2002).

Bitkilerde en önemli ROS kaynağı kloroplast organelidir. Fotosentez süresince ışık enerjisi redoks reaksiyon serileriyle absorblanır ve fotosistem

reaksiyon merkezlerine iletilir. Böylece elektronlar CO_2 'e ulaştırılır. Sadece bazı bitkilerde CO_2 fiksasyon oranı ışık enerjisinin %50' sinden fazlasını dönüştürecek kadar yüksektir (Baker, 1991), moleküler oksijen gibi alternatif elektron alıcıları kullanılır ve bu durumda süperoksit radikalleri (O_2^-) oluşur. Kloroplastın dikkate değer miktarda tekli oksijen ($^1\text{O}_2$) oluşturmalarının yanı sıra ROS ana kaynağıdır. Normalde, klorofilin artan tekli oksijen durumu enerjinin ya da elektronların transferine hizmet eder. Klorofil enerjinin salınması için floresans ve ya konversiyon kullanır ve bunlar da tekli oksijen oluşumuna neden olur (Arora, et al., 2002).

Bir diğer ROS kaynağı peroksizomdaki fotorespirasyondur. CO_2 fiksasyonu esnasında ribuloz-1,5-bifosfat-karboksilaz (RubisCO), karboksilat ribuloz-1,5-bifosfat oluşturmak için CO_2 ' i kullanır. Bu enzim aynı zamanda oksijen kullanarak oksijenat ribuloz-1,5-bifosfat oluşturabilir (Foyer, 1996). Bu reaksiyon süresince glikolat açığa çıkar ve kloroplastlardan peroksizomlara taşınır. Glikolat okside olur ve yan ürün olarak H_2O_2 açığa çıkar.

Reaktif oksijen türlerinin kaynağı olarak mitokondri organeli de önemlidir. Senesense uğrayan dokularda mitokondri ve peroksizom sayısında artışı belirlenmiştir (Del Rio et al., 1998). Mitokondriyel elektron taşınım zinciri ubiquitin ortak havuzunu indirgeyen dehidrogenaz komplekslerinden oluşmaktadır (Millenaar and Lambers, 2003). Sitokrom-c-oksidad ve alternatif oksidad terminal elektron alıcı olarak görev alır. Burada, süperoksit radikali ubiquitin ve NADH-dehidrogenaz ile oluşturulur.

Oksijen radikalleri tüm organizmalar için aşırı reaktif ve sitotoksiktir. Bitki senesensinde oksidatif hasarın öncülleridir. Bu radikaller; superoksit radikallerini ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroksil radikallerini ($\bullet\text{OH}$), tekli oksijeni ($^1\text{O}_2$), H_2O_2 , alkoksil radikalleri ($\text{RO}\bullet$), peroksil radikalleri ($\text{ROO}\bullet$), çoklu doymamış yağ asitleri, semikinon serbest radikalleridir. Süperoksit radikali gibi bazı reaktif oksijen türevleri biyomolekülleri çok hızlı bir şekilde okside eder. DNA gibi biyomoleküllerin hasara uğraması dönüşümsüzdür ve metabolik bozunmaya neden olarak hücre ölümüne yol açar (Halliwell and Gutteridge, 1989). Ayrıca, doymamış yağ asitleriyle etkileşerek plazmalemma veya intraselüler organlarda önemli membran lipidlerinin peroksidasyonuna neden olurlar. Plazmalemmanın peroksidasyonu hücreden sızıntıya, hızlı bir dehidrasyona ve son olarak hücre ölümüne neden

olur. İntraselüler membranların hasar görmesi mitokondri solunum aktivitesini etkiler ve pigmentlerin degradasyonuna, CO₂ fiksasyonunun kaybına öncülük eder.

Yüksek miktarlardaki ROS' leri fotosentetik yapılara zarar vererek fotoinhibisyona yol açar. Ayrıca, yapraklardaki renk kaybına pigment oksidasyonu neden olur (Dat et al., 2001). Histidin, metionin ve triptofan gibi özel aminoasitler süperoksit radikalleriyle okside olurlar (Knox and Dodge, 1985). Hidrojen peroksit -SH gruplarını okside eder ve yüksek konsantrasyonlarda programlı hücre ölümünü hedefleyebilirler. Hipersensitif yanıt (HR) savunmada en hızlı yanıttır. İlk reaksiyonlardan biri enfeksiyonun olduğu bölgede lokal hücre ölümüne neden olan hızlı H₂O₂ birikimidir, dolayısıyla patojenin yayılımı engellenir (Foyer and Noctor, 2003). Bununla birlikte sinyal molekülü olarak hidrojen peroksit, enfeksiyonun olduğu bölgeden enfeksiyonun ulaşmadığı bölgeye (distal bölge) iletildiğinde “kazanılmış sistemik direnç” (SAR) gerçekleşmesinde rol oynar (Kuźniak and Urbanek, 2000). Böylece toksik olmayan konsantrasyonlarda H₂O₂ birikimi ile patojenezle ilişkili genlerin ifadesi farklılaşır ve patojenlere karşı sistemik direnç gelişir (Ryals et al., 1996). H₂O₂ düşük konsantrasyonları biyotik ya da abiyotik stresin algılanmasında sinyal molekülü olarak davranabilir (Foyer et al., 1998; Grant and Loake, 2000). MAPK kaskadları ve kalmodulin, farklı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ya da inhibisyonuna önderlik eden bu sinyal iletim yollarının elementleridir (Harding et al., 1997; Kovtun et al., 2000).

1.2 Antioksidan Enzimler

Hidrojen peroksit (H₂O₂) detoksifikasyonu bitkilerde hücre korunumu ve hücre sinyalizasyonu için gereklidir (Dat et al., 2000; Mittler, 2002; Neill et al., 2002; Apel and Hirt, 2004). Hidrojen peroksit tüm hücre kompartmanlarında oluşabilir. Hidrojen peroksidin peroksizomlarda detoksifikasyonundan katalaz enzimi sorumludur. Diğer hücre kompartmanlarında askorbat-glutasyon döngüsüyle H₂O₂' yi uzaklaştıran askorbat peroksidaz ve glutasyon reduktazın içinde bulunduğu diğer sistemler bulunmaktadır. Burada, NADPH+H⁺ kullanılarak H₂O₂, H₂O' ya indirgenir. Bu reaksiyonda askorbat ve glutasyon önemli bir rol oynar. Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) askorbatı

kullanarak dehidroaskorbat (DHA) üretimi vasıtasıyla H_2O_2 ' i suya indirger. Gerekli askorbat seviyesinin sürdürülmesi için indirgenmiş glutatyonun (GSH) oksidasyonu ile dehidroaskorbatı askorbata indirgeyen dehidroaskorbat reduktaz (DHA; EC 1.8.5.1) ile yeniden oluşturulması gerekmektedir. Glutatyon reduktaz (GR; EC 1.6.4.2), $NADPH+H^+$ kullanılmasıyla okside glutatyonun (GSSG) indirgenmesi yoluyla GSH' u yeniden oluşturur (Bowler et al., 1992). APX, H_2O_2 ' e karşı yüksek bir afiniteye sahiptir ve düşük konsantrasyondaki H_2O_2 ' i de detoksife edebilir. Buna karşın CAT yüksek reaksiyon oranına sahip olmasına rağmen H_2O_2 ' e düşük afinitededir. Ancak, peroksizomal H_2O_2 ' in eliminasyonu rolünün yanı sıra oksidatif stres esnasında redoks dengesinin sürdürülmesi için katalaz işlevinin kritik olduğu görülmektedir. Özellikle bazı C_3 bitkilerinde stresten korunmak için gereklidir (Willekens et al., 1997). Bitkilerde reaktif oksijen türlerini uzaklaştıran çeşitli enzimler bulunmaktadır ve bu enzimler antioksidan enzimler olarak isimlendirilirler. H_2O_2 ' i uzaklaştıran hızlı ve etkili en az beş farklı enzim bulundurulur; askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX), peroksiredoksinler (PrxR,) ve peroksidazlar (POX). Askorbik asit ve glutatyon (Noctor and Foyer, 1998) antioksidanlarla birlikte H_2O_2 detoksifiye ederler. Bu beş farklı sistem hidroksil radikali oluşumuna öncülük eden ve süperoksit süpürücü enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) ile birlikte çalışır. Bitkilerde ROS'ni uzaklaştıran süpürücü enzimlerin koordineli işlevi bu moleküllerin toksik düzeylerde birikiminin önlenmesi ve çeşitli sinyal iletim yollarının kontrolü için kritik önem taşır. ROT'ların görev aldığı sinyal iletim yolları patojen savunması, stoma sinyalizasyonu, stres yanıtı, büyüme, gelişme ve hormon sinyalizasyonu gibi proseslerin kontrolü ve düzenlenmesinde görev alır (Kovtun et al., 2000; Pei et al., 2000; Mullineaux and Karpinski, 2002; Torres et al., 2002; Foreman et al., 2003; Kwak et al., 2003; Overmyer et al., 2003; Mittler et al., 2004).

1.2.1 Peroksidaz (POX; EC 1.11.1.7)

Bitki peroksidazları (EC 1.11.1.7, hidrojen peroksit oksiredüktaz donörü) birçok kez çalışılan fakat en az anlaşılabilen bitki proteinleridir (Gaspar et al., 1982). Yapı ve birçok klorometrik çalışmaya duyarlı olması peroksidazı genetik, fizyolojik ve patolojik çalışmada uygun bir marker yapar (Greppin et al., 1986;

van Huystee, 1987). Peroksidazlar polisakkaritlerin bağlanmasında (Fry, 1986), indol-3-asetik asit oksidasyonunda (Hinnman and Lang, 1965), ektensin monomerlerinin bağlanmasında (Everdeen et al., 1988), lignifikasyonda (Grisebach, 1981), yaralanmaların onarımında (Espelie et al., 1986), fenol oksidasyonunda (Schmid and Feucht, 1980), patojenlere karşı korunmada (Hammerschmidt et al., 1982) ve hücre uzamasının kontrolünde (Goldberg et al., 1986) görev almaktadırlar. Peroksidazlar fazla katalitik olmalarına rağmen özgünlükleri çok azdır ve çok fazla izoenzime sahiptir (Gaspar et al., 1982). Bu özellikler bitkilerde peroksidaz işlevinin tam olarak belirlenmesini zorlaştırır. Bu enzim bitki gelişimi ve çevreye adaptasyonunda rol oynamaktadır.

Birçok çalışma peroksidaz aktivitesinin senesens süresince yapraklarda arttığını desteklemektedir (Farkas, et al., 1963/1964; Kısban et al., 1964; Parish, 1968). Yaprakların fizyolojik olarak yaşanmasıyla enzimde artış belirlenmiştir (Ford and Simon, 1972; Maraite, 1973; Parish, 1968). Parish (1968) peroksidaz aktivitesinin artışını olgunluk ve senesensin güvenilir bir indikatörü olduğunu savunmaktadır. Fakat Ford ve Simon (1972) Parish' in (1968) tezini desteklememektedir, çünkü senesens ertelendiğinde de peroksidaz aktivitesi birkaç kat artmıştır. Ayrıca klorofil ve protein seviyeleri salatalık filizlerinde artmıştır. Bu araştırmalar ile peroksidaz aktivitesinin artışı güvenilir bir indikatör olmadığı sonucuna varılmıştır.

1.2.2 Askorbat Peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11)

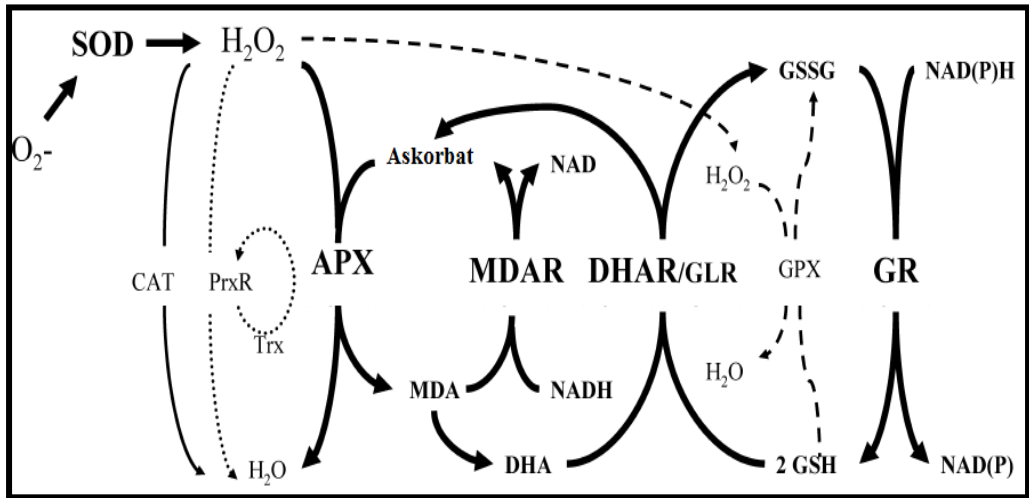
Askorbat peroksidaz kloroplastlarda, sitosolde ve peroksizomlarda bulunur ve askorbatın glutatyon, indirgenmiş ferrodoksin veya NADPH ile yeniden indirgenmesine neden olur (Shigeoka et al., 2002). Hayvanlarda yaygın olarak bulunan glutatyon peroksidazlar H_2O_2 detoksifikasyonunda önemli bir rol oynadığı görülmemektedir. (Eshdat et al., 1997). Peroksiredoksinler thioreoksin ve glutaredoksin ile hem alkil hidroperoksidaz hem de H_2O_2 ' in redüksiyonunu indirger ve bazı bitki hücre organellerinde bulunur (Rouhier and Jacquot, 2002).

CAT, GPX, PrxR ve POX' ın aksine APX (EC. 1.11.1.11) bitki ve alglerde bulunmasıyla eşsizdir (Asada and Takahashi, 1987; Shigeoka et al., 2002; Raven, 2003).

Askorbat peroksidaz askorbatı substrat olarak kullanarak reaksiyonu katalizler;



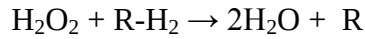
Askorbat peroksidaz bitki hücre organellerinin neredeyse hepsinde bulunmaktadır ve askorbat-glutasyon döngüsünün ya da Asada–Halliwell–Foyer sinyal yolunun bir parçası olarak H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında görev alır (Şekil 1; Foyer and Halliwell, 1976; Asada and Takahashi, 1987). Şekil 1 ayrıca APX işlevinin indirgen askorbik asit ve bazı durumlarda indirgen glutasyon (monodehidroaskorbat redüktaz ve dehidroaskorbat göreceli aktivitelerine bağlı olan, (Polle, 2001) havuzunun ulaşılabilirliğine bağlı olduğunu da göstermektedir. Bir grup enzimle (monodehidroaskorbat redüktaz, dehidroaskorbat redüktaz, glutaredoksin ve glutasyon redüktaz; şekil 1) NAD(P)H 'in okside glutasyon ve askorbik asit rejenerasyonu ile indirgen durumda antioksidan hücre havuzları devamlılığı sağlanır.



Şekil 1.1: Bitkilerde H_2O_2 'in uzaklaştırıldığı temel hücresel yollar. Süperoksit dismutaz-askorbat-glutasyon redüktaz döngüler yer almaktadır. Bunlar kloroplast, mitokondri, sitosol, peroksisomlar, mikrozoamlar ve apoplastta bulunmaktadır. Açıklamalar: APX, askorbat peroksidaz; DHA, dehidroaskorbat; DHAR, dehidroaskorbat redüktaz; MDA, monodehidroaskorbat; MDAR, MDA redüktaz; GLR, glutaredoksin; GPX, glutasyon peroksidaz; GR, glutasyon redüktaz; GSH ve GSSG, indirgenmiş ve okside glutasyon; PrxR, peroksiredoksin; SOD, süperoksit dismutaz; Trx, thioredoksin.

