

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KURAKLIK KOŞULLARINDA ALFA LİPOİK ASİT MUAMELESİNİN
FOTOSENTETİK HASARI İYİLEŞTİRMEDEKİ ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Salih CİNEMRE

**ŞUBAT 2018
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KURAKLIK KOŞULLARINDA ALFA LİPOİK ASİT MUAMELESİNİN FOTOSENTETİK
HASARI İYİLEŞTİRMEDEKİ ROLÜ**

Salih CİNEMRE

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 02 / 01 / 2018

Tezin Savunma Tarihi : 05 / 02 / 2018

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Rabiye TERZİ

Trabzon 2018

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Biyoloji Anabilim Dalında
Salih CİNEMRE Tarafından Hazırlanan**

**KURAKLIK KOŞULLARINDA ALFA LİPOİK ASİT MUAMELESİNİN FOTOSENTETİK
HASARI İYİLEŞTİRMEDEKİ ROLÜ**

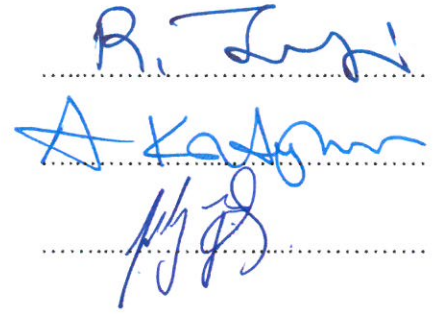
başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 16 / 01 / 2018 gün ve 1736 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Rabiye TERZİ

Üye : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Üye : Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ


The image shows three handwritten signatures in blue ink, each written on a horizontal dotted line. The first signature is 'R. Terzi', the second is 'A. Kadioğlu', and the third is 'F. Şaban Beriş'.

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü**

ÖNSÖZ

“Kuraklık Şartlarında Alfa Lipoik Asit Muamelesinin Fotosentetik Hasarı İyileştirmedeki Rolü” adlı bu araştırma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, konu seçiminde, çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesinde ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Rabiye TERZİ'ye, laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Aykut SAĞLAM'a, çalışmanın hemen her aşamasında teknik desteğini esirgemeyen Asiye SEZGİN ve Cansu ALTUNTAŞ'a teşekkür ederim.

Bu çalışmanın bir kısmı FHD-2016-5455 nolu proje ile K.T.Ü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Bu nedenle K.T.Ü Araştırma Fonu Yönetim Kurulu başkanı ve üyelerine teşekkür ederim.

Salih CİNEMRE

Trabzon 2018

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Kuraklık Şartlarında Alfa Lipoik Asit Muamelesinin Fotosentetik Hasarı İyileştirmedeki Rolü” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Rabiye TERZİ'nin sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuvarında yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 05/02/2018

Salih CİNEMRE

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
ABSTRACT	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Stres ve Stres Çeşitleri	3
1.3. Stres Dayanıklılığı	6
1.4. Bitkilerde Su Kaybının Etkileri	7
1.4.1. Mekanik Etki	7
1.4.2. Metabolik Etki	8
1.4.3. Oksidatif Etki.....	9
1.5. Kuraklık Stresi Sakınma ve Tolerans	10
1.6. Kuraklığın Morfolojik Özellikler Üzerine Etkileri.....	12
1.7. Kuraklığın Bazı Fizyolojik Parametreler Üzerine Etkileri	12
1.7.1. Su Potansiyeli ve Nispi Su İçeriği	12
1.7.2. Lipid Peroksidasyonu	13
1.7.3. Fotosentetik Pigmentler	14
1.7.4. Klorofil Fluoresansı	15
1.7.4.1. Klorofil Fluoresans Analizinin Esasları	16
1.7.5. Fotosentez.....	18
1.8. Yüksek Bitkilerde Fotosentetik Gen İfadesi.....	20
1.9. Alfa Lipoik Asit.....	21
1.10. Mısır Hakkında Genel Bilgiler	22
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	24

2.1.	Bitkilerin Büyütülmesi ve Alfa Lipoik Asit Uygulanması	24
2.2.	ALA Uygulama Şeklinin Belirlenmesi İçin Yapılan Ölçümler.....	25
2.2.1.	Su Durumu.....	25
2.2.2.	Lipid Peroksidasyonu	25
2.2.3.	Klorofil İçeriği	25
2.2.4.	Gaz Değişim Parametreleri.....	26
2.3.	Klorofil Fluoresans Analizleri	26
2.4.	Karbondiyoksit Fiksasyon Enzimlerinin Gen İfade Seviyelerinin Belirlenmesi	26
2.4.1.	<i>Rubisco</i> , <i>PEPc</i> ve <i>Rca</i> Gen İfade Seviyelerinin Belirlenmesi.....	27
2.4.1.1.	RNA İzolasyonu ve cDNA Oluşturulması	27
2.4.1.2.	Kantitatif Real-Time PCR Ölçümü	27
2.5.	Klorofil Sentez ve Degredasyon Enzimlerinin Gen İfade Seviyelerinin Belirlenmesi	30
2.5.1.	<i>Magnezyum Şelataz</i> ve <i>Klorofilaz</i> Gen İfade Seviyelerinin Belirlenmesi	30
2.6.	İstatistik Analizler.....	30
3.	BULGULAR.....	31
3.1.	ALA Uygulamasının Nispi Su İçeriği Üzerine Etkisi	31
3.2.	ALA Uygulamasının MDA İçeriği Üzerine Etkisi.....	32
3.3.	ALA Uygulamasının Klorofil İçeriği Üzerine Etkisi	32
3.4.	ALA Uygulamasının Gaz Değişim Parametreleri Üzerine Etkisi	34
3.4.1.	Fotosentez Hızı	34
3.4.2.	Transpirasyon	35
3.4.3.	Stomata İletkenliği.....	36
3.4.4.	Sub-Stomatal İletkenlik	37
3.5.	ALA Uygulamasının Klorofil Fluoresans Parametreleri Üzerine Etkisi.....	37
3.5.1.	PSII'nin Maksimum Kuantum Etkinliği (F_v/F_m)	38
3.5.2.	PSII Fotokimyasal Kuantum Verimi (Φ_{PSII}).....	39
3.5.3.	Elektron Transfer Hızı (ETR).....	40
3.5.4.	Fotokimyasal Olmayan Sönme (NPQ).....	41
3.5.5.	Fotokimyasal Sönme (qP).....	42
3.6.	ALA Uygulamasının <i>Rubisco</i> , <i>PEPc</i> ve <i>Rca</i> Gen İfade Seviyeleri Üzerine Etkisi	43

3.7.	ALA Uygulamasının <i>Magnezyum Şelataz</i> ve <i>Klorofilaz</i> Gen İfade Seviyeleri Üzerine Etkisi	47
4.	TARTIŞMA	49
5.	SONUÇLAR	54
6.	ÖNERİLER	56
7.	KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ		



Yüksek Lisans

ÖZET

KURAKLIK ŞARTLARINDA ALFA LİPOİK ASİT MUAMELESİNİN FOTOSENTETİK HASARI İYİLEŞTİRMEDEKİ ROLÜ

Salih CİNEMRE

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Rabiye TERZİ
2018, 67 Sayfa

Kuraklığa maruz bırakılan mısır fidelerinde alfa lipoik asit (ALA) uygulamasının fotosentetik hasarı iyileştirme mekanizması araştırıldı. Hidroponik ortamda büyütülen fidelerin % 20 polietilenglikol (PEG6000) içeren köklendirme ortamına farklı konsantrasyonlarda (2,5, 12, 24 ve 50 μ M) ALA uygulandı. Yaprak su durumu, klorofil içeriği, membran hasarı ile gaz değişim parametreleri ölçüldü ve stres hasarını azaltan ALA konsantrasyonu belirlendi. Etkinliği belirlenen ALA'nın klorofil fluoresansı ile *ribuloz 1,5 difosfat karboksilaz (rubisco)*, *fosfoenolpirüvat karboksilaz (PEPc)*, *rubisco aktivaz (Rca)*, *magnezyum şelataz (Mg-CHLI)* ve *klorofilaz* genlerinin ifade seviyesi üzerine etkisi incelendi. ALA uygulamasının (12 μ M) membran hasarını azalttığı, nispi su içeriği, fotosentetik pigment miktarı ve gaz değişim parametrelerindeki azalışları hafiflettiği tespit edildi. Kuraklık şartlarında fotosistem II (PS II) etkinliğinin olumsuz etkilendiği bununla beraber, ALA uygulanmış fidelerde PS II etkinliğinin arttığı belirlendi. Benzer şekilde, stres şartlarında azalan *rubisco*, *PEPc*, *Rca*, *Mg-CHLI* ve *klorofilaz* gen ifadesinin ALA uygulanmış fidelerde arttığı bulundu.