APX önce kloroplast ve algde izole edilmiştir (Gordon & Beck, 1979; Shigeoka et al., 1980; Nakano & Asada, 1981). Kloroplastlarda, APX' in üç farklı formu bulunmuştur; tilakoid membranlarına bağlı tilakoid APX, günümüzde çözünebilen izoformlar olarak stomatal ve lümen APX' ları (Asada, 1999; Shigeoka et al., 2002; Mittler et al., 2004). Askorbat glutatyon döngüsünün diğer iki stomatal enzimi (Şekil 1) hem kloroplastı hem de mitokondriyi hedefler. Bu stomatal enzimler monodehidroaskorbat redüktaz ve glutatyon redüktazdır (Creissen et al., 1995; Obara et al., 2002; Chew et al., 2003). Kloroplast ve mitokondrinin yanı sıra askorbat-glutatyon döngüsü enzimleri askorbat-glutatyon yolunun H_2O_2 ' i uzaklaştırdığını destekler şekilde peroksizomlarda, glokozomlarda ve apoplastta da bulunmaktadır (Corpas et al., 2001; Pignocchi and Foyer, 2003).

Substrat afinitesi H_2O_2 detoksifikasyonundacönemli bir parametredir (Mittler, 2002). Dolayısıyla APX ve GPX gibi enzimler H_2O_2 ' e karşı yüksek afiniteye (mikromolar- submikromolar aralığında), CAT ve PrxR gibi enzimler de düşük afiniteye (millimolar aralığında) sahiptir. H_2O_2 ' in CAT ve PrxR ile etkili bir şekilde uzaklaştırılması için bu enzimlerin spesifik hücre organellerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunması gerekir.

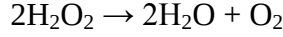


1.2.3 Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6)

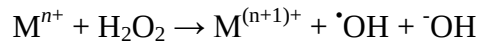
Katalaz, indirgen bileşenlere gerek duymadan H_2O_2 ' i süpüren tek enzimdir (Scandalios, J.G. et al., 1997). Bitkiler katalazın farklı izoformlarını bulundurlar. Normalde katalazlar homotetramer formundadır fakat bazı durumlarda heterotetramer formlarına dönüşebilirler. Mısır mitokondrilerinde bulunan CAT-3 haricindeki karakterize edilen katalazlar bu güne dek fotorespirasyon ve yağ asidi β -oksidasyonunu süresince oluşan hidrojen peroksidin yer aldığı peroksizomda bulunmaktadır. H_2O_2 , ROT sentezlendiği diğer alanlardan peroksizoma difüze olabilirler (Mittler R., 2002). Alternatif H_2O_2 süpürücü sistemlerden katalaz geri döngüsünün çok hızlı fakat H_2O_2 afinitesinin düşük olmasıyla diğerlerinden ayrılır (Nicholls et al., 2001). Bu nedenle, katalaz

yüksek H₂O₂ seviyelerinin kontrolünü sağlar. Katalazın en önemli avantajı H₂O₂ uzaklaştırılmasında herhangi bir indirgeyiciye bağlı olmamasıdır.

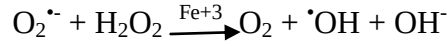
Katalaz enzimi hidrojen peroksidi (H₂O₂) oksijen ve suya dönüştürür;



Katalaz aerobik organizmalarda bulunan ubikitoz bir enzimdir. H₂O₂, iki elektronu transfer eden enzimlerle O₂' e dönüştürülebilir. Süperoksit ve H₂O₂, kloroplast ve mitokondrilerde fotosentez ve solunum elektron taşınım zincirinde ve flavin içeren oksidazlarla oluşur. Fotosentez yapan bitki hücrelerinde H₂O₂ üretim oranının yüksek olduğu görülmektedir. H₂O₂ üretim oranı kloroplastlarda 80-160 $\mu\text{M s}^{-1}$, fotosentez yapan yapraklarda ise 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır (Asada, 1992, Foyer and Noctor, 2003). H₂O₂, proteinlerin sistein ve metionin gruplarını okside eden toksik bir reaktif oksijen türevidir. Sisteinlerin oksidasyonu disülfid bağlarını oluşturur. Metionin ise metionin sülfokside yükseltgenir (Levine et al., 1996). Fotosentez, düşük konsantrasyonda bulunan H₂O₂ ile aktivitesini kaybeder çünkü CO₂ fiksasyonu inhibe olur (Asada, 1992, 1994). 10 μM ' lık H₂O₂ konsantrasyonu izole edilmiş kloroplastlarda CO₂ asimilasyonunu %50 oranında inhibe eder (Kaiser, 1976). H₂O₂ ile inhibe olan diğer duyarlı hedefler tiol içerev ve thioeredoksin ile düzenlenen NADP- bağlı gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz, fruktoz-1,6-bisfosfataz, sedoheptulaz-1,7-bisfosfazaz ve fosforibulokinazlar gibi Calvin döngüsü enzimleridir (Jacquot et al., 1997). Diğer ROS' yle karşılaştırıldığında H₂O₂ daha az reaktiftir. Yine de H₂O₂ kısmen zararlıdır çünkü stabil olduğu için hücreler arası difüze olabilir. H₂O₂ ayrıca sitotoksisiteyi arttıran ROS oluşumunu tetikleyebilir. Fe⁺² ve Cu⁺¹ gibi metallerin varlığında Fenton reaksiyonu ile aşırı reaktif hidroksil radikalleri oluşabilmektedir;



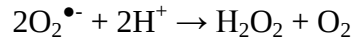
Reaksiyon sonucu oluşan Fe⁺³ veya Cu⁺² Haber-Weiss reaksiyonu ile tekrar indirgenebilir ve Fe⁺² Fenton reaksiyonu için yeniden oluşturulmuş olur. H₂O₂, O₂⁻ ve Fe⁺³, in aynı anda bulunması $\cdot\text{OH}$ oluşumu için tehlikelidir.



Doğrudan ya da dolaylı bir şekilde oluşan sitotoksosite nedeniyle bitkilerin hayatta kalması H_2O_2 ' in süpürülmesine bağlıdır. Peroksidazlarla H_2O_2 ' in detoksifikasyonu için bir indirgeyici gerekmektedir.

1.2.4 Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1)

Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) metalloenzimdir ve tüm oksijen tüketen organizmalarda bulunur. Süperoksit radikallerinin ($\text{O}_2^{\bullet-}$) moleküler oksijen ve hidrojen perokside dismutasyonunu katalizler. Hidrojen peroksit aynı zamanda katalaz ve peroksidazın substratıdır.

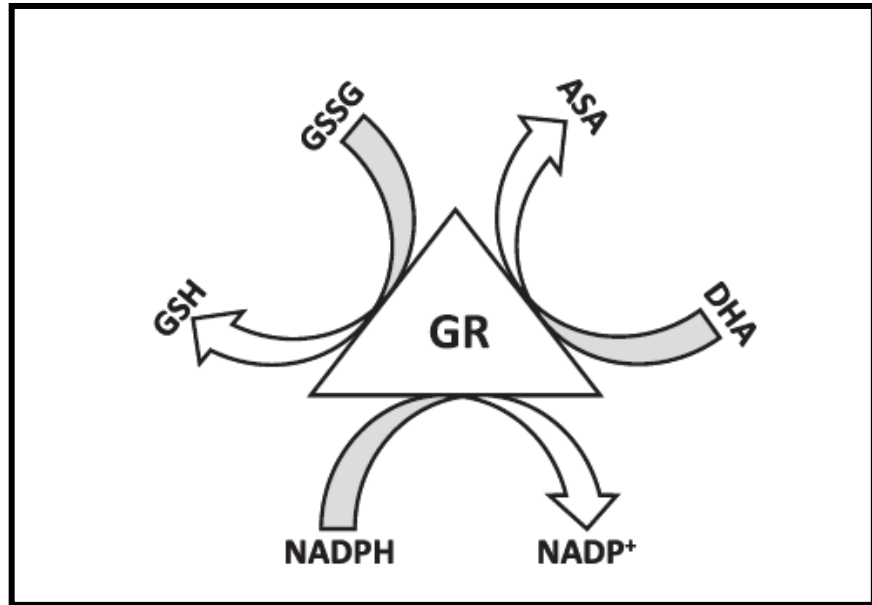


Süperoksit radikalleri bu reaksiyon ile hücreden uzaklaştırılırken, toksik hidroksil radikalleri askorbat peroksidaz (APX), CAT, GR, peroksiredoksi, Tip-III peroksidazlar gibi enzimlerle Haber-Weiss reaksiyonunda uzaklaştırılır (Cho et al., 2009; Arora et al., 2002). Takahashi ve Asada (1983) fosfolipid membranlarının süperoksit radikallerine geçirimsiz olduğunu göstermişlerdir. Dolayısıyla, süperoksit oluşumunda SOD' un varlığı gereklidir.

Aktif bölgelerindeki metal kofaktörlere göre 3 farklı SOD enzimi vardır. Bunlar, Fe-SOD, Cu/Zn-SOD ve Mn-SOD'dur. Fe-SOD'lar prokaryotlar, algler ve yüksek bitkilerin plastitlerinde, Mn-SOD'lar mitokondri ve peroksizom ve Cu/Zn-SOD ise kloroplast, sitoplazma ve hücresel arası boşluklarda bulunmaktadır (Tanaka et al., 1999; Gechev et al., 2006). Yapılan çalışmalarda senesense uğrayan yapraklardaki Mn-SOD aktivitesinin arttığı ve iki yeni Cu/Zn-SOD' un belirlenmiştir (Pastori and del Rio, 1994, 1997). Mn-SOD peroksizomlarda düşük yoğunluklu artış göstermiş ancak Cu/Zn-SOD' un yüksek yoğunluklu bir artış göstermiştir.

1.2.5 Glutasyon Redüktaz (GR; EC 1.6.4.2)

Glutasyon redüktaz (GR) bir flavo-protein oksidoredüktazdır ve hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunur (Romero-Puertas et al., 2006). Ayrıca ASH-GSH döngüsü için gereklidir ve ROS' ne karşı savunma sisteminde önemli bir rol oynar. Çoğunlukla kloroplastta yer alan GR çok az miktarlarda mitokondri ve sitosolde de bulunmaktadır (Creissen et al., 1994, Edwards et al., 1990). GR, bitkilerde antioksidatif proseslere ve metabolik düzenlenmeye katılan bir molekül olan GSH redüksiyonunu katalizler. GR ayrıca disülfid bağlı GSSH' ların NADPH bağlı reaksiyonunu katalizleyerek GSH havuzunun devamlılığını sağlar (Reddy and Raghavendra, 2006, Chalapathi Rao and Reddy, 2008, Şekil 2).



Şekil 1.2: Glutasyon redüktaz ve hücresel redoks.

GR oksidatif strese karşı savunmada yer alırken GSH, ASH-GSH döngüsü, sülfhidril gruplarının ve GST' ler için substrat oluşumu gibi hücre sistemleri için önemli reaksiyonlarda rol alır (Reddy and Raghavendra, 2006). GR ve GSH çeşitli stresler altında bitkinin toleransının belirlenmesinde kritik bir rol oynar (Chalapathi Rao and Reddy, 2008). GR aktivitesinin Cd varlığında arttığı *C. annum* (Leon et al., 2002), *A. thaliana* (Skorzynska-Polit et al., 2003/4), *V. mungo* (Singh et al., 2008), *T. aestivum* (Khan et al., 2007) ve *B. juncea* (Mobin and Khan, 2007)' da bulunmuştur. Eyidogan ve Oz (2005) *C. arietinum* L. cv. Gokce' nin tuz stresi altında yaprak dokularında GR aktivitesinin arttığını belirlemişlerdir.

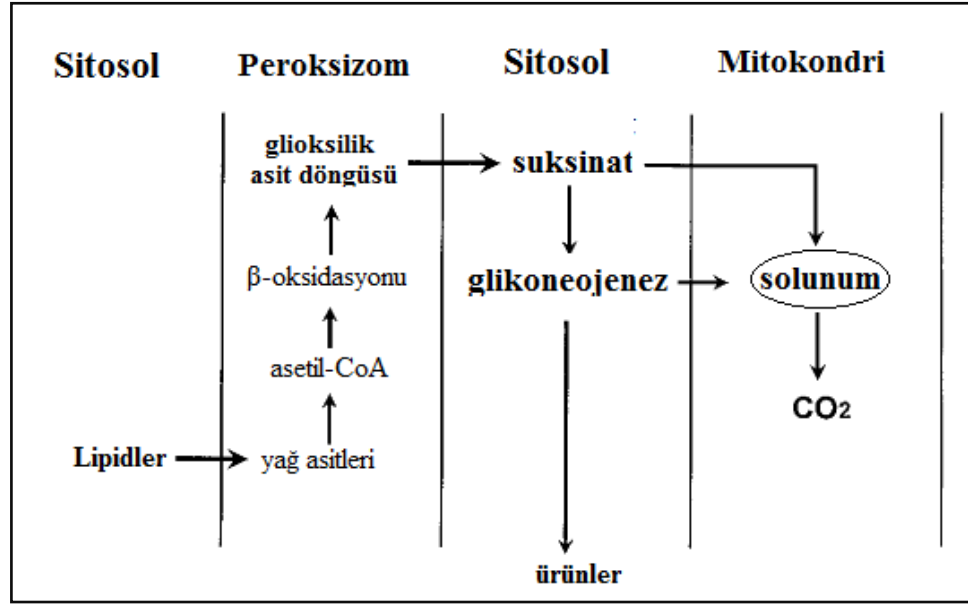
Aynı şekilde Kukreja et al. (2005) tuz stresine maruz kalan *C. arietinum* köklerinde GR aktivitesinin arttığını gözlemlemişlerdir. Srivastava et al. (2005) *A. doliolum*’ da Cu stresi altında GR aktivitesinin azaldığını fakat tuz stresi altında bu aktivitenin arttığını belirlemişlerdir. Sharma and Dubey (2005) *O. sativa* fidanlarının kuraklık stresi altında GR aktivitesinin belirgin bir şekilde arttığını, kuraklık ve yüksek ışık altında *P. asperata* Mast. Fidanlarındaki GR aktivitesinin arttığı gözlenmiş fakat düşük ışık koşullarında büyütülen fidanlarda kuraklığa bağlı bir GR artışı gözlenmemiştir (Yang et al., 2008).

Serbest oksijen radikallerinin yer aldığı reaksiyonlar bitki senesensini karakterize eden bir özelliktir ve hücre ölümüne doğru giden bu proseste oksidatif bozunumun organizasyonunda yer alır (Thompson et al., 1987). Bitki senesensindeki önemli faktörler lipoksijenaz aktivitesi, reaktif oksijen türevleri ve etilen ile jasmonik asit gibi senesense teşvik eden bileşenlerdir (Leshem, 1988). Reaktif oksijen türevleri bitki senesensinde oksidatif hasarın öncül nedenidir (Del Rio et al., 1998).

Organel ve membran degradasyonu serbest radikallerin üretiminin artışının bir sonucudur. Ayrıca, hidrojen peroksit gibi indirgen oksijen miktarı senesens süresince çok fazla artar. Bitkiler; toksik metabolitleri süpüren katalaz, superoksit dismutaz ve askorbat-glutasyon döngüsü bileşenleri gibi bir seri antioksidatif enzimlerin aktivasyonu ile yanıt verirler (Foyer et al., 1994).

Reaktif oksijen türevlerinin gereğinden fazla oluşması peroksizomlardaki peroksidazın aktivasyonu, membran-bağlı lipoksijenazların aktivasyonu ve elektron transport zincirinde elektronların kaybı gibi senesens süresince gerekli bazı proseslerin gerçekleşmesiyle uyarılır. Lipid peroksidasyonu, senesense öncülük eden etilen formasyonunda bir artışı başlatan serbest radikallerin oluşumuna öncülük eder (Arora et al., 2002). Senesens süresince oksijen radikallerinin aşırı artışı hayvan sistemlerinde de gözlenebilir transgenik *Drosophila melanogaster*’ de farklı radikalleri süpüren enzimlerin aşırı ifadesinin uyarılması araştırılmış. Katalaz ve ya süperoksit dismutazın aşırı ifadesi tek başına bir etkiye sahip değilken aynı enzimlerin kombine halinde aşırı ifade olması uzamış yaşam döngüsü ile sonuçlanmıştır (Orr and Sohal, 1994). Bitki sistemlerinde senesens esnasında artan radikal seviyelerinin sadece radikal oluşumunun artmasıyla değil antioksidan enzimleri oluşumdaki dengenin

kaybıyla ilişkili olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Şekil 3) (Halliwell and Gutteridge, 1989; Sen Gupta et al., 1993).



Şekil 1.3: Senesense lipid yıkımının metabolik yolu.

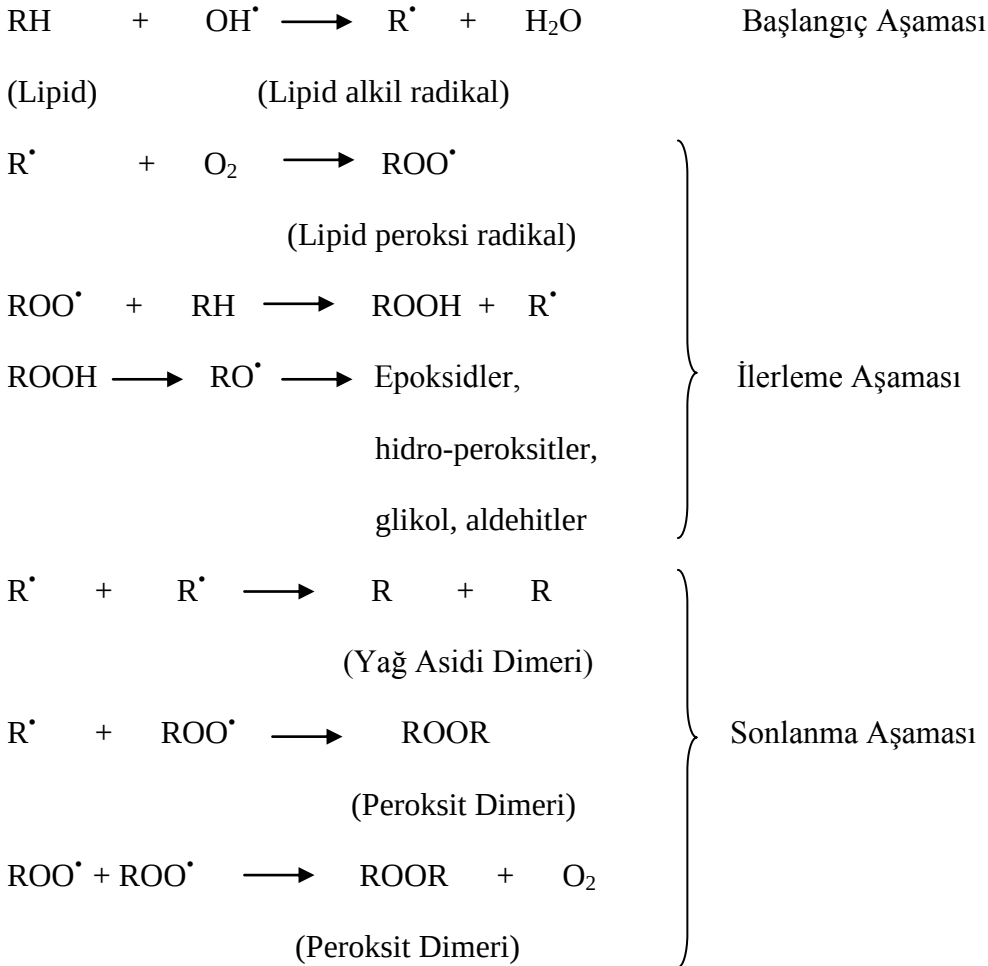
Antioksidatif kapasite ve potansiyel hayat döngüsünün birbiriyle ilişkili olduğu birçok organizmada görülmüştür (Sohal and Weindruch, 1996). Örneğin, Prochazkova et al., (2001) erken senesense uğrayan bir mısır hattının (cv. X 3342) olgunlaşma aşamasında H_2O_2 oluşumunun ve lipid peroksidasyonunun artışıyla uyarılan semptomların farklı antioksidan enzim aktivitelerini azalttığını belirlemişlerdir (Prochazkova et al., 2001).

1.3. Lipid Peroksidasyonu

Bitkilerde stres oluşturan koşullar altında ROS üretimi meydana gelir ve antioksidan savunma mekanizması devreye girer (van Breusegem et al., 1998). ROS oluşumuyla birlikte lipidlerin, fosfolipidlerin veya diğer doymamış yağların peroksidasyonu gibi hücresel hasarlar oluşur. Peroksidasyon, lipidlerin bozunumuna ve membranların fonksiyonlarını kaybetmesine neden olur, dolayısıyla membran akışkanlığının kaybı, membran enzimlerinin inaktivasyonu ve lipid bağlarında kopmalarına yol açar (Girrotti, 1990). Lipid peroksidasyonu (özellikle hücre membranı fosfolipidleri) bitki hücrelerinde karbon kaynaklı

radikal üretiminde önemlidir (Winston, 1990). Bitki hücrelerinde lipid peroksidasyonunun bazı ROS' i ile ilişkili olduğu görülmektedir.

Membran lipid peroksidasyonu üç aşamaya sahiptir; başlama, ilerleme ve sonlanma. Başlama olayı metal komplekslerinin özellikle Fe ve Cu' ın dönüşümünü içerir. Bu metal kompleksleri hem reaktif oksijen üretiminde yer alır hem de lipid hidro-peroksidazlarının dekompozisyonunu katalizler. $O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 başlama reaksiyonuna duyarlıdır, fakat $OH^{\cdot}$ çok aktiftir, lipid reaksiyonunun başlaması $OH^{\cdot}$ aracılığıyla gerçekleşir. Zayıf bağlı Fe, lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu düzenleyen alkoksil ve peroksil radikallerinin oluşumuyla sonuçlanan lipid peroksidasyonunun dekompozisyonunu katalizler (Winston, 1990, Aust et al., 1985).



Lipid peroksidasyonu, bu proseste ikincil bir yan ürün olan malondealdehit (MDA) miktarının ölçümüyle gerçekleştirilir (Halliwell and Gutteridge, 1986). MDA içeriğinin belirlenmesi hem köklerde hem de yapraklarda oksidatif hasarın ve lipid peroksidasyonu seviyelerinin açığa çıkarılması açısından önemlidir (Queiroz et al., 1998; Zhou and Zhao, 2004).

1.4 Mevsimsel Değişim ve Kök Senesensi

İlkbaharda büyüme ve sonbaharda senesensin neden olduğu mevsimsel değişim özellikle kış mevsiminin uzun ve şiddetli bir şekilde yaşandığı bölgelerde yapraklarını döken bitkilerde önemlidir. Bununla birlikte mevsimsel değişime bağlı biyokütle dönüşümü CO₂ konsantrasyonunun mevsimsel olarak değişimi açısından da etkilidir (Keeling et al. 1996). Bu bağlamda yaprak değişimi ile ilgili senesens süreci iyi bilinmesine rağmen mevsimsel kök senesensi ile ilgili süreçlerin nasıl meydana geldiği tam olarak bilinmemektedir. Yapraklarını döken ağaçların ince köklerinin mevsimsel olarak değişimi ve büyüme sezonu sonunda kök ölümü üzerinde daha az çalışılmış bir konudur (Hendrick and Pregitzer 1996; Wells and Eissenstat 2001; Wells et al. 2002; Kern et al. 2004; Baddeley and Watson 2005; Satomura et al. 2006). Kış aylarında otsu çayır bitkilerinde canlı kök miktarı azalmaktadır ve dolayısıyla da üretim azalmaktadır (Fitter et al. 1998; Liu and Huang 2002), dolayısıyla hücre ölümü artışı, gün uzunluğunun kısaldığı ve sıcaklıkların azaldığı yaz sonu gerçekleşmektedir (Volder et al. 2007). Küçük mevsimsel değişimler ince köklerin kısa hayat döngüsüne sahip olmalarına neden olmaktadır (Eissenstat and Yanai 1997; Zak et al. 2000; Gregory 2006). Ancak türlerin ekolojik stratejileriyle de ilişkili olabilen ortalama kök hayat döngüsü, türler arası büyük bir değişiklik gösterir (Ryser 1996; van der Krikt and Berendse 2002). Doğal koşullardaki otsu bitkilerde kök senesensinin zamanlamasına dair elde edilen veriler, türler arasında bu prosesin nasıl bir değişiklik gösterdiği ve bu türlerin ekolojik gerekliliklerinin önemine dair bilgiler hala yetersizdir.

Kök ölümünün mevsimsel değişim açısından incelendiği çalışmalar daha çok ağaçlarda ve tarımsal bitkilerde yapılmıştır. Kök dönüşüm modelinin anlaşılması bir bitki için gerekli besin kaynakları dengesinin ve ekosistemdeki karbon döngüsünün karşılaştırılması açısından yaprak dönüşümünün anlaşılması

kadar önemlidir. Örneğin, arktik sulak alan ekosistemlerinde ince kök üretimi net birincil üretimin üçte birini oluşturmaktadır (Nadelhoffer et al., 2002). İnce kök dönüşümü çevresel koşullara duyarlıdır (Guo et al., 2008).

Genel olarak ılıman sulak alanlardaki kök senesensi ve mevsimsel değişimi üzerinde yapılan çalışmalar çok az sayıdadır (Gill and Jackson, 2000). Shaver ve Billings (1975) yaptıkları bir araştırma sonucunda, arktik sulak alanlarda yetişen üç gramine türünü karşılaştırmıştır. Bu türlerden birinin her yıl yeni bir kök sistemi ürettiğini ve diğerlerinin de mevcut kök sistemlerini birkaç sene boyunca koruyup kullandıklarını bulmuşlardır. Kış aylarında turbalık alanlarda yetişen *Cladium mariscoides* bitkisinde kök biyokütlesinin azaldığı, *Carex rostrata* bitkisinde ise arttığı bulunmuştur (Bernard 1974; Bernards et al., 1985).

Yaprak senesensinin zamanlaması bitkilerin ekolojik stratejileri açısından önemlidir (Watson and Lu 2004; Kahlert et al., 2005). Mevsimsel değişimde özellikle ılıman sulak alanlarda yetişen graminoid türleri arasında toprak altı biyokütle ve gövde yoğunluğu açısından büyük farklılıklar görülmektedir (Bernard and Bernard 1973, 1977; Gorham and Somers 1973; Bernard 1976). Kuzey-Doğu Ontario’ da yaprak döken biyomun büyüme sezonu uzunluğu yaklaşık 180 gündür (Watson and McIver 1995). *Sparganium* sp. ve *Alisma triviale* Eylül’ de senesense uğrarken; *Carex lacustris* ve *Carex stricta* Kasım’ daki dondurucu soğuklardan sonra senesense uğramaktadır. Nutrient açısından fakir ortamlarda yetişen *Carex oligosperma* ise kış boyunca yeşil kalmaktadır (P. Ryser’ ın kişisel gözlemi).

Ekologların karşılaştığı zorluklardan biri türlerin dağılımı ve bolluğunun arasındaki ilişkinin anlaşılmasıdır (Krebs, 1985). Halen çoğu bitkinin çevresel etkenlere toleransı, ölüm nedenleri ve türle arası ilişki gibi bilgiler sınırlıdır. *Carex exilis* ile yapılan bir çalışmada bitkinin dağılımına ilişkin etkenler belirlenmiştir (Santelmann, 1991). *Carex exilis* Nova Scotia’ nın kuzeydoğusunda, New Brunswick’ in güneydoğusunda ve Newfoundland’ in güneyindeki minerotropik koşulların indikatörüdür (Sjors, 1963; Vitt and Slack, 1975; Glaser et al., 1981; Glaser 1983), ayrıca çayırlarda olduğu kadar ombotrofik bataklık kıyılarında da yetişmektedir (Damman, 1980; Glaser, 1983; Santelmann, 1988). Kuzey Amerika’ daki bazı türlerin (*Aster nemoralis*, *Scirpus cespitosus*,

Vaccinium macrocarpon ve *Xyris montana* gibi) dağılımı belirlenmiştir (Damman, 1980; Glaser, 1983).

1.5 Senesens ve Abiyotik Stres İlişkisi

Kuraklık, düşük ve yüksek sıcaklık, tuzluluk gibi çevresel stresler ürün eldesini kayda değer bir şekilde hasara uğratar. Bu stresler aynı zamanda senesensin oluşumuna da öncülük etmektedir. Senesens, proteinler ve lipidler gibi makromoleküllerin hidrolizi ve fotosentetik aktivitenin kaybı gibi çeşitli hücrel prosesleri içine alan genetik olarak programlanmış bir aşamadır. Çeşitli biyotik ve abiyotik stresler altında ya da doğal senesens esnasında süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve tekli oksijen gibi reaktif oksijen türevlerinin aşırı artışıyla ilk yanıt olan oksidatif patlama meydana gelir (Bhattacharjee 2005). Böylese ROS stres ve senesens proseslerinde merkezi bir bileşen olarak tanımlanmaktadır.

Kuvvetli bir fotooksidatif potansiyeline sahip olan kloroplastlar aşırı ROS oluşumunda etkilenebilir. Tilakoidler yüksek oksijen konsantrasyonu ve elektron taşınım zinciri durumuna göre oksijeni $O_2^{\bullet -}$ e indirger (Navari-Izzo et al. 1999). Dolayısıyla çeşitli çevresel stresler esnasında ROS' ne bağlı hasarın hedeflerini oluştururlar. Kloroplastlar ayrıca bitkilerdeki yaşlanmaya bağlı oksidatif stresin hedef organeli olduğu düşünülmektedir ancak, spesifik ROS detoksifikasyon sistemleri hem tilakoidlerde hem de stomada bulunmaktadır (Munné-Bosch and Alegre 2002; Noctor et al. 2000). Kloroplasttaki ROS, enzimatik olmayan askorbat ve glutatyonun indirgendiği askorbat-glutatyon yolu enzimleriyle süpürülür.

Bitki türleri lokalizasyonları, büyüme durumları ve stres duyarlılıklarına bağlı strese yanıtları farklılık gösterir. Bitkiler çevresel değişiklikler doğrultusunda alışma proseslerini düzenlerler. Alışma yanıtları soğuk, anoksi ve ışık gibi streslerle çalışılmıştır. Soğuğa alışma süreci en iyi çalışılmış olandır (Fryer et al. 1998; Prasad et al. 1994; Wise 1995). Oksidatif stresle ilgili veriler buğdayda (Selote and Khanna-Chopra 2006; Khanna-Chopra and Selote 2007) ve çeltikte (Srivalli et al. 2003) kuraklığa alışma üzerine yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Abiyotik stres dünya genelinde asıl tarım ürünlerinde ortalama %50

kayba sebep olmasıyla ürün kaybının öncelikli nedenidir (Navabpour et al., 2003). Oksidatif stres süresince oluşan reaktif oksijen türevlerinin detoksifikasyon mekanizmalarına odaklanıldığında çeşitli streslere toleranslı bitkilerin üretimine dair yeterli yaklaşımlar bulunmaktadır (Wang et al., 2003). Yukarıda belirtildiği gibi oksidatif stres bazı organların ya da tüm bitkinin senesensine neden olur. Sebzelerin tam gelişimden önce hasat edilmesi enerji ve nutrient kaynaklarının aniden kesilmesiyle büyük bir strese maruz kalmaktadır. Senesensin zamanlaması tohum oluşum zamanı, tohum sayısı ve kalitesi, meyve olgunlaşması gibi birbirinden farklı birçok tarımsal özelliği etkiler. Yaşam ömrünün artışı fungus ve diğer mikro-organizmalar kadar insan sağlığına da önemli etkileri olabilir. Bu yüzden, senesens mekanizmasının anlaşılması tarımsal ürünlerin gelişimi için yeni gereçleri gerektirmektedir.