Elde edilen verilere göre, kuraklık şartlarında dıştan uygulanan ALA'nın PS II aktivitesi, fotosentetik karbondioksit fiksasyonu ve klorofil sentezini uyardığı ve böylece fotosentezin devamlılığını sağlayabildiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler : Kuraklık, Alfa lipoik asit, Klorofil fluoresansı, Rubisco, *PEPc*, Rubisco aktivaz, Magnezyum şelataz, Gen ifadesi, Mısır

Master Thesis

ABSTRACT

**THE ROLE OF ALPHA LIPOIC ACID APPLICATION IN IMPROVING
PHOTOSYNTHETIC INJURY INDUCED BY DROUGHT STRESS**

Salih CİNEMRE

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Rabiye TERZİ
2018, 67 Pages

The alleviating mechanism of alpha lipoic acid (ALA) application against photosynthetic damages induced by drought stress was investigated in maize seedlings. ALA at different concentrations (2,5, 12, 24 ve 50 μM) was applied to rooting medium of the hydroponically grown seedlings including 20 % PEG. Leaf water status, chlorophyll content, membrane damage, gas exchange parameters were measured and effective ALA concentration reducing stress injuries was determined. The effects of exogenous ALA on chlorophyll fluorescence and the gene expressions of *ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (rubisco)*, *phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPc)*, *rubisco activase (Rca)*, *magnesium chelatase (Mg-CHLI)* and *chlorophyllase* were determined. ALA application (12 μM) mitigated membrane damage and alleviated the decreases in relative water content, amount of photosynthetic pigment and gas exchange parameters under the stress. It was found that efficiency of photosystem II (PS II) was negatively affected in the seedlings exposed to drought stress while the efficiency of PS II of ALA applied seedlings was high in comparison with unapplied ones. Decreased gene expressions of *rubisco*, *PEPc*, *Rca*, *Mg-CHLI* and *chlorophyllase* under the stress were induced in ALA applied seedlings.

According to present data, it has been concluded that ALA application under drought stress conditions may induce photosystem II activity, photosynthetic carbondioksit fixation and the chlorophyll synthesis thus it can maintain photosynthesis in maize.

Key Words: Drought, Alpha lipoic acid, Chlorophyll fluorescence, Rubisco, *PEPc*, Rubisco activase, Magnesium chelatase, Gene expression, Maize

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Bitkilerde stres çeşitleri	5
Şekil 2. ALA uygulamasının nispi su içeriği (NSİ) üzerine etkisi.	31
Şekil 3. ALA uygulamasının MDA içeriği üzerine etkisi	32
Şekil 4. ALA uygulamasının klorofil a içeriği üzerine etkisi.	33
Şekil 5. ALA uygulamasının klorofil b içeriği üzerine etkisi.....	33
Şekil 6. ALA uygulamasının net CO ₂ asimilasyon oranı (A) üzerine etkisi	34
Şekil 7. ALA uygulamasının transpirasyon (E) üzerine etkisi	35
Şekil 8. ALA uygulamasının stomata iletkenliği (gs) üzerine etkisi	36
Şekil 9. ALA uygulamasının sub-stomatal iletkenlik (Ci) üzerine etkisi	37
Şekil 10. ALA uygulamasının PSII'nin maksimum kuantum etkinliği (Fv/Fm) üzerine etkisi.....	38
Şekil 11. ALA uygulamasının PS II fotokimyasal kuantum verimi (ΦPSII) üzerine etkisi.....	39
Şekil 12. ALA uygulamasının elektron transfer hızı (ETR) üzerine etkisi	40
Şekil 13. ALA uygulamasının fotokimyasal olmayan sönme (NPQ) üzerine etkisi.....	41
Şekil 14. ALA uygulamasının fotokimyasal sönme (qP) üzerine etkisi.....	42
Şekil 15. ALA uygulamasının <i>rubisco</i> büyük alt ünitesinin gen ifadesi üzerine etkisi	43
Şekil 16. ALA uygulamasının <i>rubisco</i> küçük alt ünitesinin gen ifadesi üzerine etkisi	44
Şekil 17. ALA uygulamasının <i>fosfoenol pirüvat karboksilazın</i> gen ifadesi üzerine etkisi	45
Şekil 18. ALA uygulamasının <i>rubisco aktivazın</i> gen ifadesi üzerine etkisi	46
Şekil 19. ALA uygulamasının <i>magnezyum şelataz</i> gen ifadesi üzerine etkisi	47
Şekil 20. ALA uygulamasının <i>klorofilazın</i> gen ifadesi üzerine etkisi	48

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>Rubisco</i> , <i>PEPc</i> ve <i>Rca</i> gen ifade seviyeleri için RT-PCR işlem basamakları.....	28
Tablo 2. Genlere özgü primer sekansları.....	29



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	: Absisik asit
ALA	: Alfa Lipoik Asit
DHLA	: Dihidrolipoik Asit
ETR	: Elektron transfer hızı
Fm	: Maximum floresans
Fo	: Fotosentetik ışığın olmadığı floresans
Ft	: Işıktaki durağan floresans
Fv	: Fo ve Fm arasındaki fark
Fv/Fm	: PSII nin maksimum kuantum etkinliği
IRGA	: İnfrared gaz analiz yöntemi
MDA	: Malondialdehid
Mg-CHLI	: Magnezyum şelataz
NPQ	: Fotokimyasal olmayan sönme
NSİ	: Nispi su içeriği
PEG	: Polietilen glikol
PEPc	: Fosfoenolpirüvat karboksilaz
PSI	: Fotsistem I
PSII	: Fotsistem II
qP	: Fotokimyasal sönme
Rca	: Rubisco aktivaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
Rubisco	: Rubiloz-1,5- bifosfat karboksilaz/ oksijenaz
UV	: Ultra viyole
ΦPSII	: PS II fotokimyasal kuantum verimi

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Kuraklık, sıcaklık, UV gibi birçok çevresel stresin bitki bünyesindeki primer etkileri fotosentez ve büyümedeki azalmadır (Yordanov vd., 2003). Kısa bir stres periyodunda bile azalan su içeriği kültür bitkilerinde verim kayıplarına neden olmakta ve tarımsal üretimi ciddi şekilde sınırlandırmaktadır. Ayrıca, çevresel birçok stres oksidatif hasara neden olmakta, oksidatif hasarın ise fotosentezi olumsuz etkilediği bilinmektedir (Pinheiro vd., 2005; Shao vd., 2009).

Mısır dünya ekonomisinde önemli rol oynayan kültür bitkilerinden biridir. Ülkemizde Akdeniz ve Karadeniz Bölgesi'nde yetişmekte olan mısır fideleri özellikle Akdeniz Bölgesi'nde büyüme sezonunda kuraklık, sıcaklık gibi çevresel streslerle sıkça karşılaşmaktadır (Tanyolaç vd., 2007). Bu nedenle ekonomik verimi korumak için strese toleranslı kültür bitkilerinin yetiştirilmesi gerekmektedir. Araştırmacılar genetik iyileştirme veya kimyasal muamelelerle stres toleransının artırılmasına yönelik çalışmalar yürütmektedir. Bitki büyümesini uyaran kimyasalların bitkilere uygulanması stres toleransını artırmak için kolay, düşük maliyetli, düşük riskli ve etkili bir yaklaşımdır (He vd., 2009; Hamdia ve Shaddad, 2010). Söz konusu kimyasallar arasında son yıllarda özellikle antioksidanlar ve osmotik koruyucu maddeler öne çıkmakta, askorbat, glutatyon, prolin, trehaloz ve askorbik asit gibi bileşikler bitkilere stres şartlarında uygulanmaktadır (Ashraf ve Foolad, 2007; Ali ve Ashraf, 2011; Terzi vd., 2015). Bununla beraber, insanlarda birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ve bitkilerde doğal olarak bulunan bir antioksidan olan alfa lipoik asit (ALA)'ın bitkilerdeki fonksiyonu ve stressiz veya stresli şartlarda dıştan bitkilere uygulanmasının bitki metabolizması üzerine etkileri konusu tam olarak açık değildir.

Vitamin benzeri bileşik olan ALA'nın insanda yaşlanmaya karşı etkili olduğu, şeker hastalarında ise proteinlere bağlanarak proteinlerin şekerlenmesini engellediği açıkça ortaya konmuştur. Ayrıca ALA'nın hem indirgenmiş (dihidrolipoik asit, DHLA) hem de yükseltgenmiş formda antioksidan özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Navari-Izzo ve Quartacci, 2001). Bitkilerde içsel ALA seviyesinin bitki gelişimi ve stres toleransındaki rolleri, literatürde yapılan sınırlı sayıda çalışmayla aydınlatılmaya çalışılmıştır. Örneğin,

deniz suyuna maruz bırakılan buğday köklerinde DHLA üretiminin arttığı, artan DHLA'nın bitki kısımlarının içsel antioksidanların yenilenmesini algılayabilmesi için sinyal olabileceği rapor edilmiştir (D'amico vd., 2004). Bitkilere dıştan ALA muamelesi ve bu muamelenin çeşitli çevresel streslere maruz kalan bitkilerdeki koruyucu etkileri ve stres toleransındaki rolleri konusunda da çok az çalışmaya rastlanmıştır. Örneğin yapılan bir çalışmada ALA uygulamasının protein profilini etkilediği bildirilmiştir (Yıldız vd., 2015). Hububat türleri üzerine yapılan bir çalışmada ise *Agrobacterium*'un transformasyon işlemleri sırasında kültür ortamına ALA eklenmesinin dokuların kararmasını engellediği ve dokuların hayatta kalmasını artırdığı rapor edilmiştir (Dan vd., 2009). Yine yapılan bir çalışmada, ALA uygulamasının kuraklık şartlarındaki mısır fidelerinde süperoksit dismutaz, guaiacol peroksidaz, katalaz, askorbat peroksidaz, glutasyon redüktaz ve monodehidroaskorbat redüktaz gibi antioksidan enzim aktivitelerini uyarabileceği bildirilmesine rağmen (Güven, 2013), ALA uygulamasının fidelerin fotosentetik kapasitesi üzerine etkisi konusu fizyolojik ve moleküler seviyede incelenerek açıklığa kavuşturulmamıştır.