Daha öncede belirtildiği gibi senesens süreci yaprak ve toprak üstü organlarda daha iyi bilinmesine rağmen köklerde bu sürecin nasıl işlediği bilinmemektedir. Çalışmamızın hipotezi, mevsimsel değişime bağlı senesens sürecinde oksidatif stres ve antioksidan enzimlerin önemli bir role sahip olmasıdır. Bu hipotezin doğruluğunun incelenmesi için kök yaşam döngüleri farklı olan 4 sulak alan bitkisinden ilkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde örnekleme yapıldı. Örneklerde, peroksidaz, askorbat peroksidaz, peroksidaz, katalaz enzimlerinin aktivitelerine, lipid peroksidasyon düzeylerine ve köklerin canlılık yüzdeleri incelendi.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Bitki Materyali ve Örneklem Planı

Çalışmada kök hayat döngüleri farklı olan dört farklı çok yıllık sulak alan monokotil türü kullanılmıştır: *Sparganium androcladum* (Engelmann) Morong ve *Rhynchospora alba* (L.) Vahl türlerinin kök sistemleri sonbaharda canlılığını yitirken; *Scirpus microcarpus* J. Presl ve *Carex exilis* Dewey türleri kış aylarında canlı kalabilmektedir (Ryser and Kamminga, 2009). Çizelge 2.1’ de gösterilen tarihlerde, GPS koordinatları verilmiş olan bölgelerden örneklemeler yapıldı. Kök örnekleri yıkanıp temizlendikten sonra kuru buz içinde muhafaza edilerek laboratuvar ortamına getirildi. Tüm örneklemelerde her türe ait 8 farklı bitkiden kök örneği alındı ve alınan örnekler analiz gününe kadar alüminyum folyo ile paketlenerek -80 C’ de derin dondurucuda saklandı. Her örneklem sırasında taşınabilir termometre ile toprak altı sıcaklıkları ölçülerek örneklem yapılan bölgenin sıcaklık değişiminin belirlendi, bu değerler Çizelge 2.2’ de gösterilmiştir.

	İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Enlem	Boylam	Rakım
<i>Carex exilis</i>	5 Haziran 2012	22 Ağustos 2012	17 Eylül 2012	46°41’ 49.27” N	81°32’ 57.20”W	417 m
<i>Rhynchospora alba</i>	5 Haziran 2012	22 Ağustos 2012	17 Eylül 2012	46° 41’ 39.01” N	81° 32’ 33.70” W	417 m
<i>Scirpus microcarpus</i>	17 Mayıs 2012	24 Ağustos 2012	19 Eylül 2012	46° 21’ 32.15” N	80° 49’ 44.20” W	220 m
<i>Sparganium androcladum</i>	17 Mayıs 2012	24 Ağustos 2012	19 Eylül 2012	46° 24’ 22.43” N	80° 52’ 35.79” W	240 m

Çizelge 2.1: Çalışmada kullanılan bitkilerin örneklem tarihleri ve örneklem yapılan bölge koordinatları

	İlkbahar	Yaz	Sonbahar
<i>C. exilis</i> ve <i>R. alba</i> için	17 °C	25°C	13°C
<i>S. microcarpus</i> ve <i>S. androcladum</i> için	18°C	25°C	13°C

Çizelge 2.2 Örneklem yapılan bölgelerdeki ortalama mevsimsel sıcaklık değişimi

2.2 Canlılık Testi

Renksiz TTC (Trifeniltetrazolyum Klorid) canlı dokularda indirgenerek kırmızı formazan rengi almaktadır ve dokuların canlı veya ölü oldukları renk değişimine bağlı tespit edilir (Kuhn and Jerchel, 1941; Comas et al., 2000; Ruf and Brunner, 2003). Her bir gruptan 10-15 mm uzunluğunda kök örnekleri sentilasyon kavanozuna aktarılıp üzerine 25 ml % 0,3 TTC ve 10 mM glukoz içeren solüsyon eklendi. Solüsyona glukoz eklenmesi kök metabolizmasının devamlılığı için gereklidir (Collet et al., 2002; Robey, 2007). Kavanozlar alüminyum folyoya sarılarak 30 °C’ de 36-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her bir kavanozdaki kök-solüsyon karışımı 20-cm petriye boşaltılmıştır. Petrinin altına karelej yerleştirilerek her bir kök örneğinin pembe ya da kırmızı renk almasına bağlı sayım yapılmıştır.

2.3 Homojenizasyon

-80 °C’ de saklanan kök örneklerinden 0,5 g alınarak 1 mM EDTA ve %2 (w/v) polivinilpolipirrolidon (PVPP) içeren 2 ml 0,05 M Na-P tamponuyla (pH: 7.8) homojenize edildi. Homojenatlar 4°C’ de 14,000 g x 30 dakika santrifüjlendikten sonra ayrılan süpernatantlar protein ve enzim analizlerinde kullanılmak üzere -20 °C’ de saklandı.

2.4 Protein tayini

Örneklerdeki protein miktarı Bradford (1976) yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Standart olarak Bovine Serum Albumin kullanılmıştır. 1 mL’lik polistiren küvetlere 50 µl örnek ve 950 µl reaksiyon karışımı (Coomassie Brilliant Blue) pipetlendikten sonra karışım 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 595 nm’ de örneklerin absorbans değerleri belirlendi. Aynı koşullarda BSA standartlarına ait absorbans değerleri belirlenerek kalibrasyon eğrisi hazırlandı. Kalibrasyon eğrisindeki değerler kullanılarak örneklerdeki protein miktarları mg yaş ağırlık⁻¹ olarak hesaplandı.

2.5 Peroksidaz (POX; EC 1.11.1.7) Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz (POX) enziminin aktivitesi, Herzog ve Fahimi'ye (1973) göre yapıldı. Seyreltilen örnekler, % 50 w/v jelatin ve 0.15 M Na-fosfat-sitrat tamponu içeren, DAB (3,3'-diaminobezidin-tetrahidroklorid dihidrat) çözeltisi ve % 0.6 H₂O₂ eklendi. 465 nm'de absorbans değişimi 3 dk gözlemlendi. 1 enzim ünitesi dakikada tüketilen $\mu\text{mol}^{-1}\text{ml}^{-1}$ H₂O₂ miktarı olarak hesaplandı. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi mg protein⁻¹ g yaş ağırlık⁻¹ olarak belirtildi.

2.6 Askorbat Peroksidaz (APOX; EC 1.11.1.11) Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APOX) enziminin aktivitesi, Nakano ve Asada (1981) yöntemine göre yapıldı. Yöntem, örnekteki enzim tarafından askorbat okside edildikçe, 290nm'deki absorbans düşüşünün belirlenmesine dayanmaktadır. Reaksiyon karışımı, 50 mM Na-fosfat tamponu (pH 7.0), 0.5 mM askorbat, 0.1 mM EDTA Na₂ ve 1.2 mM H₂O₂ içerir. Seyreltilen örnekler reaksiyon karışımı ilave edilerek, reaksiyon 3 dakika süresince izlendi. Okside olan askorbat miktarı ekstinksiyon katsayısından ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) hesaplandı. 1 enzim ünitesi, dakikada okside olan askorbat ($\mu\text{mol ml}^{-1}$) miktarıdır. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi mg protein⁻¹ g yaş ağırlık⁻¹ olarak belirtildi.

2.7 Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz (CAT) enziminin aktivite analizi, Bergmeyer (1970)'e göre yapıldı. 240 nm'de H₂O₂'in tüketilmesi 3 dk süre ile izlendi. Reaksiyon karışımı 0.05 M Na-fosfat tamponu (pH 7.0), % 3 H₂O₂ ve 1 mM EDTA içerir. Dakikada tüketilen $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ miktarı 1 enzim ünitesi olarak saptandı. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi mg protein⁻¹ g yaş ağırlık⁻¹ olarak belirtildi.

2.8 Glutasyon Redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutasyon redüktaz (GR) enziminin aktivitesi, Foyer ve Halliwell (1976) metoduna göre gerçekleştirildi. Reaksiyon sırasında NADPH varlığında, 3 dk süre

ile tüketilen okside glutasyonun miktarındaki azalma, absorbans (340 nm) düşüşü izlenerek tespit edildi. İndirgenen glutasyon (GSSG) düzeyi ekstinksiyon katsayısından ($\epsilon = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) hesaplandı. 1 enzim ünitesi dakikada okside olan glutasyon ($\mu\text{mol ml}^{-1}$) miktarıdır. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi mg protein⁻¹ g yaş ağırlık⁻¹ olarak belirtildi.

2.9 Lipid Peroksidasyonu Tayini

Lipid peroksidasyon analizi Madhava Rao and Sresty (2000) yöntemi temel alınarak yapıldı. Bu yöntemi reaksiyon sonucu oluşan son ürün olan malondealdehit miktarının ölçülmesine dayanmaktadır. MDA analizi için 0,1 g kök örneği 0,5 mL % 0,1 tirkloroasetik asit (TCA) ile homojenize edildi. Homojenat 5 dak 10,000 x g' de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında 300 µl supernatant temiz tüplere aktarıldı ve üzerine 1,2 mL % 20 TCA ve % 0,5 tiyobarbitürik asit (TBA) içeren karışım eklendi. Elde edilen karışım 95°C' de 30 dakika inkübe edildikten sonra buz banyosunda soğutuldu. Karışım 15 dakika 10,000 g' de santrifüj edildikten sonra süpernatantların absorbans değerleri 532 ve 600 nm dalga boylarında okundu. Örneklerdeki MDA konsantrasyonu ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı.

2.10 İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizlerde SYSTAT programı kullanıldı. Mevsimsel değişim ile antioksidan enzim aktivitesi arasındaki ilişki Analysis of Variance (ANOVA) ile; bu parametrelerin MDA içeriği ile ilişkisi ise General Linear Model (GLM) ile belirlendi. Enzim aktivitelerine ve lipid peroksidasyonuna ait ölçümler 8'er tekrarlı yapıldı (n=8).

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 Canlılık Testi

Bitkilerin örnekleme yapıldıkları dönemlerdeki canlılık yüzdeleri Çizelge 3.1’ te verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü üzere çalışmada kullanılan bitkilerin canlılık değerleri ilkbahardan kışa geçildikçe belirgin bir şekilde azalmaktadır.

	İlkbahar	Yaz	Sonbahar
<i>C. exilis</i>	94	89	69
<i>R. alba</i>	95	94	80
<i>S. microcarpus</i>	96	98	83
<i>S. androcladum</i>	96	92	74

Çizelge 3:1 İlkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde bitkilerin canlılık yüzdeleri.

Yapılan çeşitli araştırmalar bitkilerde senesens sürecinin çevresel etkenlere karşı oluşturulan bir yanıt olarak evrim gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu çevresel etkenlere iklim koşullarındaki değişim ve besin maddelerinin azalması örnek olarak verilebilir (Watson and Lu, 2004). Besin maddeleri senesense uğrayan yapraklardan depo organlarına taşınır (Killing, 1996) Bu proses gelişimin sürdürülmesi ve kayıp riskinin en aza indirilmesi açısından önemlidir (Watson and Lu, 2004). Köklerde, besin maddelerinin miktarı yapraklara göre daha azdır ve yapılan son çalışmalarda senesense uğrayan fasulye (Snapp and Lynch, 1996), çim (Aerts, 1990) ve saz bitkisi (Scheffer and Aerts, 2000) gibi otsu bitki köklerinden besin maddelerinin geri taşınımının olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte, belirli bir olgunluğa ulaşmış ağaç köklerinde besin maddelerinin geri taşınımının olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Meier et al., 1985; Goldfarb et al., 1990). Kök senesensinin, çevresel etkenler öncesi besinlerin geri kazanımının sağlanması için değil, solunumun korunması için gerekli olduğu düşünülmektedir (Pritchard and Rogers, 2000). Bu da bitkilerin zorlu koşullarda köklerin kaybedilip yeniden oluşturulmasındansa eskilerin korunumuna yönelik olduğunu göstermektedir (Eissenstat et al., 2000).

TTC indirgenmesinin kullanıldığı kök senesensiyle ilişkili çalışmalarda kök ölümünün birden gerçekleşmediği fakat bu prosesin yavaş olduğu ve senesens ilerledikçe TTC indirgenmesinin azaldığı gözlenmiştir (Clemensson-Lindell, 1994; Comas et al., 2000). TTC indirgenmesi kök solunumuyla ilişkilidir (Comas et al., 2000). Bu yavaş ölüm süreci, programlı olarak gerçekleşmemektedir fakat

bitkiler de görevini yerine getiremeyen köklere olan desteği bırakmaktadır, dolayısıyla hücre progresyonundan doku ölümüne uzanan bir süreç başlamaktadır (Eissenstat and Volder, 2005).

C. exilis, *R. alba* ve *S. androcladum* bitkilerinin canlılıkları yaz sonunda sırasıyla % 5, % 1 ve % 4 oranlarında kademeli olarak azalmaktadır fakat *S. microcarpus* bitkisinin canlılığı yaz sezonunda % 2 artmış ve sonbahara geçişte % 15 azalmıştır. Sonbahardaki canlılık oranları ilkbahara kıyasla *C. exilis*, *R. alba*, *S. microcarpus* ve *S. androcladum* için sırasıyla % 26, 15, 13 ve % 22 oranlarında azalmıştır.

S. androcladum ile yapılan çalışmalar bu bitkinin sonbaharda kök senesensine uğradığını göstermektedir (Ryser and Kamminga, 2009). Çalışmamızda elde ettiğimiz canlılık ve protein değerleri ile ilgili veriler bu bitkide kök senesens sürecinin başladığını destekler niteliktedir (Çizelge 3.1; 3.2). Sonbaharda gözlenen senesens kökte toprak üstü organlarındaki senesense göre daha düşük düzeydedir. Bazı bitkilerde kök senesensi ile yaprak senesensi arasında bir ilişki olduğu bilinmesine rağmen bu ilişki genelleyebilmek mümkün değildir (Ryser and Kamminga, 2009). Örneğin *S. microcarpus* bitkisinde yaprak senesensi çok hızlı gerçekleşmesine rağmen kök senesensi çok düşük düzeylerde gözlenmektedir. (Ryser and Kamminga, 2009). Bitkilerde yaprak ve kök senesensi arasındaki ilişki çok net olarak bilinmemektedir.

3.2 Total Protein Miktarı Sonuçları

Bitkilerde total protein miktarı senesens sürecinde hızlı bir azalma göstermektedir. Özellikle yapraklarda proteinlerin hızlı bir şekilde parçalandığı ve azot taşınımının sağlandığı bilinmektedir (Feller and Fischer, 1994). Sonuçlarımız incelendiğinde tüm bitki gruplarında mevsimsel değişime bağlı olarak kök protein miktarlarında hızlı bir azalma gözlemlendi (Çizelge 3.2) Total protein miktarları ilkbahardan yaza geçişte azalırken yazdan sonbahara geçişte arttı. Fakat bu artış ilkbahardaki değerlerine yakın düzeylerde gözlenmedi.

Yapılan çalışmalarda çeşitli bitkilerde senesens sürecinde total protein miktarı azalırken, transkripsiyon ve vakuolar enzimzimlerin aktivitelerinin arttığı

gözlenmiştir. Yapraklarda senesens sürecinde proteinlerin parçalanması sonucu açığa çıkan aminoasitler yapraklardan floeme iletilmektedir (Hörtensteiner and Feller, 2002).

	İlkbahar	Yaz	Sonbahar
<i>C. exilis</i>	11,55 ± 0,82	9,73 ± 1,2	6,23 ± 1,48
<i>R. alba</i>	8,40 ± 1,11	2,95 ± 0,28	4,49 ± 0,49
<i>S. microcarpus</i>	16,92 ± 2,22	2,21 ± 0,45	5,14 ± 0,9
<i>S. androcladum</i>	12,03 ± 2,78	3,36 ± 0,35	6,77 ± 0,52

Çizelge 3.2: İlkbahar, yaz ve sonbaharda mevsimlerinde örnekleme yapılan bitkilerin total protein miktarları (mg protein ml⁻¹)

Genel olarak tüm bitki gruplarında protein değerleri mevsimsel değişime bağlı olarak azaldı. *C. exilis*'de protein miktarı ilkbahar değerleri ile karşılaştırıldığında yaz sonunda % 16; sonbaharda ise % 46 oranında azaldı. Bu değerler diğer bitkilerdeki protein miktarı değişimlerine göre daha yüksek seviyededir. *R. alba*, *S. microcarpus* ve *S. androcladum* bitkilerinde protein miktarları ilkbahardan yaz sonuna geçişte sırasıyla % 65, % 87 ve % 72 oranında azalma gösterdi. Benzer biçimde bu bitkilerde protein seviyeleri sonbahar döneminde ilkbahar değerlerine göre belirgin düzeyde azaldı. Protein miktarları yaklaşık olarak *R. alba*'da % 47; *S. microcarpus*'ta % 70 ve *S. androcladum*'da % 44 oranında azaldı (Çizelge 3.2).