Fotosentez aktivitesindeki değişimlerin izlenmesi için en önemli parametreler fotosentetik pigment miktarı, fotosistem II (PS II) ile ilgili bazı parametreler, elektron taşınım hızının belirlenmesine yönelik klorofil floresans ölçümleri, karbondioksit fiksasyon aşaması hakkında bilgi veren CO₂ analiz yöntemleri ile karbondioksit fiksasyon enzimlerinin aktiviteleridir. Klorofil a ve klorofil b gibi kloroplast pigmentleri fotokimyasal reaksiyonlarda önemli bir rol oynamaktadırlar (Taiz ve Zeiger, 2006). Çevresel streslerde klorofil içeriğinin azalması pigment fotooksidasyonunun ve klorofil degradasyonunun tipik bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Anjum vd., 2011). Toplam klorofil içeriğindeki azalma ışık yakalama kapasitesinin de azalmasına işaret etmektedir (Abaaszadeh vd., 2007). Stres şartlarında klorofil degradasyonu klorofilaz enzim aktivitesinin artması sonucunda oluşabilir (Mihailovic vd., 1997). Kuraklık şartlarında, fotosentezde stomaların kapanmasından kaynaklanmayan azalma, klorofil degradasyonunun sonucu olarak meydana gelir (Anjum vd., 2011). Bu nedenle, ALA uygulamasının klorofil içeriği üzerine etkisini değerlendirmek için klorofil sentezine karışan anahtar enzimlerden biri olan magnezyum şelataz ile klorofil degradasyonunda rol alan *klorofilaz* gen ifadelerindeki değişimler real-time PCR yöntemiyle araştırılmıştır.

Fotosentez aktivitesindeki değişimlerin izlenmesine yönelik diğer parametre olan floresans tekniği, PS II'nin etkinliğini belirlemek için kullanılan bir tekniktir. Ayrıca

klorofil fluoresansı, PS I ve PS II arasındaki enerji dağılımının düzenlenmesi (Allen, 2002), PS II ışık yakalama kompleksinin yapısının aydınlatılması (Hooper ve Eggink, 1999), fotosentetik elektron transportunun düzenlenmesi çalışmalarında (Kramer vd., 2004) verimli bir biçimde kullanılmıştır. Bununla beraber, fotosentetik CO₂ fiksasyonunu doğru olarak tespit edebilmek için fluoresans metodu tek başına yeterli değildir (Maxwell ve Johnson, 2000). Bu nedenle mevcut çalışmada fotosentez olayında önemli metabolik olaylardan birisi olan CO₂ fiksasyonunun tespiti için infrared gaz analiz (IRGA) yöntemiyle CO₂/H₂O değişimi ölçülmüş, kuraklık şartlarında ALA uygulamasının fotosentez üzerine etkisi araştırılmıştır.

Fotosentez aktivitesindeki değişimlerin izlenmesi için ayrıca ALA uygulanmış fidelerdeki fotosentetik enzimlerin gen ifadesindeki değişimler araştırılmıştır. Literatürde, ALA uygulamasının fotosentetik enzimlerin gen ifadesindeki değişimler üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bir antioksidan olan ALA'nın kuraklık stresine maruz bırakılan mısır fidelerinde klorofil fluoresansı ile gaz değişim parametreleri ve fosfoenolpirüvat karboksilaz (PEPc), ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz küçük ve büyük alt ünitesi (rubisco-SSU, rubisco-LSU) ve rubisco aktivaz (Rca)'ı kodlayan genlerin ifadelerindeki değişimlerin araştırılması amaçlanmıştır. Kısaca, mevcut çalışmada iki hipotez test edilmiştir.

- 1) Kuraklık şartlarında gaz değişim parametrelerindeki stres hasarını gösteren veriler ALA muamelesi ile olumlu etkilenmektedir.
- 2) ALA, fotosentezi iyileştirmek için fotosentezin birçok farklı aşamasını (PS II aktivitesi, karbondioksit fiksasyon enzimleri ve klorofil sentez veya degradasyon enzimleri) etkileyebilmektedir.

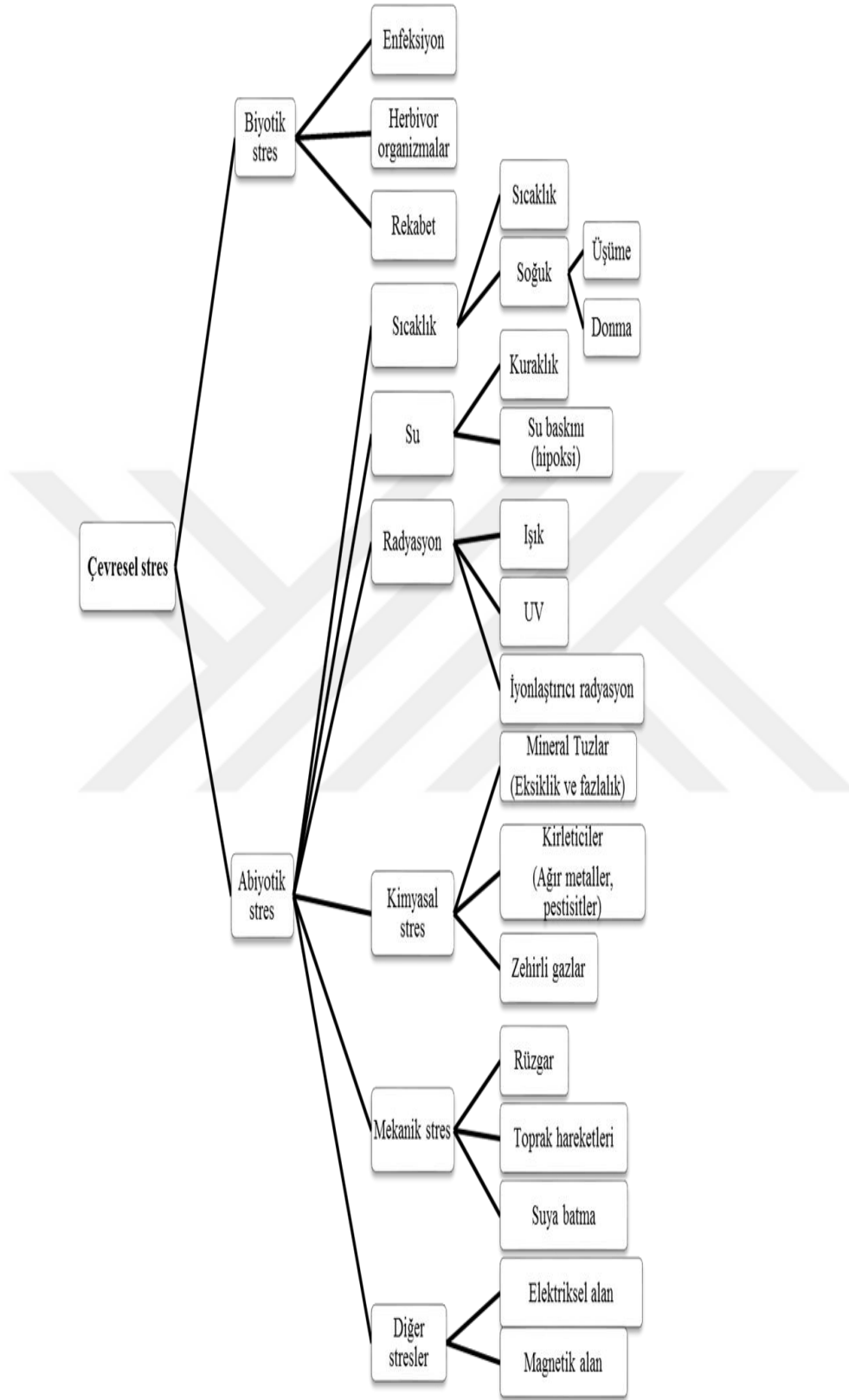
Mevcut araştırmadan elde edilen veriler ışığında, kuraklık şartlarında ALA uygulamasının fotosentetik sistemi korumada önemli bir rolünün olabileceği konusunda ipuçları elde edilmiştir. Ayrıca bu çalışmanın ALA uygulamasının stres hasarlarını gidermek için zirai alanlarda kullanılmasına yönelik daha sonra yapılacak tarımsal araştırmalara da temel teşkil edeceği söylenebilir.