3.3 Antioksidan Aktivite Sonuçları

Mevsimsel değişimin bir aşaması olan senesens süreci bitki gelişimi açısından da çok önemlidir. Bitkilerin mevsimsel değişim sürecinde rejenerasyonu ve hayatta kalması için gerekli besin maddeleri senesense uğrayan organlardan diğer organlara taşınmaktadır. Tarımsal üretimde bitkilerin streslere karşı toleranslarının ve ürün kalitesinin artırılabilmesi için senesensin geciktirilmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle senesens süreci ile antioksidan enzim aktiviteleri arasındaki ilişkisinin belirlenmesinin bu açıdan değerli bir bilgi olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada kullanılan *C. exilis*, *R. alba*, *S. microcarpus* ve *S. androcladum* bitkilerinin antioksidan enzim (POX, APX, CAT ve GR) aktivite değişim değerleri genel olarak Çizelge 3.3' de verilmiştir.

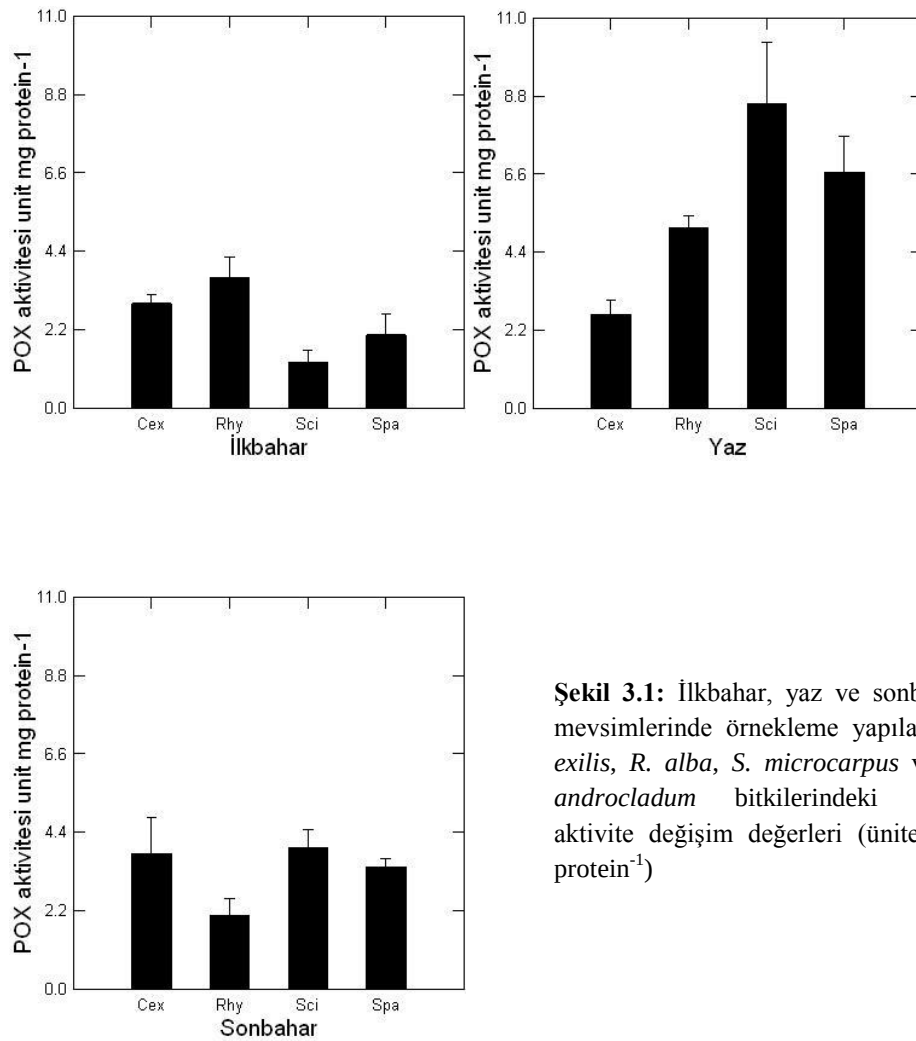
		POX aktivitesi (ünite mg protein ⁻¹)	APX aktivitesi (ünite mg protein ⁻¹)	CAT aktivitesi (ünite mg protein ⁻¹)	GR aktivitesi (ünite mg protein ⁻¹)
İlkbahar	<i>Scirpus microcarpus</i>	1,291 ± 0,35	0,037 ± 0,01	1,732 ± 0,49	0,005 ± 0,003
	<i>Sparganium androcladum</i>	2,057 ± 0,6	0,058 ± 0,02	1,663 ± 0,5	0,024 ± 0,014
	<i>Rhynchospora alba</i>	3,654 ± 0,6	0,022 ± 0,01	3,576 ± 0,82	0,031 ± 0,009
	<i>Carex exilis</i>	2,938 ± 0,26	0,035 ± 0,02	6,211 ± 0,69	0,015 ± 0,006
Yaz	<i>Scirpus microcarpus</i>	8,582 ± 1,62	0,042 ± 0,01	3,114 ± 1,17	0,025 ± 0,02
	<i>Sparganium androcladum</i>	6,654 ± 0,94	0,343 ± 0,04	23,298 ± 4,12	0,015 ± 0,01
	<i>Rhynchospora alba</i>	5,076 ± 0,34	0,112 ± 0,02	5,125 ± 0,44	0,021 ± 0,02
	<i>Carex exilis</i>	2,656 ± 0,36	0,032 ± 0,01	7,332 ± 1,23	0,006 ± 0,01
Sonbahar	<i>Scirpus microcarpus</i>	3,981 ± 0,46	0,022 ± 0,01	2,296 ± 0,72	0,011 ± 0,01
	<i>Sparganium androcladum</i>	3,434 ± 0,21	0,105 ± 0,03	3,210 ± 0,82	0,011 ± 0,01
	<i>Rhynchospora alba</i>	2,077 ± 0,42	0,047 ± 0,02	4,488 ± 1,54	0,036 ± 0,04
	<i>Carex exilis</i>	3,813 ± 0,95	0,022 ± 0,01	3,560 ± 1,06	0,015 ± 0,02

Çizelge 3.3: İlkbahar, Yaz ve sonbaharda örnekleme yapılan bitkilerin POX, APX, CAT ve GR antioksidan aktiviteleri (ünite mg protein⁻¹)

3.3.1 Peroksidaz (POX) Aktivite Sonuçları

Peroksidaz enzim aktivite değerleri tüm bitki gruplarında mevsimsel senesens sürecine bağlı olarak değişim gösterdi (Çizelge 3.3; Şekil 3.1). *C. exilis* türü dışındaki tüm bitkilerde ilkbahardan yaz mevsimine geçiş döneminde POX aktiviteleri arttı. Geç senesense uğradığı düşünülen *C. exilis* türünde ise POX aktivite düzeyi ilkbaharda gözlenen seviyelerde kaldı. POX aktivitesi yaz dönemi sonunda yaklaşık olarak *R. alba*'da 1.4 kat, *S. microcarpus*'da 7 kat ve *S. androcladum*'da 3 kat artış gösterdi. Bu değerler karşılaştırıldığında en yüksek POX aktivitesi geç senesense uğradığı düşünülen *S. microcarpus*'da elde edildi. POX aktivite değerleri mevsimsel olarak karşılaştırıldığında ise; ilkbahar döneminde en yüksek peroksidaz aktivitesi *R. alba*'ya (3,654 ünite mg protein⁻¹) aitken, en düşük değer *S. microcarpus*'a aittir (1,291 ünite mg protein⁻¹). Yaz sonunda ise en yüksek POX değeri *S. microcarpus*'ta (8,852 ünite mg protein⁻¹), en düşük değer de *C. exilis* (2,656 ünite mg protein⁻¹) bitkisinde belirlendi. Sonbahara geçişte ise erken senesense uğradıkları düşünülen *R. alba* ve *S. androcladum* bitkileri sırasıyla 2,077 ve 3,434 ünite mg protein⁻¹ değerleriyle en

düşük değerlere sahipken; *C. exilis* ve *S. microcarpus* bitkileri 3,813 ve 3,981 ünite mg protein⁻¹ değerleriyle en yüksek değerlere sahiptir (Çizelge 3.3). Tüm bitkilerde POX aktivitesi yaz sonunda değişik oranlarda artış gösterirken, bu değerler sonbahar başında azalma gösterdi. Genel olarak POX aktivite değerleri mevsimsel olarak değişim gösteren lipid peroksidasyonu düzeyleri ile paralellik göstermektedir ($p:0.000$). Zhou ve Zhao (2004) tarafından yapılan bir başka çalışmada, dört farklı sulak alan bitki türünün mevsimsel sıcaklık değişimine bağlı antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldığında, köklerdeki POX aktivitesinin sıcaklık düşüşü ile artış gösterdiğini rapor edilmiştir.



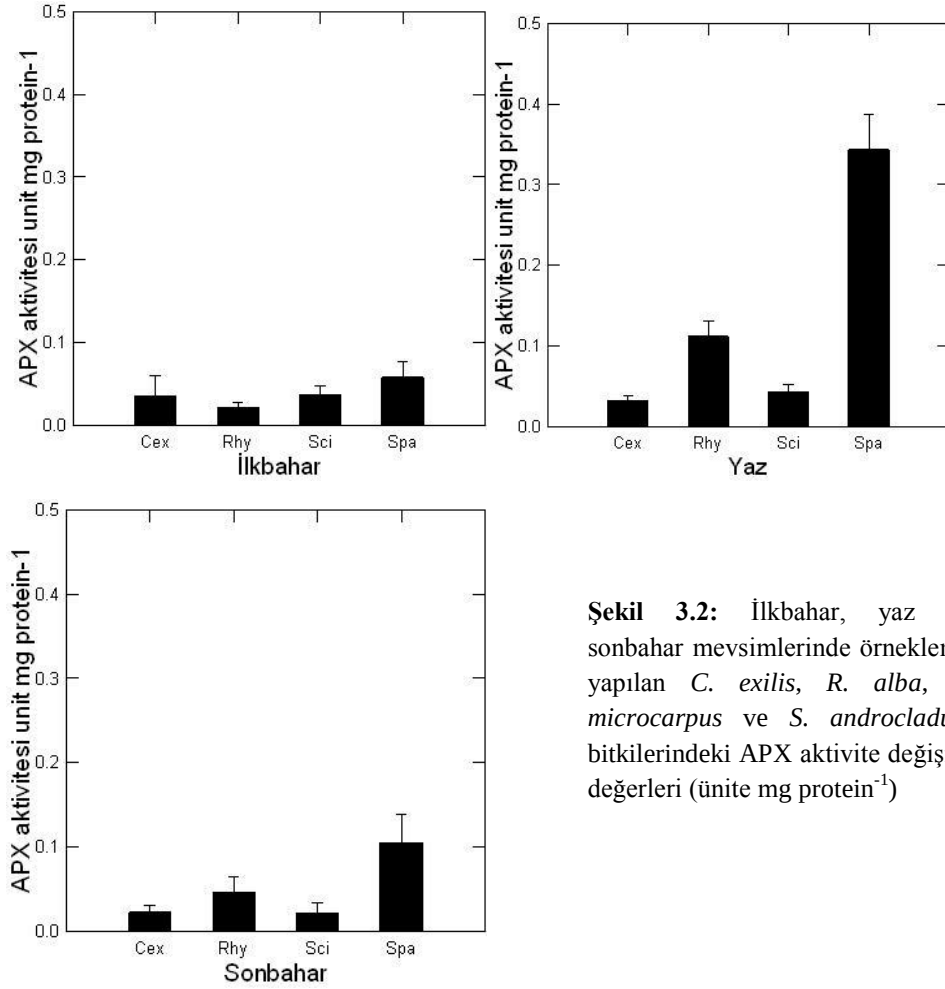
Şekil 3.1: İlkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde örnekleme yapılan *C. exilis*, *R. alba*, *S. microcarpus* ve *S. androcladum* bitkilerindeki POX aktivite değişim değerleri (ünite mg protein⁻¹)

3.3.2 Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivite Sonuçları

APX enzim aktivite değerleri tüm bitki gruplarında mevsimsel senesens sürecine bağlı olarak değişim gösterdi ancak bu değişim yaz mevsiminden sonbahara geçişte daha belirgin seviyedeydi (Çizelge 3.3; Şekil 3.2). Yaz döneminde APX aktivitesi ilkbahar değerleri ile karşılaştırıldığında erken senesense uğradığı düşünülen *S. androcladum* ve *R. alba* bitkilerinde sırasıyla 6 ve 5 kat artış gösterdi. Bununla birlikte APX değerleri sonbaharda da sırasıyla 1,8 ve 2 kat arttı. *C. exilis* ve *S. microcarpus*'ta ise APX aktivite değerleri ilkbahardan yaza geçişte aynı düzeyde gözlenirken, sonbaharda 1,6 ve 1,7 kat azaldı.

İlkbahar döneminde en yüksek APX enzim aktivitesi *S. androcladum*'da ($0,058 \text{ ünite mg protein}^{-1}$), en düşük APX enzim aktivitesi de *R. alba*'da ($0,022 \text{ ünite mg protein}^{-1}$) belirlendi. Yaz sezonu sonunda ise APX enzim aktivitesi değerleri *R. alba*'da 0,112; *S. androcladum*'da 0,343; *C. exilis*'de 0,032 ve *S. microcarpus*'ta 0,042 ünite mg protein⁻¹ olarak kaydedildi. Bu değerler içinde *S. androcladum*'da belirlenen APX aktivitesi tüm örneklemeler içinde en yüksek aktivite değeridir. Sonbahar döneminde ise *S. androcladum* en yüksek değere sahipken ($0,105 \text{ ünite mg protein}^{-1}$), en düşük APX enzim aktivitesi değerlerine sahip bitkiler *C. exilis* ve *S. microcarpus*'tur ($0,022$ ve $0,022 \text{ ünite mg protein}^{-1}$) (Çizelge 3.3). Yapılan istatistiksel analizlerde her bir bitkiden elde edilen APX aktivitesi değerlerinin MDA içeriğiyle uyumlu olduğu belirlenmiştir ($p: 0.012$).

Askorbat-glutasyon döngüsü enzimlerinin aktivitelerinin senesens süreci ile ilişkili olarak değişim gösterdikleri daha önceden yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (Del Rio et al., 1998; Dalton et al., 1993; Becana et al., 2000). Del Rio et al. (1998) yaptıkları çalışmada özellikle peroksizomal APX aktivitesinin senesens sürecinde azaldığını belirlemiştir. Diğer çalışmalarda da askorbat-glutasyon döngüsü enzimlerinin aktivitelerinin senesens öncesinde yüksek düzeylerde olduğu gözlenmiştir (Dalton et al., 1993; Becana et al., 2000). Zhou and Zhao'nun (2004) yaptığı çalışmada *Poa sphondylodes*, *Bromus inermis*, *Bromus sinensis* ve *Elymus nutans* bitkilerinde APX aktivitelerinin kış sezonuna (Aralık) kadar değişim göstermediğini rapor etmişlerdir. Bu bağlamda çalışmamızda *C. exilis* ve *S. microcarpus* bitkilerinde gözlediğimiz APX değişim profilleri adı geçen çalışma ile benzerlik göstermektedir.