1.2. Stres ve Stres Çeşitleri

Dünyanın birçok bölgesinde bitkiler yaşam döngüleri süresince toprak ve atmosfer kaynaklı su eksikliğine maruz kalırlar. Sık sık bitkiler olumsuz büyüme şartlarıyla

karşılaşırlar. Bitkinin yaşadığı ortam kuraklık, tuzluluk, soğuma, donma ve yüksek sıcaklık gibi birçok faktörden etkilenebilir. Bu farklı olumsuz ancak her zaman öldürücü olmayan şartlar stres olarak bilinirler ve stres büyüme ve gelişmeyi geciktirebilir, verimi düşürebilir ve aşırı şartlarda açlığa, enerjinin tükenmesine ve lif üretimini başlatarak bitki ölümüne neden olabilir (Mattos ve Moretti, 2015).

Bitkilerin maruz kaldığı stres faktörleri biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılabilir (Şekil 1). Abiyotik stres faktörleri: soğuk, sıcak, kuraklık, tuzluluk, su fazlalığı, radyasyon, çeşitli kimyasallar, oksidatif stres, rüzgar ve besin yetersizliğinden; biyotik stres faktörleri ise virüs, bakteri ve fungusları içeren patojenler, böcekler, otoburlar veya bitkilere basılma gibi diğer organizmalarla etkileşim sonucu ortaya çıkmaktadır (Schulze vd., 2005; Yılmaz vd., 2011) (Şekil 1). Bütün bu faktörler bitkinin gelişimini, hayatta kalmasını, biyokütle üretimini ve ürün verimini olumsuz yönde etkilerler (Agarwal vd., 2006). Genellikle bir çeşit strese başka çeşit stresler eşlik eder veya bu stresi başka stresler izler. Örneğin su kaybı nedeniyle sıcaklık stresine kuraklık stresi eşlik eder. Benzer şekilde fizyolojik olarak suya ulaşamadığından soğuk stresini kuraklık stresi izler (Knight ve Knight, 2001).



Şekil 1. Bitkilerde stres çeşitleri (Schulze vd., 2005; Yılmaz vd., 2011).

1.3. Stres Dayanıklılığı

Bitkilerin çevresel streslere cevapları biraz karmaşıktır ve birçok fizyolojik ve biyokimyasal değişimleri içerir. Ekosistemlerdeki denge ve onların etkili ekonomik kullanımının devam etmesi, bitkilerin stres cevabının fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmasının ve strese karşı bitkilerin direncinin anlaşılmasına dayanmaktadır (Mundree vd., 2002). Bu direnç aktif (tolereans) ve pasif (sakınma) olmak üzere iki şekildedir ve çoğu bitki ikisini de birarada kullanabilmektedir (Levitt, 1980; Mundree vd., 2002). Eğer bir bitki fiziksel ya da metabolik bir engellemeyle oluşan stresi dışarıda bırakabiliyorsa, bu olay stres sakınması olarak adlandırılır (Street ve Opik, 1992). Örneğin bir bitkinin yaprağı, transpirasyon yaparak iç sıcaklığını korur ve böylece sıcaklıktan sakınır. Benzer şekilde kaktüs bitkisi su stresi esnasında hücre içindeki su miktarını koruyarak kuraklıktan sakınabilir (Bidwell, 1974). Su eksikliği stresinden sakınma köklere biyomas allokasyonunun artması, yaprak düşmesi, yaprak kıvrılması, düşük stomatal iletkenlik ve dışlama, salgılama, dökülme ve sukkulent mekanizmaları uyaran tuz stresi cevaplarını da içerir (Levitt, 1980; Touchette vd., 2009). Aşırı suya maruz kalma şartlarında ise etkili iç havalandırma ve adventif kök oluşumu aracılığıyla oksijen eksikliğinden sakınma etkili bir adaptasyon kriteridir (Jackson ve Armstrong, 1999).

Eğer stres bitki dokuları içine girdiği halde bitkinin gerilimi ile stresin zararlı ekisi önlenirse bu durum stres toleransı olarak isimlendirilir (Özer ve Sade, 1995). Stres faktörleri ve bitki büyüme ve gelişimini etkileyen çeşitli biyokimyasal, moleküler ve fizyolojik olaylar arasındaki ilişkinin karmaşık olması nedeniyle abiyotik streslere tolerans oldukça karmaşıktır (Razmjoo vd., 2008). Birçok stres şartlarında yaprak alanı indeksinde azalma, klorofil degradasyonu ve kanopi sıcaklığındaki artış gibi benzer semptomlar gözlenir (Baret vd., 2007). Stres esnasında amino asit ve karbohidratlar gibi suda çözünebilir uyumlu bileşiklerin birikimi stres tolerans mekanizmasında etkili olabilir (Kerepesi ve Galiba, 2000). Bir amino asit olan prolinin birikimi bitkilerde su kaybı, tuz ve su basması stresleri tarafından uyarılan en sık rapor edilen modifikasyonlardan biridir ve tam rolü tartışmalı olmasına rağmen stres tolerans mekanizmasına karıştığı düşünülür (Yiu vd., 2009). Ayrıca K^+ ve Na^+ iyonlarının dengesi ve Na^+/K^+ oranı çoğu streslerde bitki toleransı için hayati bir öneme sahiptir (Kerepesi ve Galiba, 2000).

Bitkisel üretimde farklı ürün elde edilmesinin nedeni %60-80 iklim faktörlerine özellikle su ve sıcaklığa bağlıdır (Levitt, 1980). Ayrıca strese karşı bir bitkinin cevabı

genetik potansiyeline, strese maruz kalma süresine ve gelişme dönemine göre değişmektedir (Özer ve Sade, 1995). Bir bitkinin bazı kısımları (tohumlar, tomurcuklar ve dormant hücreler) strese dayanıklı iken, diğer kısımları (meristemler, sukkulent organlar ve fideler) duyarlı olabilir (Bidwell, 1974).

Stres altındaki bitkiler üzerinde çalışma yapılmasının iki önemli nedeni vardır. Bunlardan biri bitkilerin strese karşı reaksiyon mekanizmasının öğrenilmesidir. İkincisi ise tarımsal alanlarda çeşitli streslere maruz kalan bitkilerin strese dayanma yeteneklerinin ölçülmesi ve böylece daha verimli ürün elde edilmesidir. Dünya topraklarının % 10'undan daha azının tarıma elverişli olması nedeniyle çevresel streslere dayanabilen ya da bu streslere tolerans gösterebilen bitkiler yetiştirmeye ihtiyaç vardır. Daha dayanıklı ve toleranslı bitkiler yetiştirmek için strese dayanıklılık ve tolerans mekanizmalarının bilinmesi gerekir (Bidwell, 1974). Strese dayanıklılık mekanizması bitkilerde iki şekilde etkili olmaktadır. Bitkiler ya sahip oldukları önleyici mekanizmalarla stres faktörlerinin etkinliğini önleyebilir ya da tolerans mekanizmalarıyla karşı koyarak yaşamlarını sürdürebilirler (Bidwell, 1974).

1.4. Bitkilerde Su Kaybının Etkileri

1.4.1. Mekanik Etki

Bitki hücrelerinden su kaybı bariz bir şekilde gerçekleştiğinde bitkide turgor azalmasıyla kendini gösteren stres etkisidir (Levitt, 1980). Plazma membranının yapısı hücredeki sulu ortamın bir sonucudur; bu yapı membrandaki hidrofobik fosfolipid kuyrukların su tarafından itilmesiyle oluşur (sıvı-katı faz). Hücreden su kaybıyla beraber, membran yapısı değişikliğe uğrar; fosfolipidlerin hidrofilik baş kısımları birbirine yaklaşır ve membranlar kompakt bir görüntü alır (jel fazı). Bu yeni yapıda membran lipidleri sıvı-katı fazında olduğundan daha az kinetik enerji ile lateral ve rotasyonel harekete sahiptir. Su kaybına bağlı olarak hücre hacmi de azalır ve plazma membranı hücre çeperinden ayrılarak plazmodesmalar aracılığıyla ilişkisini sürdürür. Gerilim altındaki plazma membranı ve tonoplastta gerçekleşen çökme, yırtılmalara yol açabilir (McKersie ve Lehsem, 1994) ve bu durum, zarlar üzerinde yerleşmiş olan hidrolitik enzimlerin serbest kalması ve dolayısıyla sitoplazmanın otolizi ile sonuçlanabilir (Salisbury ve Ross, 1992) Bu mekanik etki normal hücrel metabolizmayı genelde kalıcı olarak bozar.