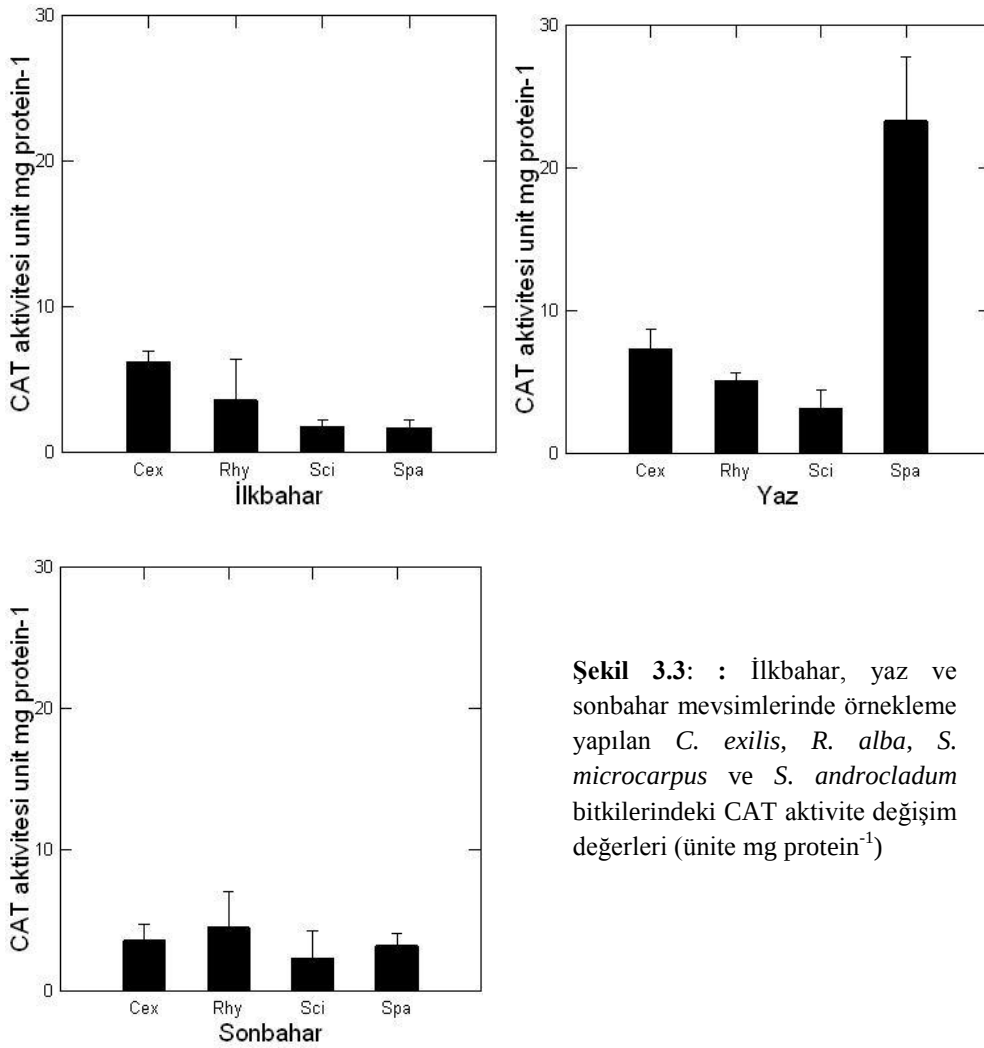
Şekil 3.2: İlkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde örnekleme yapılan *C. exilis*, *R. alba*, *S. microcarpus* ve *S. androcladum* bitkilerindeki APX aktivite değişim değerleri (ünite mg protein⁻¹)

3.3.3 Katalaz (CAT) Aktivite Sonuçları

Çalışmamızda *C. exilis*, *R. alba*, *S. microcarpus* ve *S. androcladum* bitkilerinde mevsimsel senesens sürecine bağlı olarak CAT enzim aktivite değerleri değişim gösterdi (Çizelge 3.3; Şekil 3.3). İlkbahar değerleri ile karşılaştırıldığında genel olarak tüm bitki gruplarında yaz ve sonbahar döneminde yüksek CAT aktiviteleri belirlendi. En yüksek CAT aktivitesi *S. androcladum* bitkisinde yaz sonunda gözlemlendi, bu bitkide CAT aktivitesi ilkbahar değerlerine göre 13 kat arttı. Genel anlamda erken senesense uğrayan *C. exilis* ve *S. androcladum* bitkilerinde CAT aktivitelerinin geç senesense uğrayan bitkilere göre daha yüksek düzeyde olduğu görüldü.

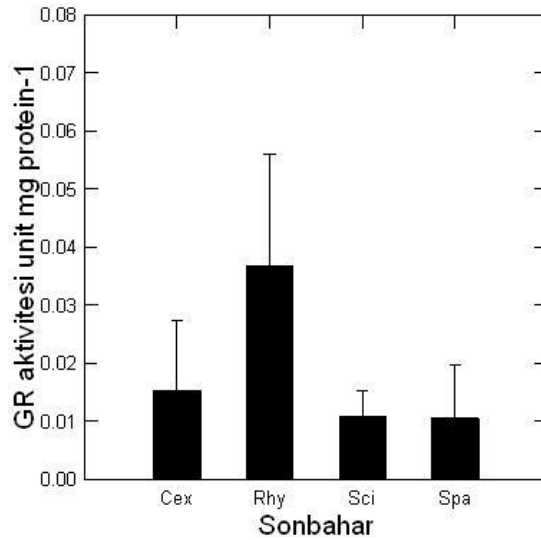
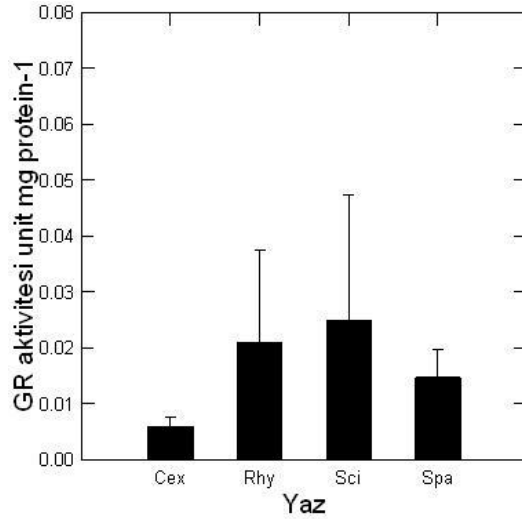
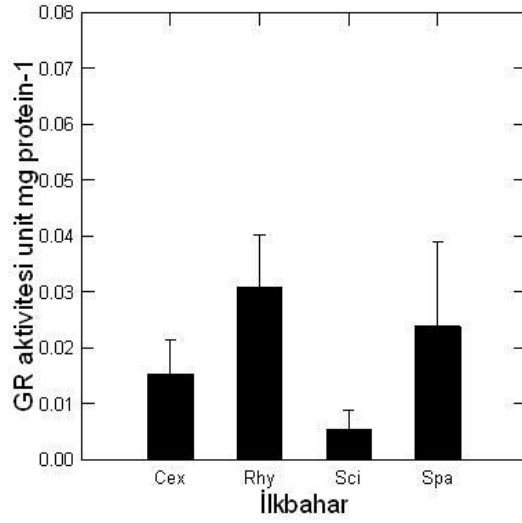
İlkbahar döneminde en yüksek CAT enzim aktivitesi 6,211 ünite mg protein⁻¹ değeriyle *C. exilis* bitkisine aittir. En düşük CAT enzim aktivitesi ise *S. androcladum*' da gözlemlendi (1,663 ünite mg protein⁻¹). Yaz sezonu sonunda en

yüksek CAT aktivitesi *S. androcladum*'da ($23,298 \text{ mg protein}^{-1}$), en düşük CAT aktivitesi ise *S. microcarpus*'da ($3,114 \text{ mg protein}^{-1}$) belirlendi. Sonbaharda ise *R. alba* en yüksek ($4,488 \text{ mg protein}^{-1}$) CAT enzim aktivitesi gösterirken en düşük değer $2,296 \text{ mg protein}^{-1}$ ile *S. microcarpus*' ta kaydedildi (Çizelge 3.3). Yapılan istatistiksel analizlerde her bir bitkiden elde edilen CAT aktivitesi değerlerinin MDA içeriğiyle uyumlu olduğu görüldü ($p: 0.000$). Zhou ve Zhao (2004)' nun yaptığı çalışmada CAT aktivitesinin Kasım ayına kadar düştüğü fakat ilkbahar aylarında yükselişe geçtiği gözlenmiştir.



Şekil 3.3: : İlkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde örnekleme yapılan *C. exilis*, *R. alba*, *S. microcarpus* ve *S. androcladum* bitkilerindeki CAT aktivite değişim değerleri (ünite mg protein^{-1})

3.3.4 Glutatyon Reduktaz (GR) Aktivite Sonuçları



Çalışmamızda *C. exilis*, *R. alba*, *S. microcarpus* ve *S. androcladum* bitkilerinde mevsimsel senesens sürecine bağlı olarak GR enzim aktiviteleri incelendi (Çizelge 3.3; Şekil 3.4). Genel olarak *S. microcarpus* bitkisi dışındaki tüm bitkilerde GR aktivitesi yaz ve sonbahar dönemlerinde azaldı veya aynı seviyelerde kaldı.

C. exilis'te GR aktivitesi yaz sonunda 2,5 kat oranında azaldı ancak sonbahar başında tekrar ilkbahar değerlerine yükseldi. GR aktivitesi *R. alba* bitkisinde yaz sonunda 1,5 kat azalırken *C. exilis*'de olduğu gibi sonbaharda ilkbahar seviyelerine yükseldi. Bununla birlikte, *S. microcarpus* bitkisinde ilkbahar değerleri ile karşılaştırıldığında GR aktivitesi yaz sonunda 5 kat, sonbaharda ise 2,2 kat artış gösterdi. *S. androcladum* bitkisinde GR aktivitesi yaz döneminde 1,6 kat; sonbaharda ise 2 kat olmak üzere kademeli olarak azaldı.

Mevsimsel olarak GR aktivite değerleri incelendiğinde, ilkbahar döneminden en yüksek GR enzim aktivitesi *R. alba*'da (0,031 ünite mg protein⁻¹); en düşük değer ise *S. microcarpus* (0,005 ünite mg protein⁻¹) olarak belirlendi.

Şekil 3.4: : İlkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde örnekleme yapılan *C. exilis*, *R. alba*, *S. microcarpus* ve *S. androcladum* bitkilerindeki GR aktivite değişim değerleri (ünite mg protein⁻¹)

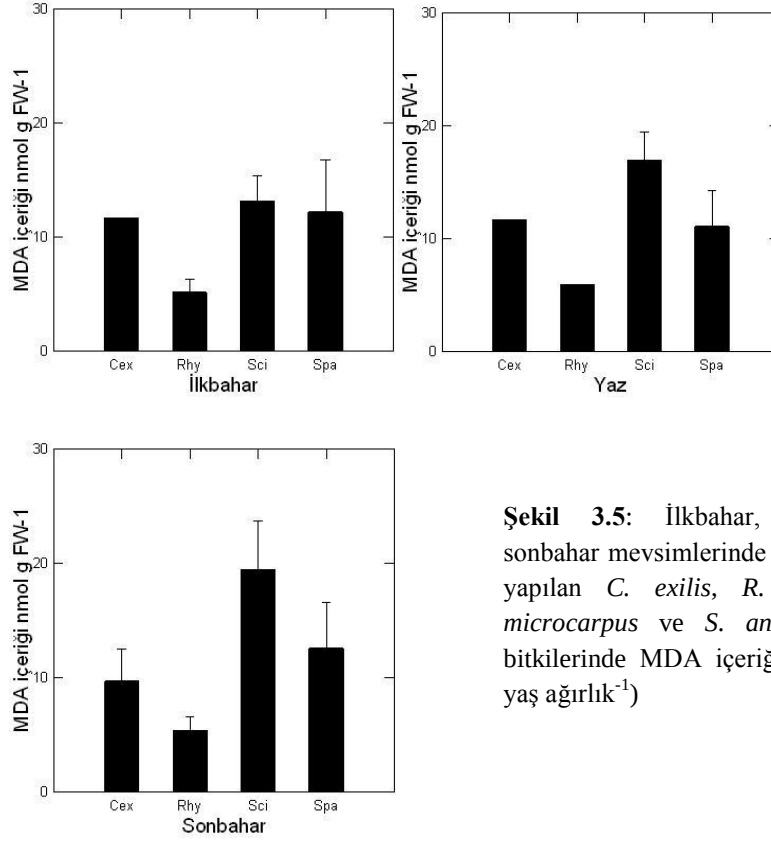
Yaz döneminde ise, en düşük GR aktivitesi 0,006 (ünite mg protein⁻¹) ile *C. exilis*'de en yüksek GR aktivitesi ise 0,0025 (ünite mg protein⁻¹) ile *S. microcarpus*'ta saptandı. Sonbahar döneminde ise GR aktivite değerleri *R. alba*'da 0,036; *C.exilis*'de 0,015; *S. microcarpus* ve *S. androcladum*'da 0,011 (ünite mg protein⁻¹) olarak kaydedildi (Çizelge 3.3). Yapılan istatistiksel analizler GR enzim aktivitesindeki değişim değerlerinin, MDA içeriğiyle uyumlu olduğunu göstermektedir (p : 0.000). Bu çalışma mevsimsel değişimin kök senesensi üzerine etkisinin GR enzim aktivitesi ile ilişkilendirilmesi açısından ilk çalışma niteliğini taşımaktadır.

3.4 Lipid Peroksidasyonu

Çalışmamızda *C. exilis*, *R. alba*, *S. microcarpus* ve *S. androcladum* bitkilerinde mevsimsel senesens sürecine bağlı olarak membran lipid peroksidasyonu düzeyleri, MDA miktarlarındaki değişim olarak incelendi (Çizelge 3.4; Şekil 3.5). Genel olarak tüm gruplarda MDA içeriği ilkbahar değerlerine göre artış göstermekle birlikte farklı eğilimler de gözlemlendi. *S. microcarpus* bitkisinde MDA içeriği ilkbahar değerlerine göre yaz döneminde yaklaşık %30; sonbaharda ise % 48 oranlarında arttı. Geç senesense uğradığı düşünülen diğer tür olan *C. exilis*' te MDA içeriği yaz döneminde ilkbahar değerleri ile aynı düzeyde kalırken, sonbaharda % 17 oranında azaldı. MDA içeriği *S. androcladum*'da yaz döneminde % 9 azalırken, sonbaharda % 3 arttı. *R. alba* bitkisinde ise MDA içeriği yaz döneminde % 15 artarken sonbaharda ise %5 oranlarında artış gösterdi. İstatistiksel analizler mevsimsel değişimin MDA içeriği üzerindeki etkisini % 74 oranında doğrular niteliktedir.

	İlkbahar	Yaz	Sonbahar
<i>Scirpus microcarpus</i>	13,152 ± 2,38	16,976 ± 2,31	19,407 ± 4,02
<i>Sparganium androcladum</i>	12,186 ± 4,24	11,077 ± 2,91	12,552 ± 3,73
<i>Rhynchospora alba</i>	5,158 ± 1,01	5,908 ± 1,49	5,405 ± 1,12
<i>Carex exilis</i>	11,671 ± 1,24	11,637 ± 0,86	9,673 ± 2,64

Çizelge 3.4: İlkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde örnekleme yapılan bitkilere ait MDA içeriği değerleri (nmol g yaş ağırlık⁻¹).



Şekil 3.5: İlkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde örnekleme yapılan *C. exilis*, *R. alba*, *S. microcarpus* ve *S. androcladum* bitkilerinde MDA içeriği (nmol g yaş ağırlık⁻¹)

Mevsimsel MDA içerikleri karşılaştırıldığında, ilkbahar, yaz ve sonbahar dönemlerinde en yüksek MDA içeriği *S. microcarpus* bitkisinde gözlemlendi. Bu değerler sırasıyla 13,152; 16,976 ve 19,407 nmol g yaş ağırlık⁻¹ olarak kaydedildi. En düşük MDA içeriği ise *R. alba*'da görüldü (5,158; 5,908; 5,405 nmol g yaş ağırlık⁻¹).