1.4.2. Metabolik Etki

Bitkiler, metabolizmayı sürekli, geçici, erken ve geç cevap veren metabolik değişikliklerle aşamalı olarak ayarlayarak strese tepki verirler. Örneğin, kuraklık, tuz stresi ya da soğuk şartlarında rafinoz ve prolin birkaç gün boyunca yüksek seviyelerde birikirken temel karbohidrat metabolizması hızla karmaşık ve zamana bağlı bir şekilde değişir. Bazı metabolik değişiklikler kuraklık, tuz ve sıcaklık stresinde görülürken diğerleri spesifiktir. Örneğin, amino asitler, şekerler ve şeker alkollerinin seviyeleri genellikle farklı stres şartlarına tepki olarak artar. Özellikle, prolin kuraklık, tuz ve düşük sıcaklık şartlarında birikir ancak yüksek sıcaklık stresinde birikmez (Krasensky ve Jonak, 2012). Su kaybı sonucunda, prolin ve diğer aminoasitlerin dokularda birikimi proteinlerin yapısında bulunan hidrofobik ve hidrofilik aminoasitlerin su ile etkileşimlerinin bozulması (Campbell, 1991) ve böylece proteinlerin parçalanması nedeniyle meydana gelebilir (Bray, 1997; Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005). Proteinlerin parçalanmasıyla NH_3 gibi toksik bir bileşik açığa çıkar. NH_3 ise bitkide metabolik dengenin bozulmasına neden olduğu gibi suyun yukarı doğru taşınmasına da engel olarak iki yönlü zarar verir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005).

Farklı bitki türleri, farklı metabolitler biriktirir ve strese alışmak için belirli bir metabolitin birikimi için kesin bir gereklilik yoktur. Bazı durumlarda, belirli bir metabolitin birikimi yerine bir metabolik yol aracılığıyla değişiklik stres toleransına katkıda bulunabilir (Krasensky ve Jonak, 2012).

Bitkilerin çevrelerindeki değişime uyarlanması, çoklu yollar arasındaki hassas denge sayesinde yeni bir hücre homeostazı durumuna ihtiyaç duyar. Hormonlar, ikincil haberciler, fosfatazlar ve protein kinazlar, çok sayıda biyokimyasal ve fizyolojik süreci düzenleyen stres kaynaklı haberleşme ağı içerisinde önemli bileşenlerdir. Absisik asit (ABA) abiyotik stres sinyalizasyonunun ayrılmaz bir düzenleyicisidir. ABA, farklı çevresel stres şartlarına tepki olarak hızla birikir ve ABA eksik bitkilerin stres tepkisi değişir. ABA, stomatal kapanmayı teşvik eder, stomalardaki açılımı terleme yoluyla su kaybını azaltmak için inhibe eder, sayısız stresle ilişkili genlerin sentezlenmesini uyarır ve son çalışmalar stres kaynaklı metabolik ayarlamaların düzenlenmesinde bir role işaret eder (Krasensky ve Jonak, 2012). Kuraklık stresi altında ABA miktarı artarken, sitokinlerin, giberellik asit ve indol asetik asitin miktarları azalır (Çırak ve Esendal, 2006).

Su kaybına bağılı olarak iyon birikimi de gerekleŒebilir ve bu durum membran bütünlüğüünün ve proteinlerinin yapısının bozulmasına yol açarak hücreye zarar verebilir. Kuraklık stresi sırasında hasar gören diğer yapılar DNA ve RNA gibi nükleik asitlerdir. Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde RNAaz aktivitesi enzimin bağılı durumundan serbest duruma geçmesi nedeniyle artmaktadır (Kessler, 1961; Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005).

1.4.3. Oksidatif Etki

Bitki metabolizması üzerine kuraklık stresinin etkileri direkt veya dolaylı olabilir. Oksidatif stres UV ışığı, patojen istilası (aŒırı duyarlı tepki), herbisit etkisi, oksijen eksikliği ve benzeri biyotik ve abiyotik streslerden oluŒan geniŒ bir yelpazede ortaya çıkar. Kuraklık ve tuz stresi genellikle serbest radikallerin özellikle reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluŒumuna neden olur (Mattos ve Moretti, 2015). Serbest radikaller eŒleŒmemiŒ elektron içeren moleküller olup oldukça reaktifirler. Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dıŒ orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerekleŒir. DıŒ orbitallerde paylaŒılmamıŒ elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini arttırdığı için, serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir. Bu radikaller plazma membranı, mitokondri, ER membranlarında da normal hücrenel metabolizma ürünü olarak oluŒabilir (McKersie ve Lehsem, 1994; Mattos ve Moretti 2015). Bununla birlikte su eksikliği Œartlarında, bitkiler su kaybını engellemek için genellikle stomalarını kapatır. Bu durum da fotosentezle fiksasyon için gerekli CO₂'nin alımının kısıtlanmasına neden olur ve böylece kuantum verimi azalır. Fotosentezdeki elektron akseptörü NADP⁺ kısıtlı hale gelir ve ferrodoksin NADP yerine oksijeni indirger ve PSI'in elektronları O₂'ye aktarması sonucunda reaktif süperoksit radikali (O₂^{•-}), üretilir (Mehler reaksiyonu) (Tambussi vd., 2000). Birçok türde kuraklık stresi altında artan süperoksit üretim hızı lipid peroksidasyonuna, yağ asidi doygunluğuna ve sonuç olarak membranların bütünüyle zarar görmesine neden olur (Sgherri vd., 1996). Süperoksit tek baŒına çok fazla reaktif olmayıp, H₂O₂ ve •OH radikallerini oluŒturmak suretiyle etkili olur (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Süperoksit ve hidrojen peroksinin hidroksil radikalini oluŒturmak üzere tepkimesi sırasında (Haber-Weiss reaksiyonu), artan demir ya da bakır gibi diğer geiŒ metalleri, bu reaksiyonları hızlandırmak suretiyle oksidatif hasarı daha da artırabilir (Fenton reaksiyonu). Serbest radikaller hem indirgen hem de yükseltgen olarak bazen de her iki

etkiyi birlikte göstererek DNA, hücrel proteinler ve lipidler üzerine de zararlı etkiye neden olurlar (Smirnoff, 1993). Yıkıcı etkilerine rağmen ROS'lar çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı direnç dahil olmak üzere hücrel işlemlerin değişmesinde ikincil uyarıcılar olarak temsil edilmektedirler. ROS'ların sinyal molekül olarak mı rol oynayacağı yoksa dokularda oksidatif strese mi neden olacağı ROS üretimi ve ROS'ların temizlenmesi arasındaki hassas dengeye bağlıdır (Mattos ve Moretti, 2015).

1.5. Kuraklık Stresi, Sakınma ve Tolerans

Kuraklık genel anlamda meteorolojik bir terim olup, toprağın su içeriği ile bitki gelişiminde gözle görülür azalmaya neden olacak kadar uzun süren yağışsız dönem olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak kuraklık stresi, topraktaki mevcut su azaltıldığında ve atmosfer şartlarının transpirasyon veya buharlaşma ile sürekli su kaybına neden olması durumunda oluşur (Jaleel vd., 2009).

Dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar stres faktörlerine göre sınıflandırıldığında doğal bir stres faktörü olan kuraklık stresi % 26'lık payıyla en büyük dilimi içermektedir. Kuraklık stresini % 20 ile mineral stresi ve % 15 ile soğuk ve don stresi takip etmektedir. Bunların dışında kalan tüm stresler % 29'luk bir pay alırken, yalnızca % 10'luk bir alan herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamaktadır (Blum, 1988). Su eksikliği ve tuz stresi, tarımsal ürünlerin varlığını devam ettirmesini ve sürdürülebilir gıda üretimini sağlamak için küresel konulardır (Jaleel vd., 2007). Bitkiler, sınırlı çevresel şartlara adapte olmayı sağlayacak bazı tolerans mekanizmalarına sahiptirler. (Arora ve Mohan, 2001). Kramer (1980)'e göre bu mekanizmalar kuraklıktan sakınma ve kuraklığa tolerans gösterme olmak üzere iki ana başlık altında incelenebilir. Çoğu bitkide çeşitli kuraklık sakınma mekanizmaları vardır. Bu sakınma mekanizmalarından biri çöl bitkilerinde görülür. Örneğin, çölde kısa ömürlü olan bitkiler yeterli yağmur periyodu sırasında büyür ve çoğalırlar. Kuraklık periyodunda ise dormant tohumlar meydana getirirler. Diğer bir sakınma mekanizması sukkulent bitkilerde görülür. Bu bitkiler kuraklığa karşı sukkulent dokularında su depolayarak su kaybını en az oranda tutarlar ve böylece uzun bir süre canlılıklarını sürdürebilirler (Salisbury ve Ross, 1992). Örneğin herdem yeşil çöl bitkileri kuraklık periyodu boyunca dokularındaki turgoru devam ettirebilmek için suda çözünebilir maddeleri biriktirerek kuraklıktan kaçınırlar (Mundree vd., 2002). Diğer taraftan, bitkisel organlar arasında stresten en çok etkilenen organlardan birisi yapraklar olup, özel çevre

şartlarına adapte olmak için bir takım değişimler geçirirler. Örneğin, kurak ortam bitkileri ışık etkisinden korunmak ve suyu iyi bir şekilde absorbe etmek için yaprak yüzeyinde tüy, kütikula ve stoma modifikasyonları gibi özel yapılara sahiptirler. (Kramer, 1980).

Stresten kaçınan bitkiler yalnızca orta şiddetteki kuraklık stresi durumunda hayatta kalırken strese toleranslı bitkilerde ise çok daha şiddetli kuraklık stresi durumunda hayatta kalabilirler. Kuraklığa toleranslı bitkiler dehidrasyonu erteleyenler ve dehidrasyona tolerans gösterenler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Kramer, 1980). Dehidrasyonun ertelenmesi transpirasyonu azaltan veya su absorpsiyonunu artıran mekanizmalar ile sağlanır. Böylece bitkinin zarar oluşturacak derecede düşük su potansiyeline ulaşması önlenir. Dehidrasyon toleransı ise hücreler su hasarına ve düşük su potansiyeline maruz bırakıldıktan sonra bitkinin canlılığını devam ettiren veya büyüten mekanizmaları içerir. Kuraklık stres toleransı hemen hemen tüm bitkilerde görülmekle birlikte, büyüklüğü türden türe ve hatta türler içinde değişmektedir (Jaleel vd., 2009). Kuraklık toleransına sahip bitkiler protoplazma su kaybettiği zaman protoplazması yeniden su alana kadar hayatsal faaliyetlerine devam edebilirler (Hopkins, 1995). Su hasarı artarsa hücreler turgor durumlarını kaybederler ve böylece hücrelerin büyümesi sınırlandırılır (Hasegawa vd., 1984).

Kuraklık stresine karşı tolerans mekanizmalarından biri de osmotik ayarlamadır (Shao vd., 2008). Kuraklık stresinin bir sonucu olarak bitkiler, osmolitler olarak bilinen ve turgorun devamını sağlayan indirgen şekerler, prolin, betainler, trehaloz, potasyum ve fruktan gibi bir takım maddeler sentezlerler (Kadıoğlu ve Terzi, 2007). Osmotik ayarlama, kuraklık sonucu turgor özelliğini kaybeden bitki hücrelerinin, sakınma mekanizmalarının yokluğunda turgoru yeniden kazanmaları ve büyümeyi devam ettirebilmeleri için başvurdukları bir yoldur (Handa vd., 1983). Örneğin ağır kuraklığa maruz kalan hintdarısı fidelerinde osmotik ayarlamının bitkilerin hayatta kalması için veya bitki büyümesine yardımcı olmak için hücrelerin turgor durumunu koruyabileceği rapor edilmiştir (Shao vd., 2008).

Kuraklık stresi fotosentez, solunum, translokasyon, iyon alınımı, karbohidratlar gibi fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri etkileyerek bitki büyümesini azaltır. Bitkilerde kuraklık stresine dayanmak için meydana gelen morfolojik, fizyolojik ve moleküler değişikliklerin temellerinin daha iyi anlaşılması kurak şartlarda daha iyi verim elde etmek için yeni bitki çeşitlerini seçmek veya üretmek için kullanılabilir. Bitkilerin kuraklık stresine tepkileri bitki türüne ve gelişim aşamasına bağlı olduğu kadar aynı zamanda stres

yoğunluğuna ve süresine de bağlıdır. Kuraklığa karşı bitki yanıtlarını anlamak büyük önem taşır ve aynı zamanda bitkileri strese karşı daha dayanıklı hale getirmenin temel parçasıdır (Zhao vd., 2008).

1.6. Kuraklığın Morfolojik Özellikler Üzerine Etkileri

Kuraklık stresi bitki büyüme ve oluşumunun ilk evresinde çok önemli bir sınırlayıcı faktör olarak tespit edilmiştir. Kültür bitkileri arasında, su altı mahsülü olan çeltik birçok türe göre kuraklık stresine karşı daha hassastır. Kuraklık stresiyle oluşan su kaybına bağlı olarak gövde uzunluğu ve bitki boyunda önemli indirgenmelerin olduğu kaydedilmiştir. Örneğin soyada gövde uzunluğunun su eksikliği şartları altında azaldığı rapor edilmiştir. Su eksikliği stresine maruz kalan limon fidelerinde bitki boyunun % 25 azaldığı bildirilmiştir. Benzer şekilde patates, *Abelmoschus esculentus*, *Vigna unguiculata*, soya ve maydanozda sap uzunluğunun su stresi altında indirgendiği kaydedilmiştir. Su kaybı esnasında *A. esculentus*'ta bitki boyundaki azalma yaprak senesensinden ziyade hücre genişlemesindeki azalma ile ilgilidir. Optimum yaprak alanının gelişimi fotosentez ve kuru madde birikimi açısından önemlidir. Su stresi yaprak büyümesini azaltır ve böylece yaprak alanını birçok bitki türünde türe bağlı olarak indirger. Örneğin buğdayda yaprak büyümesi su stresine mısır, *Vigna unguiculata* ve ayçiçeğinden daha hassastır (Jaleel vd., 2009).

Su eksikliği stresi bitkilerin kök sisteminde de bazı değişiklikleri uyandırabilir. Örneğin kuraklığa maruz kalan bazı bitki türleri veya türlerin varyetelerinde kök üretiminde önemli farklar sergilendiği ve dallanmış bir kök sisteminin kuru madde üretimi için önemli olduğu ileri sürülmüştür. Su stresi altında kök büyümesinin arttığı kök kuru ağırlığının ise bitkilerde azaldığı bildirilmiştir (Jaleel vd., 2009).

1.7. Kuraklığın Fizyolojik Parametreler Üzerine Etkileri

1.7.1. Su Potansiyeli ve Nispi Su İçeriği

Yaprak su potansiyeli, nispi su içeriği (NSİ), stomatal iletkenlik, transpirasyon oranı, yaprak sıcaklığı ve kanopi sıcaklığı bitki su ilişkilerini etkileye önemli özelliklerdir (Anjum vd., 2011). Stresle ilgili çalışmalarda yaprak su potansiyelinin ölçülmesi

önemlidir. Büyüme periyodundaki mısır bitkisinde yaprak su potansiyelinin -0,6 ile -0,7 MPa'dan düşük olmaması gerektiği ileri sürülmüştür (Padurariu vd., 1969). Örneğin, şekerpancarında bu değer -0,5 MPa olarak kaydedilmiştir. Yaprak su potansiyeline en fazla etki eden olaylardan biri transpirasyondur. Diğer taraftan toprak su durumuna bağlı olarak yaprak su içeriğinin azaldığı ve su durumundaki söz konusu azalmaların bitki büyümesini uyaran kimyasalların (osmotik koruyucu bileşikler (osmoprotektanlar), antioksidanlar, bitki büyüme düzenleyicileri, ve gübreler gibi) bitkilere dıştan uygulanması ile giderildiği de bilinmektedir (Ashraf ve Foolad, 2007; Terzi vd., 2015). Örneğin kuraklık stresine maruz bırakılan Arabidopsis fidelerinde yapılan bir çalışmada, stresin etkisiyle yaprak su içeriğinin azaldığı, dıştan osmotik koruyucu bileşiklerden biri olan prolin uygulamasıyla ise azalan su içeriğinin bertaraf edildiği kaydedilmiştir (Moustakas vd., 2011).

Su potansiyeline benzer şekilde, nispi su içeriği (İngilizce kaynaklarda yaygın olarak RWC,Relative Water Content olarak kısaltılır) de yaprağın su durumunu ve dokunun metabolik aktivitesini yansıtan bitkinin su durumunun genel bir ifadesidir. Nispi su içeriği bir çok çevresel parametreden etkilenen transpirasyon ve topraktan su alınımı arasındaki dengenin sağlanmasına karşı oldukça duyarlıdır (Sivaramakrishnan vd., 1988). Stres çalışmalarında NSİ'nin belirlenmesi oldukça önemlidir. Buğday kültürleri (Sairam vd., 2001) ve ayçiçeğinde (Sgherri ve Navari-Izzo, 1995) NSİ'nin su stresinin artmasıyla azaldığı bildirilmiştir. Stres esnasında dayanıklı ırkların nispi su içeriğindeki azalışın hassas olanlara nazaran daha az olduğu bilinmektedir. Örneğin, Pastori ve Trippi (1992), NSİ'nin iki mısır ırkında kuraklık periyodu esnasında azaldığını ve bu azalışın hassas olan ırkta dayanıklı olana göre önemli derecede fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Buğday bitkisinde yapılan diğer bir çalışmada da toleranslı olan kültürün hassas olanla karşılaştırıldığında, stres periyodu esnasında daha fazla NSİ'ye sahip olduğu görülmüştür (Sgherri vd., 2000). Soğan bitkisinde yapılan başka bir çalışmada ise NSİ'nin kontrol ile karşılaştırıldığında % 25 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Egert ve Tevini, 2002).