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, lipid peroksidasyonu seviyeleri ile enzim aktiviteleri arasında genelde tanımlanan ilişkiden farklı bir ilişki gözlenmektedir. Daha açık şekilde, antioksidant enzim aktivitelerinin yüksek olduğu gruplarda lipid peroksidasyonu değerlerinin de yüksek olduğu belirlendi. Senesens kompleks bir süreçtir ve çok çeşitli sinyal yollarının birlikte görev alması söz konusudur. Bu bağlamda kök senesens sürecinde erken veya geç senesense giren bitkiler arasında farklılık görülebilir. Ayrıca kök senesensi sürecinde H₂O₂ gibi reaktif oksijen türlerinin yanı sıra lipid peroksidasyonu ürünlerinin de sinyal iletim yollarının bileşenleri olması muhtemeldir. Tez çalışmamızın kök senesensi sürecinin daha iyi anlaşılması açısından önemli bir katkı sağladığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. and Lamb, C.** 1998, Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92 773-784 pp.
- Apel, K. and Hirt, H.,** 2004, ‘Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction’, *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399 pp.
- Arora, A., Sairam, R.K. and Srivastava, G.C.,** 2002, Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Sci.* 82 1227-1238 pp.
- Asada, K. and Takahashi, M.,** 1987, Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *In: Photoinhibition*, (Kyle, D.J. et al. Eds.), 227-287 pp.
- Asada, K.,** 1992, Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts, in *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems* (ed. J.G. Scandalios), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 173-192 pp.
- Asada, K.,** 1994, Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues, in *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants* (ed. C.H. Foyer and P.M. Mullineaux), CRC Press, Boca Raton, 77-104 pp.
- Asada, K.,** 1999, ‘The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons’, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 601-639 pp.
- Aust, S. D., Moorehouse, L. A. and Thomas, C. E.,** 1985, Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Radical Biol. Med.*, 1, 3–25 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Baddeley J.A. and Watson C.A.**, 2005, Influences of root diameter, tree age, soil depth and season on fine root survivorship in *Prunus avium*. *Plant and Soil* 276:15–22 pp.
- Baker, N.R.**, 1991, A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiol. Plant*, 81, 563-570 pp.
- Becana, M., Dalton, D.A., Moran, J.F., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M.A. and Rubio, M.C.**, 2000, Reactive oxygen species and antioxidants in legume root nodules. *Physiol Plant* 109: 372–381pp.
- Bergmeyer, N.**, 1970, Methoden der enzymatischen, Analyse, vol. 1. *Akademie Verlag*, Berlin, pp. 636–647 pp.
- Bernard, J.M. and Bernard, F.A.**, 1973, Winter biomass in *Typha glauca* Godr. and *Sparganium eurycarpum* Engelm. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 100:125–131 pp.
- Bernard, J.M. and Bernard, F.A.**, 1977, Winter standing crop and nutrient contents in five central New York wetlands. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 104:57–59 pp.
- Bernard, J.M., Seischab and F.H., Jacoby, G.**, 1985, Life history and production of above- and belowground structures of *Cladium mariscoides* (Muhl.) Torr. in a western New York fen. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 112:288–249 pp.
- Bernard, J.M.**, 1974, Seasonal changes in standing crop and primary production in a sedge wetland and an adjacent dry old-field in central Minnesota. *Ecology* 55:350–359 pp.
- Bernard, J.M.**, 1976, The life history and population dynamics of shoots of *Carex rostrata*. *Journal of Ecology* 64:1045–1048 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bhattacharjee, S.**, 2005, Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Curr Sci* 89:1113–1121 pp.
- Bowler, C., Van Montagu, M. and Inzé, D.**, 1992, Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83-116 pp.
- Bradford, M.M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254 pp.
- Buchanan-Wollaston, V.**, 1997, The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* 48: 181-199 pp.
- Caldwell, CR.**, 1993, Estimation and analysis of cucumber (*Cucumis sativus* L.) leaf cellular heat sensitivity. *Plant Physiology* 101: 939-945 pp.
- Chalapathi Rao, A.S.V. and Reddy, A.R.**, 2008, Glutathione reductase: a putative redox regulatory system in plant cells. Sulfur Assimilation and Abiotic Stresses in Plants. *Springer*, The Netherlands, pp. 111-147 pp.
- Chandlee, J.M.**, 2001, Current molecular understanding of the genetically programmed process of leaf senescence. *Physiol. Plant.* 113, 1-8 pp.
- Chew, O., Whelan, J. and Millar, A.H.**, 2003, ‘Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants’, *The Journal of Biological Chemistry* 278, 46869-46877 pp.
- Cho, D., Shin, D., Jeon, B.W. and Kwak, J.M.**, 2009, ROS-mediated - ABA signaling. *J. Plant Biol.* 52 102–113 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Clemensson-Lindell, A.**, 1994, Triphenyltetrazolium chloride as an indicator of root vitality and environmental stress in coniferous forest stands: Applications and limitations. *Plant and Soil* 159: 297-300.
- Collet, L., de Leon, C., Kollmeier, M., Schmohl, N. and Horst, W.J.**, 2002, Assessment of aluminum sensitivity of maize cultivars using roots of intact plants and excised root tips. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165:357–365 pp.
- Comas, L.H., Eissenstat, D.M. and Lakso, A.M.**, 2000, Assessing root death and root system dynamics in a study of grape canopy pruning. *New Phytologist* 147:171–178 pp.
- Coria, N.A., Sarquis, J.I., Penalosa, I. and Urzua, M.**, 1998, Heatinduced damage in potato (*Solanum tuberosum*) tubers: membrane stability, tissue viability, and accumulation of glycoalkaloids. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 46: 4524-4528 pp.
- Creissen, G., Reynolds, H., Xue, Y. and Mullineaux, P.**, 1995, ‘Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco’, *The Plant Journal* 8, 167-175 pp.
- Creissen, G.P., Broadbent, P., Kular, B., Reynolds, H., Wellburn, A.R. and Mullineaux, P.M.**, 1994, Manipulation of glutathione reductase in transgenic plants: implications for plant responses to environmental stress, *Proc. R. Soc. Edinb.* 102B 167-175 pp.
- Dalton, D.A., Langeberg, L. and Treneman, N.C.**, 1993, Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules, *Physiol Plant* 87, 365-370 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Damman, A.W.H.**, 1980, Ecological and floristic trends in ombrotrophic peat bogs of eastern North America. *Colloques phytosociologiques* 7:61-79 pp.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Breusegem, F.**, 2000, 'Dual action of the active oxygen species during plant stress responses', *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 779-795 pp.
- Dat, J.F., Inzé, D. and Van Breusegem, F.**, 2001, Catalase-deficient tobacco plants: tools for *in planta* studies on the role of hydrogen peroxide. *Redox Report* 6, 37-42 pp.
- Del Rio, L.A., Pastori, G.M., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Sevilla, F., Corpas, F.J., Jimenez, A., Lopez-Huertas, E. and Hernandez, J.A.**, 1998, The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol* 116:1195-1200 pp.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. and Thorpe, T.A.**, 1981, Leaf senescence: correlation with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 32, 93-101 pp.
- Edwards, E.A., Rawsthorne, S. and Mullineaux, P.M.**, 1990, Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.), *Planta* 180, 278-284 pp.
- Eissenstat, D.M. and Yanai, R.D.**, 1997, The ecology of root lifespan. *Advances in Ecological Research* 27:1-60 pp.
- Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z. and Ben-Hayyim, G.**, 1997, 'Plant glutathione peroxidases', *Physiologia Plantarum* 100, 234-240 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Espelie, K.E., Franceschi, V.R., and Kolattukudy, P.E.,** 1986, Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. *Plant Physiol.* 81, 487-492 pp.
- Everdeen, D.S., Kiefer, S., Willard, J.J., Muldoon, E.P., Dey, P.M., Li, X.-B., and Lamport, D.T.A.,** 1988, Enzymic crosslinkage of monomeric extensin precursors in vitro. *Plant Physiol.* 87, 616-621 pp.
- Eyidogan, F. and Oz, M.T.,** 2005, Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings, *Acta Physiol. Plant*, 29, 485-493 pp.
- Farkas, G.L., Dezsı, L., Horvath, M., Kısban, K. and Udvardy, J.,** 1963/1964, Common pattern of enzymatic changes in detached leaves and tissues attacked by parasites. *Phytopathol. Zeit.* 49: 343-354 pp.
- Feller, U. and Fischer, A.,** 1994, Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews of Plant Science* 13: 41–273 pp.
- Fitter, A.H., Graves, J.D., Self, G.K., Brown, T.K., Bogie, D.S. and Taylor, K.,** 1998, Root production, turnover and respiration under two grassland types along an altitudinal gradient: influence of temperature and solar radiation. *Oecologia* 114:20–30 pp.
- Ford, T.W. and Simon, E.W.,** 1972, Peroxidase and glucose-6-phosphate dehydrogenase levels in cotyledons of *Cucumis sativus* (L.). *J. Exp. Bot.* 23: 423-431 pp.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H. et al.,** 2003, 'Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth', *Nature* 422, 442-446 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Foyer, C.H. and Noctor, G.,** 2003, Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* 119, 355-364 pp.
- Foyer, C.H.,** 1996, Oxygen processing in photosynthesis. *Biochem. Soc. Transact.* 24, 427-433 pp.
- Foyer, C.H., Descourvieres, P. and Kunert, K.J.,** 1994, Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17, 507-523 pp.
- Foyer, C.H. and Halliwell, B.,** 1976, The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133, 21-25 pp.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. and Scott, I.,** 1998, Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol.* 116, 1351-1357 pp.
- Fry, S.C.,** 1986, Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37, 165-186 pp.
- Fryer, M.J., Andrews, J.R., Oxborough, K., Blowers, D.A. and Baker, N.R.,** 1998, Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiol* 116:571-580 pp.
- Gan, S. and Amasino, R.M.,** 1997, Making sense of senescence; molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiol.* 113, 313-319 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gaspar, T., Penel, C., Thorpe, T., and Greppin, H.,** 1982, Peroxidases: A Survey of Their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants. Geneva, Switzerland: University of Geneva.
- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I., and Laloi, C.,** 2006, Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* 28, 1091-1101 pp.
- Gill, R.A. and Jackson, R.B.,** 2000, Global patterns of root turnover for terrestrial ecosystems. *New Phytologist* 147:13–31 pp.
- Girotti, A.W.,** 1990, Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem. Photobiol.* 51:497–509 pp.
- Glaser, P. H.,** 1983, *Carex exilis* and *Scirpus cespitosus* var. *callosus* in patterned fens in northern Minnesota. *Michigan Botanist* 22: 22-25 pp.
- Glaser, P. H., Wheeler, G.A., Gorham, E. and Wright, Jr. H. E.,** 1981, The patterned mires of the Red Lake Peatland, northern Minnesota; vegetation, water chemistry, and land-forms. *Journal of Ecology* 69:575-599 pp.
- Goldberg, R., Imberty, A., Liberman, M., and Prat, R.,** 1986, Relationships between peroxidatic activities and cell wall plasticity. In *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, pp. 208-220 pp.
- Gorham, E. and Somers, M.G.,** 1973, Seasonal changes in the standing crop of two montane sedges. *Canadian Journal of Botany* 51:1097–1108 pp.
- Grant, J. and Loake, G.,** 2000, Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* 124, 21-29 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gregory P.**, 2006, Plant roots. *Oxford: Blackwell Publishing.*
- Greppin, H., Penel, C. and Gaspar, T., eds**, 1986, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. (Geneva, Switzerland: University of Geneva).
- Grisebach, H.**, 1981, Lignins. In *The Biochemistry of Plants*, E.E. Conn, ed *New York: Academic Press*, Vol. 7, pp. 457-478 pp.
- Groden, D. and Beck, E.**, 1979, 'H₂O₂ destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplasts', *Biochimica et Biophysica Acta* 546, 426-435 pp.
- Guo, D.L., Mitchell, R.J., Withington, J.M., Fan, P.P. and Hendricks, J.J.**, 2008, Endogenous and exogenous controls of root life span, mortality and nitrogen flux in a longleaf pine forest root branch order dominates. *Journal of Ecology* 96:737–745 pp.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.**, 1989, Free Radicals in Biology and Medicine, Ed 2. *Oxford University Press*, Oxford, UK
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.**, 1989, Lipid peroxidation: A radical chain reaction, In: *B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge (eds.). Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford, UK*, 188–260 pp.
- Hammerschmidt, R., Nuckles, E., and Kuc, J.**, 1982, Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant Pathol.* 20, 73-82 pp.
- Harding, S.A., Oh, S.H. and Roberts, D.M.**, 1997, Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. *EMBO J.* 16, 1137-1144 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Harman, D., 1956,** Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298-300 pp.
- Hendrick, R.L. and Pregitzer, K.S., 1996,** Temporal and depth-related patterns of fine root dynamics in northern hardwood forests. *Journal of Ecology* 84:167–176 pp.
- Herzog, V. and Fahimi, H., 1973,** Determination of the activity of peroxidase. *Anal. Biochem.* 55, 554–562 pp.
- Hiltbrunner, E. and Fluckiger, W., 1996,** Manganese deficiency of silver fir trees (*Abies alba*) at a reforested site in the Jura mountains, Switzerland: aspects of cause and effect. *Tree Physiology* 16: 963-975 pp.
- Hinnman, R.L. and Lang, J., 1965,** Peroxidase catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Biochemistry* 4, 144-158 pp.
- Hörtensteiner, S. and Feller, U., 2002,** Nitrogen metabolism and remobilization during senescence,. *Journal of Experimental Botany* 53: 927–937 pp.
- Jacquot, J.P., Lancelin, J.M. and Meyer, Y., 1997,** ‘Thioredoxins: structure and function in plant cells’, *The New Phytologist* 136, 543-570 pp.
- Joslin, J.D. and Henderson, G.S., 1984,** The determination of percentages of living tissue in woody fine root samples using triphenyltetrazolium chloride. *Forest Science* 30: 965-970 pp.
- Kahlert, B.R., Ryser, P. and Edwards, P.J., 2005,** Leaf phenology of three dominant limestone grassland species matching the disturbance regime. *Journal of Vegetation Science* 16:433–442 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kaiser, W.M.**, 1976, 'The effect of hydrogen peroxide on CO₂ fixation of isolated intact chloroplasts', *Biochimica et Biophysica Acta* 444, 476-482 pp.
- Keeling, C.D., Chin, J.F.S. and Whorf, T.P.**, 1996, Increased activity of northern vegetation inferred from atmospheric CO₂ measurements. *Nature* 382:146–149 pp.
- Kern, C.C., Friend, A.L., Johnson, J.M.F. and Coleman, M.D.**, 2004, Fine root dynamics in a developing *Populus deltoides* plantation. *Tree Physiology* 24:651–660 pp.
- Khan, N.A., Samiullah, S., Singh, R. and Nazar, 2007**, Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress, *J. Agro. Crop Sci.* 193, 435-444 pp.
- Khan, N.A., Singh, S. and Umar (Eds.), S.**, 2008, Sulfur Assimilation and Abiotic Stresses in Plants. *Springer*, The Netherlands, pp. 111-147 pp.
- Khanna-Chopra, R. and Selote, D.S.**, 2007, Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environ Exp Bot* 60:276–283 pp.
- Kisban, G., Horvath, M., Dezs, L., Udvardy, J. and Farkas, G. L.**, 1964, Role of root system in the regulation of enzyme levels in leaf tissues. *Acta Botan. Acad. Sci. Hung.* 10: 275-287 pp.
- Kniewel, D.P.**, 1973, Procedure for estimating ratio of live to dead root dry matter in root core samples. *Crop Science* 13: 124-126 pp.
- Knox, J.P. and Dodge, A.D.**, 1985, Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* 24, 889-896 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G. and Sheen, J.**, 2000, 'Functional analysis of oxidative stressactivated mitogen-activated protein kinase cascade in plants', *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, 2940-2945 pp.
- Krebs, C. J.**, 1985, Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance. *Harper & Row*, USA.
- Kuhn, R. and Jerchel, D.**, 1941, Über Invertseifen. VIII. Reduktion von Tetrazoliumsalzen durch Bakterien, gärende Hefe und keimende Samen. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft B* 74: 949–952 pp.
- Kukreja, S., Nandval, A.S., Kumar, N., Sharma, S.K., Sharma, S.K., Unvi, V. and Sharma, P.K.**, 2005, Plant water status, H₂O₂ scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of *Cicer arietinum* roots as affected by salinity, *Biol. Plant.* 49, 305-308 pp.
- Kuźniak, E. and Urbanek, H.**, 2000, The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiol. Plant.* 22, 195-203 pp.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M. et al.**, 2003, 'NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*', *EMBO Journal* 22, 2623-2633 pp.