1.7.2. Lipid Peroksidasyonu

Stres etkisiyle oluşan serbest radikaller bitkilerde lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Thompson vd., 1987). Lipid peroksidasyonu oksidatif stres sonucunda oluşan malondialdehit (MDA) içeriğine bakılarak belirlenir (Irigoyen vd., 1992) ve yaprak senesensi esnasında önemli bir değişim olarak düşünülür (Dhindsa vd., 1981-82;

Thompson vd., 1987). Stres altında lipidlerin oksidasyonu iki veya üç kat artabilir. Örneğin çeltik sürgünlerinde (Yordanov vd., 2000), buğday genotiplerinde (Sairam vd., 2001) ve şeker kamışı yapraklarındaki (Smirnoff, 1993) su stresi lipid peroksidasyonunu artırır. Ayrıca, yoncada kuraklık stresi lipid peroksidasyonunu uyarabilir (Irigoyen vd., 1992). Diğer taraftan bazı çim bitkilerinde kuraklık esnasında MDA içeriğinin etkilenmediği de bilinir. Lipid peroksidasyonunun düşük seviyede olması özellikle SOD ve peroksidaz gibi bazı antioksidan enzimlerin aktivitesinin yüksek seviyede tutulmasının bir sonucu olabilir (Fu ve Huang, 2001). Ayrıca, lipid peroksidasyonunun bitkilerin strese toleransı ile ilişkili olduğu bilinir. Örneğin, su stresine maruz bırakılmış buğday ve mısır çeşitlerinde su stresi şartlarında MDA içeriği artarken hassas genotiple karşılaştırıldığında strese toleranslı genotiplerde düşük oranda lipid peroksidasyonu meydana gelir (Pastori ve Trippi, 1992; Sairam vd., 1998). Yine stres etkisiyle artan membran hasarlarının bazı antioksidan ve sinyal bileşiklerin dıştan bitkilere püskürtülmesiyle azaldığı bilinir (Moustakas vd., 2011).

1.7.3. Fotosentetik Pigmentler

Fotosentetik pigmentler esas olarak fotokimyasal reaksiyonlarda ışığı yakalamak ve indirgeyici güç oluşturmak için oldukça önemli bir rol oynamaktadırlar (Taiz ve Zeiger, 2006). Klorofil a ve klorofil b'nin her ikisi de toprak kurumalarına karşı etkilenme eğilimindedir. Karotenoidler ise ilave rollere sahiptirler ve kuraklık hasarlarına dayanmak için kısmen bitkilere yardımcı olurlar. Lipofilik antioksidanlar grubunu temsil eden karotenoidler ROS'ların çeşitli formlarını temizleyebilirler. Karotenoidler görünür spektrumun 400 ve 550 nm arasındaki bölgedeki ışığı absorbe ederler ve yakaladıkları enerjiyi klorofile aktarırlar. Oksidatif hasarı engellemek için singlet oksijeni temizleyebilirler ve fotosentetik aygıtı korumak ve singlet oksijen oluşumunu engellemek için triplet uyarılmış klorofil ile uyarılmış klorofili yatıştırabilirler. Bitki büyümesini ve abiyotik stres cevaplarını etkileyen sinyal moleküllere öncül (prekürsör) olarak rol oynarlar (Mattos ve Moretti, 2015).

Kuraklık klorofil a ve b ve karotenoid oranında değişimlere neden olur (Jaleel vd., 2009). Klorofil içeriğinde azalma kuraklık stresine maruz kalan pamuk (Massacci vd., 2008) ve *Catharanthus roseus* türlerinde rapor edilmiştir (Jaleel vd., 2009). Kuraklıkta klorofil içeriğinin azalması pigment fotooksidasyonunun ve klorofil parçalanmasının tipik bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Anjum vd., 2011). Toplam klorofil içeriğindeki

azalma ışık yakalama kapasitesinin de azalmasına işaret etmektedir (Abaaszadeh vd., 2007). Kuraklık stresi şartlarında klorofil içeriğindeki azalma oksidatif stresin tipik bir belirtisidir. Kuraklık stresi şartlarında stresin süresi ve şiddetine bağlı olarak azalan veya değişmeyen klorofil seviyesi çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir. Örneğin ayçiçeği varyetelerinde kuraklığın klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içeriğinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Klorofil içeriğindeki kayıpların ise fotosentezin inaktif olmasına neden olduğu belirlenmiştir. Kuraklık şartlarında, fotosentezde stomaların kapanmasından kaynaklanmayan azalma, klorofil parçalanmasının sonucu olarak meydana gelir (Anjum vd., 2011).

Su stresi altında pigment içeriğini iyileştirme stratejileri üzerine çalışmalar sınırlıdır. Bununla beraber, brassinolidlerin, unikonazol ve metil jasmonatın artan süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz aktiviteleri ve absisik asit ve klorofil içeriği ile kuraklık hasarlarını giderdiği bildirilmiştir. Diğer taraftan, su stresinin tilakoidlerde reaktif oksijen bileşiklerinin üretimini uyararak dokudaki klorofil ve karotenoidlerin konsantrasyonunun azaldığı bilinmektedir (Jaleel vd., 2009). Klorofilin biyosentezinde anahtar düzenleyici bir adım olan protoklorofilin klorofilite ışığa bağlı indirgenmesi NADPH protoklorofil oksidoredüktaz (POR) tarafından katalizlenmektedir (Reinbothe vd., 1996; Thomas, 1997). Klorofil parçalanması ise klorofilaz tarafından gerçekleştirilir ve enzim aktivitesi kuraklık stresi şartlarında bitkilerde artış gösterir (Mihailovic vd., 1997).

1.7.4. Klorofil Fluoresansı

Yaprakta yer alan klorofil fotosistem II, fotosistem I ve bu reaksiyon merkezlerinin herbiriyle ilişkili ışık yakalama kompleksleri içinde pigment-protein kompleksleri olarak bulunur. Bir klorofil molekülü ışığı absorbe ettiğinde bir elektronu temel durumdan uyarılmış duruma gelir. Klorofil moleküllerinin absorbe ettiği bu ışık enerjisi fotosentetik işlemleri yürütmek için kullanılır. Fazla enerji ise ısı olarak dağıtılır ya da klorofil floresansı olarak adlandırılan kırmızı ışık olarak yansıtılır. Bu işlemler eş zamanlı olarak meydana gelir ve bir tanesinin etkinliğindeki artış, diğer ikisinin verimliliğini azaltır. Bu sebeple klorofil floresansın verimliliğini ölçerek fotokimyasal etkinlik ve ısı dağılımı hakkında bilgi edinmek mümkündür (Maxwell ve Johnson, 2000). Klorofil floresansı, fotosistem II aktivitesinin bir ölçümüdür ve bitki fizyolojisinde yaygın olarak kullanılan bir

tekniktir. Düşük maliyet ve veri toplama kolaylığı da sağlayan PSII aktivitesi abiyotik ve biyotik faktörlere duyarlıdır ve bu nedenle, fotosentetik mekanizmaları ve aynı zamanda bitkilerin çevre değişimine nasıl tepki verdiğini daha iyi anlamak için önemli bir belirleyicidir (Murchie ve Lawson 2013).

Fotosentez ışık reaksiyonları ve karbondioksit fiksasyon reaksiyonları olmak üzere iki ana reaksiyondan oluşur. Çoğu su eksikliğinde, enerji aktarılmasında azalma olmasına rağmen, anten klorofillerinin uyarılması ve fotosistem II reaksiyon merkezi korunur. Ağır bir stres olmadıkça genellikle su stresi altında karanlığa adapte olmuş yapraklarda Fv/Fm olarak ölçülen fotosistem II'nin etkinliği bozulmaz (Tezara vd., 1999).

1.7.4.1. Klorofil Floresans Analizinin Esasları

Karanlık bir periyottan sonra bir yaprağa fotosentezi yürütmek için yeterli ışık uygulandığında, tilakoid membranda genellikle elektron taşınımının indirgenmesinin sonucu olarak klorofil floresans seviyesinde geçici bir (genellikle birkaç saniye) artış meydana gelir. PSII'deki özel bir klorofil olan P₆₈₀ suyun parçalanmasından türetilen bir elektronu ilk akseptör feofitin aracılığıyla elektron alıcı QA'ya (bağlı bir kinon) fırlatır. Bununla beraber QA, elektronunu diğer bir taşıyıcı olan QB'ye aktarana kadar P₆₈₀'den diğer bir elektronu kabul edemez. Bu durumda reaksiyon merkezinin "kapalı" olduğu düşünülür. Işık yoğunluğu veya sıcaklık gibi yaygın şartlara bağlı olarak reaksiyon merkezi daha az veya daha çok oranda kapalı kalabilir. Kapanış PSII'nin kuantum etkinliğinde kaçınılmaz bir azalışa neden olur (Murchie ve Lawson, 2013).