- Landolt, R. and Matile, P.**, 1990, Glyoxysome-like microbodies in senescent spinach leaves. *Plant Sci* 72: 159-163 pp.
- Leon, A.M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., Chatterjee, D., Mateos, R.M., del Rio, L.A. and Sandalio, L.M.**, 2002, Antioxidant enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium, *Plant Physiol. Biochem.* 40, 813-820 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Leshem, Y.Y.**, 1988, Plant senescence processes and free radicals. *Free Radical Biol Med* 5: 39-49 pp.
- Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S. and Stadtman, E.R.**, 1996, 'Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 15036-15040 pp.
- Lim, P.O., Woo, H.R. and Nam, H.G.**, 2003, Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 8, 272-278 pp.
- Liu, X. and Huang, B.**, 2002, Mowing effects on root production, growth, and mortality of creeping bentgrass. *Crop Science* 42:1241–1250 pp.
- Lohman, K.N., Gan, S., John, M.C. and Amasino, R.M.**, 1994, Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 92, 322-328 pp.
- Madhava Rao, K.V., Raghavendra, A.S., Reddy (Eds.), K.J.**, 2006, Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in *Plants*. Springer, The Netherlands, pp. 157-186 pp.
- Madhava Rao, K.V. and Sresty, T.V.S.**, 2000, Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Sci.* 157, 113– 128 pp.
- Maraite, H.**, 1973, Changes in polyphenol oxidases and peroxidases in muskmelon (*Cucumis melo* L.) infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis. *Physiol. Plant Pathol.* 3: 29-49 pp.
- Matile, P., Hörtensteiner, S., Thomas, H. and Krautler, B.**, 1996, Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiol*, 112: 1403-1409 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Millenaar, F.F. and Lambers, H.**, 2003, The Alternative Oxidase: *in vivo* Regulation and Function. *Plant Biol.* 5, 2-15 pp.
- Mittler R.**, 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405-410 pp.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F.**, 2004, 'The reactive oxygen gene network of plants', *Trends in Plant Science* 9, 490-498 pp.
- Mobin, M. and Khan, N.A.**, 2007, Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress, *J. Plant Physiol.* 164, 601-610 pp.
- Mullineaux, P. and Karpinski, S.**, 2002, Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 43- 48 pp.
- Munné-Bosch, S. and Alegre, L.**, 2002, Plant ageing increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta* 214:608–615 pp.
- Nadelhoffer, K.J., Johnson, L., Laundre, J., Giblin, A.E. and Shaver, G.R.**, 2002, Fine root production and nutrient content in wet and moist arctic tundras as influenced by chronic fertilization. *Plant and Soil* 242:107–113 pp.
- Nakano, Y. and Asada, K.**, 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22 (5), 867–880 pp.
- Nam, H.G.**, 1997, The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Curr. Opin. Biotech.* 8, 200-207 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Navabpour, S., Morris, K., Allen, R., Harrison, E., Mackerness, S.A.H. and Buchanan-Wollaston, V.**, 2003, Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 54, 2285-2292 pp.
- Navari-Izzo, F., Pinzino, C., Quartacci, M.F. and Sgherri, C.L.M.**, 1999, Superoxide and hydroxyl radical generation, and superoxide dismutase in PS II membrane fragments from wheat. *Free Radic Res* 31:3–9 pp.
- Neill, S., Desikan, R. and Hancock, J.**, 2002, ‘Hydrogen peroxide signalling’, *Current Opinion in Plant Biology* 5, 388-395 pp.
- Nelson, C.J.**, 1988, Genetic associations between photosynthetic characteristics and yield: review of evidence. *Plant Physiol. Biochem.* 26, 543- 554 pp.
- Nicholls, P., Fita, I. and Loewen, P.**, 2001, ‘Enzymology and structure of catalases’, *Advances in Inorganic Chemistry* 51, 51-106 pp.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S. and Foyer, C.H.**, 2000, Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Phil Trans Roy Soc B* 355:1465–1475 pp.
- Noodén, L.D. and Leopold, A.C.**, 1988, Senescence and aging in plants, *Academic Press*, San Diego.
- Noodén, L.D.**, 1988, Whole plant senescence. In: Senescence and aging in plants, (Noodén, L.D. and Leopold, A.C., Eds.), *Academic Press*, San Diego, 391-439 pp.
- North, G.B. and Nobel, P.S.**, 1996, Radial hydraulic conductivity of individual root tissues of *Opuntia @cus-indica* (L.) Miller as soil moisture varies. *Annals of Botany* 77: 133-142 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Obara, K., Sumi, K. and Fukuda, H.**, 2002, 'The use of multiple transcription starts causes the dual targeting of *Arabidopsis* putative monodehydroascorbate reductase to both mitochondria and chloroplasts', *Plant Cell Physiology* 43, 697-705 pp.
- Orozco-Cardenas, M. and Ryan, C.A.**, 1999, Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6553- 6557 pp.
- Orr, W.C. and Sohal, R.S.**, 1994, Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *D. melanogaster*. *Science* 63, 1128-1130 pp.
- Orzáez, D. and Granell, A.**, 1997, DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum*. *Plant. J.* 11, 137-144 pp.
- Overmyer, K., Brosche, M. and Kangasjarvi, J.**, 2003, 'Reactive oxygen species and hormonal control of cell death', *Trends in Plant Science* 8, 335-342 pp.
- Parish, R. W.** 1968, Studies on senescing tobacco leaf disks with special reference to peroxidase. I. The effects of cutting and of inhibition of nucleic acid and protein synthesis. *Planta* 82: 1-13 pp.
- Pastori, G.M. and del Río, L.A.**, 1994, Activated oxygen species and superoxide dismutase activity in peroxisomes from senescent pea leaves. *Proc R Soc Edinb Sect B Biol* 102B:505–509 pp.
- Pastori, G.M. and del Río, L.A.**, 1997, Natural senescence of pea leaves: an activated oxygen-mediated function for peroxisomes. *Plant Physiol*, 113:411–418 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G. et al.**, 2000, 'Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells', *Nature* 406, 731-734 pp.
- Pistelli, L., Nieri, B., Smith, S.M., Alpi, A. and De Bellis, L.**, 1996, Glyoxylate cycle enzyme activities are induced in senescent pumpkin fruits. *Plant Sci* 119: 23-29 pp.
- Polle, A.**, 2001, 'Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis', *Plant Physiology* 126, 445-462 pp.
- Porter, D.R., Nguyen, H.T. and Burke, J.J.**, 1994, Quantifying acquired thermal tolerance in winter wheat. *Crop Science* 34: 1686-1689 pp.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A. and Stewart, C.R.**, 1994, Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6:65-74 pp.
- Prochazkova, D., Sairam, R.K., Srivastava, G.C. and Singh, D.V.**, 2001, Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Sci.* 161, 765-771 pp.
- Queiroz, C.G.S., Alonso, A., Mares-Guia, M. and Magalhaes, A.C.**, 1998, Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. *Biol. Plant.* 41:403-413 pp.
- Quirino, B.F., Noh, Y.S., Himmelblau, E. and Amasino, R.M.**, 2000, Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.* 5, 278-282 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Raven, E.L.**, 2003, 'Understanding functional diversity and substrate specificity in haem peroxidases; what can we learn from ascorbate peroxidase?', *Natural Product Reports* 20, 367-381 pp.
- Reddy, A.R. and Raghavendra, A.S.**, 2006, Photooxidative stress, *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*, pp 157-186 pp.
- Robey, R.B.**, 2007, Tetrazolium bioreduction assays in intact cells: requirements for both hexokinase (HK) and glucose (Glc). *The FASEB Journal* 21:730.14 pp.
- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Leterrier, M., Rodriguez- Serrano, M., del Rio, L.A. and Palma, J.M.**, 2006, Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme, *New Phytol.* 170, 43-52 pp.
- Rouhier, N. and Jacquot, J.P.**, 2002, 'Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes', *Photosynthesis Research* 74, 259-268 pp.
- Ruf, M. and Brunner, I.**, 2003, Vitality of tree fine roots: reevaluation of the tetrazolium test. *Tree Physiology* 23: 257–263 pp.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. and Hunt, M.D.**, 1996, Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819 pp.
- Ryser, P. and Kamminga, A.T.**, 2009, Root survival of six cool-temperature wetland graminoids in autumn and early winter. *Plant Ecology & Diversity* Vol. 2: 27-25 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ryser, P.**, 1996, The importance of tissue density for growth and life span of leaves and roots: a comparison of five ecologically contrasting grasses. *Functional Ecology* 10:717–723 pp.
- Santelmann, M.V.**, 1988, The ecology and distribution of *Carex exilis*: an experimental approach. *Dissertation*, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA.
- Santelmann, M. V.**, 1991, Influences on the distribution of *Carex exilis*: an experimental approach. *Ecology*, 72(6): 2025-2037 pp.
- Satomura, T., Hashimoto, Y., Koizumi, H., Nakane, K. and Horikoshi, T.**, 2006, Seasonal patterns of fine root demography in a cool– temperate deciduous forest in central Japan. *Ecological Research* 21:741–753 pp.
- Scandalios, J.G., Guan, L. and Polidoros, A.N.**, 1997, Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses, (Scandalios, J. G. Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 343-406 pp.
- Schmid, P.S. and Feucht, W.**, 1980, Tissue-specific oxidation browning of polyphenols by peroxidase in cherry shoots. *Gartenbauwissenschaft* 45, 68-73 pp.
- Schrazi, A.M and Muir, P.S.**, 1998, In vitro effect of formaldehyde on Douglas fir pollen. *Plant, Cell & Environment* 21: 341-346 pp.
- Selote, D.S. and Khanna-Chopra, R.**, 2006, Drought-acclimation confers oxidative stress tolerance by inducing coordinated antioxidant defense at cellular and sub-cellular level in leaves of wheat seedlings. *Physiol Plant* 127:494–506 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sen Gupta, A.S., Heinen, J.L., Holaday, A.S., Burke, J.J. and Allen, R.D.,** 1993, Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1629-1633 pp.
- Sharma, P. and Dubey, R.S.,** 2005, Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant, *J. Plant Physiol.* 162, 854-864 pp.
- Shaver, G.R. and Billings, W.D.,** 1975, Root production and root turnover in a wet tundra ecosystem, Barrow, Alaska. *Ecology*, 56:401–409 pp.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M. et al.** 2002, ‘Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes’, *Journal of Experimental Botany* 53, 1305-1319 pp.
- Shigeoka, S., Nakano, Y. and Kitaoka, S.,** 1980, ‘Purification and some properties of L-ascorbicacid- specific peroxidase in *Euglena gracilis* Z’, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 201, 121-127 pp.
- Singh, S., Khan, N.A., Nazar, R. and Anjum, N.A.,** 2008, Photosynthetic traits and activities of antioxidant enzymes in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) under cadmium stress, *Am. J. Plant Physiol.* 3, 25-32 pp.
- Sjors, H.,** 1963, Bogs and fens on Attwapiskat River, Northern Ontario. *Bulletin of the National Museum of Canada* 186: 45-133 pp.
- Skorzynska-Polit, E., Drazkiewicz, M. and Krupa, Z.,** 2003/04, The activity of the antioxidative system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana*, *Biol. Plant.* 47 71-78 pp.
- Sohal, R.S. and Weindruch, R.,** 1996, Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273, 59-63 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Srivalli, B., Sharma, G. and Khanna-Chopra, R.,** 2003, Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiol Plant* 119:503–512 pp.
- Srivastava, A.K., Bhargava, P. and Rai, L.C.,** 2005, Salinity and copper-induced oxidative damage and changes in antioxidative defense system of *Anabaena doliolum*, *W.J. Microb. Biotechnol.* 22, 1291-1298 pp.
- Steponkus, P.L. and Lanphear, F.O.,** 1967, Re®nement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiology* 42: 1423-1426 pp.
- Sulpice, R., Gibon, Y., Bouchereau, A. and Larher, F.,** 1998, Exogenously supplied glycine betaine in spinach and rapeseed leaf discs: compatibility or non-compatibility. *Plant, Cell & Environment* 21: 1285-1292 pp.
- Takahashi, M.A. and Asada, K.,** 1983, Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 226, 558-566 pp.
- Takeda, F., Arora, R., Wisniewski, M.E., Davis, G.A. and Warmund, M.R.,** 1993, Assessment of freeze injury in 'Boskoop Giant' blackcurrant buds. *HortScience* 28: 652-654 pp.
- Tanaka, K., Otsubo, T., and Kondo, N.,** 1982, Participation of hydrogen peroxide in the inactivation of calvin-cycle SH enzymes in SO₂- fumigated spinach leaves, *Plant Cell. Physiol*, 23: 1009-1018 pp.
- Thomas, H. and Stoddart, J.L.,** 1980, Leaf Senescence. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31, 83-111 pp.
- Thompson, J.E., Ledge, R.L. and Barber, R.F.,** 1987, The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol* 105: 317-344 ppp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Torres, M.A., Dangl, J.L. and Jones, J.D.,** 2002, 'Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response', *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 517-522 pp.
- van Breusegem, F., van Montagu, M. and Inze, D.,** 1998, Engineering stress tolerance in maize. *Outlook Agr.* 27:115–124 pp.
- van der Kift, T.A.J. and Berendse, F.,** 2002, Root life spans of four grass species from habitats differing in nutrient availability. *Functional Ecology* 16:198–203 pp.
- van Huystee, R.B.,** 1987, Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 205-217 pp.
- Vitt, D.H. and Slack, N.G.,** 1975, An analysis of the vegetation of kettle-hole bogs in relation to environmental gradients. *Canadian Journal of Botany* 53: 332-359 pp.
- Volder, A., Gifford, R.M. and Evans, J.R.,** 2007, Effects of elevated atmospheric CO₂, cutting frequency, and differential day/ night atmospheric warming on root growth and turnover of *Phalaris* swards. *Global Change Biology* 13: 1040–1052 pp.
- Wang, Z., Burch, W.H., Mou, P., Jones, R.J. and Mitchell, R.J.,** 1995, Accuracy of visible and ultraviolet light for estimating live root proportions with minirhizotrons. *Ecology* 76: 2330-2334 pp.
- Wang, J., Zhang, H. and Allen, R.D.,** 1999, 'Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress', *Plant Cell Physiology* 40, 725-732 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A.,** 2003, Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1-14 pp.
- Watson, B.G. and MacIver, D.C.,** 1995, Bioclimate mapping of Ontario. Egbert, Ontario: Centre for Atmospheric Research Experiments, *Environment*, Canada.
- Watson, M.A. and Lu, Y.,** 2004, Annual shoot senescence in perennials. In Noodén LD, editor. Plant cell death processes. New York: *Elsevier*. p. 259–260 pp.
- Wells, C.E. and Eissenstat, D.M.,** 2001, Marked differences in survivorship among apple roots of different diameters. *Ecology* 83:882–892 pp.
- Wells, C.E., Glenn, D.M. and Eissenstat, D.M.,** 2002, Changes in the risk of fine-root mortality with age: a case study in peach, *Prunus persica* (Rosaceae). *American Journal of Botany* 89:79–87 pp.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Camp, W.,** 1997, Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J.* 16, 4806-4816 pp.
- Winston, G. W.,** 1990, Free radicals in cells. In *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*, Willy-Liss Inc, pp. 57–86 pp.
- Wise, R.R.,** 1995, Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosyn Res* 45: 79–97 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yabuta, Y., Motoki, T., Yoshimura, K., Takeda, T., Ishikawa, T. and Shigeoka, S.**, 2002, 'Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress', *The Plant Journal* 32, 915-925 pp.
- Yang, Y., Han, C., Liu, Q., Lin, B. and Wang, J.**, 2008, Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings, *Acta Physiol. Plant.* 30, 433-440 pp.
- Zak, D.R., Pregitzer, K.S., King, J.S. and Holmes, W.E.**, 2000, Elevated atmospheric CO₂, fine roots and the response of soil microorganisms: a review and hypothesis. *New Phytologist* 147:201–222 pp.
- Zhou, R. and Zhao, H.**, 2004, Seasonal pattern of antioxidant enzyme system in the roots of perennial forage grasses grown in alpine habitat, related to freezing tolerance. *Physiol. Plant.* 121:399–408 pp.
- Zimmermann, P. and Zentgraf, U.**, 2005, The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cell Mol Biol sLett* 10: 515-534 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Çağdaş Kera Yücel, 01.08.1988 tarihinde Fethiye’ de doğmuştur. İlk ve orta öğretimini Silkar Günlükbaşı İlköğretim okulunda tamamladıktan sonra lise eğitimini Fethiye Lisesi (YDA)’ nde tamamlamıştır. 2006 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’ ne başlamış ve bu eğitimi 2010 senesinde tamamlamıştır ve aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bilim Dalı’ nda Doç. Dr. Melike BOR danışmanlığında yüksek lisansa başlamıştır. 2011 Eylül ayında “Bitkilerde kök senesensinde antioksidan savunma sisteminin rolünün incelenmesi” konulu tezinin araştırma kısmını tamamlamak üzere Assoc. Prof. Dr. Peter Ryser eş danışmanlığında Laurentian Üniversitesi, Kanada’ ya 1 sene süre ile misafir öğrenci statüsünde ziyarette bulunmuştur.