Aktinik ışık uygulamasından sonra floresanstaki ilk artışın ardından floresans sinyali birkaç dakika süreyle azalır (Krause ve Weis, 1991). Bu olay "Sönme (quenching)" olarak adlandırılır ve floresans sinyalinin sönmesi birkaç oluşumun (proses) biraraya gelmesiyle gerçekleşir. Bunların ilki fotosentez oluşumunun ışıkla aktifleşmesidir. Özellikle, stroma ve sitosolde metabolit havuz hacminin artması gerekir ve Calvin döngüsünün anahtar enzimleri tam aktiviteyi sağlamak için aktivasyona ihtiyaç duyar (Buchanan ve Balmer, 2005). Karanlık ortam sıcaklığında bu işlem tür ve ortamdan kaynaklanan büyük miktarda varyasyona bağlı olarak birkaç dakika veya daha uzun süre devam edebilir. Diğer bir faktör rubisco için CO₂'in temin edilmesini artıran stomaların açılmasıdır. Stoma fotosentetik olaylardan daha büyük bir derecede yavaş açılma kapanma eğilimindedir (Lawson vd., 2012). Tüm bu işlemler tilakoidlerdeki ışığa bağımlı

işlemlerden türevlenen elektronlar için havuzun kullanımının artmasını sağlar ve fotosentez işlemiyle sönmeye katkıda bulunur ve bu durum fotokimyasal sönme (qP) olarak adlandırılır (Murchie ve Lawson, 2013).

İkincisi klorofilin uyarılma enerjisinin ısıyla dağılımı için sabit oranda ışıklandırmada ani bir artış vardır. Bu ise fotokimyasal olmayan sönme (NPQ) olarak adlandırılan bir parametre kullanılarak ölçülür. Bu, klorofil içeren komplekslerdeki aşırı uyarılma enerjisini uzaklaştıran fotokoruyucu bir işlemdir ve zararlı serbest radikal oluşma ihtimalini engeller. Bu tip sönme hem fluoresans hem de fotokimyasal sönme ile yarışır ve mevcut şart ve türe bağlı olarak önemli seviyelerde klorofil uyarılma enerjisini dağıtmak için bir 'güvenli' mekanizma görevi görür (Demming-Adams ve Adams, 2006). NPQ işlemi tilakoid lümende proton birikimi nedeniyle tilakoid lümenin asitleşmesi ile düzenlenir. Ayrıca, düzenleyici protein PsbS'yi ve ksantofil döngüsünde violaksantin zeaksantin'e dönüştürülmesini de içerir (Li vd., 2002; Kiss vd., 2008; Murchie ve Niyogi, 2011). Ksantofiller NPQ'da kritik rol oynayan karotenoidlerdir. Violaksantin zeaksantine dönüşümü tilakoid lümenin asitleşmesiyle violaksantin de-epoksidaz enziminin aktifleşmesi sonrasında ışıkta belirlenir. PsbS'nin protonlanması ve zeaksantin oluşumu PSII anteninde komformasyonel değişimlere neden olur ve böylece PSII antenindeki uyarılma enerjisinin sönmeye uyarılır (Ruban vd., 2012).

Kapsamlı bir kavram olan klorofil fluoresans analizi, tilakoid zar içerisinde klorofilin tüm enerji dağılımını oluşturan bileşenleri ayırmamızı sağlar. Önceki teknikler fotokimyasal sönmeyi gidermek için PSII'deki elektron taşınımını engelleyen herbisit gibi kimyasalların uygulanmasını içeriyordu. Böylece herbisit uygulamadan önce fotokimyanın ne olduğunun işareti elde ediliyordu. Bu rutin olarak pratik olmadığından dolayı herbisit uygulanması süresince tüm PSII reaksiyon merkezlerini geçici olarak kapatan kısa (1 saniyeden küçük) çok parlak doyurucu flaş ışığının uygulanmasını içeren teknikler geliştirildi. Flaşlar sırasında reaksiyon merkezleri kapandı ve böylece fotokimyasal sönmeye seviyesi etkili bir şekilde sıfırlandı ve sadece fotokimyasal olmayan işlemler kaldı. Dozurucu flaş ışığı/sinyal temel ilkesi fluoresansın herhangi bir fotokimyasal sönme olmadan var olana karşılık gelen bir seviyeye yükselmesidir (Murchie ve Lawson, 2013).

Karanlığa adapte olmuş bir yaprağa doyurucu sinyalin uygulanması reaksiyon merkezini kapatarak fluoresansın maksimum değerini uyarır. Bu noktada, sağlıklı stres geçirmemiş bitkilerde NPQ yoktur çünkü materyal tamamen karanlığa adapte olmuştur. Böylece fluoresans için maksimum olası değer olan Fm (maksimum fluoresans) kaydedilir

(Murchie ve Lawson, 2013). Maksimum fluoresans (Fm), ışıktaki durağan fluoresans (Ft) ve fotosentetik ışığın olmadığı fluoresans (Fo) ile karşılaştırılırsa, fotokimyasal azalmanın etkinliği ve PSII performansı hakkında bilgi verir (Maxwell ve Johnson, 2000). Fo ve Fm arasındaki fark değişken fluoresans olarak adlandırılan Fv'dir. Teorik ve deneysel olarak Fv/Fm, PSII kimyasının maksimum kuantum veriminin güçlü bir göstergesidir. Stressiz yapraklarda Fv/Fm değeri ~0.83 gibi oldukça sabittir ve fotosentezin maksimum kuantum verimi ile ilişkilidir. PSII'nin inaktivasyon hasarına (genellikle fotoinhibisyon olarak adlandırılır) neden olan herhangi bir stres tipinin varlığı veya sürekli sönme indüksiyonu Fv/Fm'nin düşmesine neden olur. Karanlık adaptasyonunun uygun periyodunu takiben Fv/Fm'nin ölçülmesi yapraklardaki stresi ölçmek için en yaygın tekniklerden biri olarak kullanılır (Murchie ve Lawson, 2013).

Karbondioksit indirgenme yolları, fotosentetik fotosistemler ve elektron taşınım sistemi dikkate alındığında PSII fotosentetik aygıtın en fazla ısıya duyarlı elemanıdır (Song vd., 2014). Fluoresansdaki sönmenin fotokimyasal ve fotokimyasal olmayan bileşenlerini açıkça ayırmak, klorofil fluoresansını ölçerek bitkilerin fotosentetik performansını anlamak için önemlidir. Maksimum fluoresans seviyesi NPQ'deki değişimle, değişikliğe maruz kalmasına rağmen, NPQ tamamen inhibe edilemez ve klorofil fluoresansının verimi NPQ olmadan ölçülemez (Sağlam, 2011).

1.7.5. Fotosentez

Fotosentez su stresine cevap olarak en fazla etkilenen fizyolojik oluşumlardan biridir (Pinheiro ve Chaves, 2011). Kuraklık stresi şartlarında stomatal ve stomatal olmayan sınırlamalar nedeniyle fotosentez oranı azalabilir. Susuz topraklarda su kaybını azaltmak için meydana gelen ilk cevaplardan biri transpirasyonun da azaltılmasına neden olan stomatal kapanmadır. Kuraklık sırasında bitkilerin stomalarını kapatmalarına neden olan iki temel etken, hidrolik sinyaller (yaprak su potansiyeli, hücre turgoru) ve kimyasal sinyaller (absisik asit)'dir. Köklerde sentezlenen ve transpirasyonla bekçi hücrelerine taşınan absisik asit, kuraklık stresi şartlarında stomaların kapanmasını sağlar. Stomaların kapanmasında, yaprak su potansiyeli ve hücre turgorunun azalması etkili olmakla birlikte son yıllarda yaprak su potansiyelinde bir düşme olmaksızın stomatal iletkenliğin azaldığı belirlenmiş ve böylece stoma kapanmasının yapraktaki su potansiyelinden çok toprağın su potansiyeline bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca, yapılan çalışmalarda hidrolik ve

kimyasal sinyal tipleri arasında bir etkileşimin olduğuna dair kanıtlar elde edilmiştir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005). Diğer taraftan stomatal kapanma fotosentez için CO₂'nin mezofil hücrelerine girişini sınırlandırır (Cornic, 2000; Grassi Ve Magnani, 2005; Flexas vd., 2006). Hafif su stresi altında stomatal sınırlama azalan fotosentezin ana nedenidir (Anjum vd., 2011).

Ağır su stresi altında bazı bitkilerde fotosentez biyokimyasal inhibisyon ve metabolik sınırlamalar (stomatal olmayan) yüzünden azalır (Anjum vd., 2011). Ağır su stresine maruz bırakılan bitkilerden izole edilen kloroplastlarda fotosentetik elektron transportu ve fotofosforilasyon kapasitelerinin azaldığı görülmüştür. Fotosentetik elektron zincir reaksiyonlarının inhibisyonu reaktif oksijen türlerinin oluşumuna ve böylece fotooksidatif hasara neden olabilir. Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde kloroplastlardaki iki fotosistemin ve özellikle de PSII'nin reaksiyon merkezinde yer alan D1 ve D2 proteinlerinin etkilendiği gösterilmiştir. Bitkiler stres durumunda D1 proteininin içeriğini sabit tutacak bir onarım sistemine sahip olduklarından hafif şiddetli stres şartlarında yapım hızının yıkım hızına yakın olması nedeniyle PSII'nin D1 içeriğinde büyük bir değişiklik meydana gelmez. Ağır bir stres durumunda ise D1 proteininin sentezi sınırlı hale gelir ve önce D1 proteini, sonra D2 proteini ve son olarak da tüm PSII parçalanır.

Fotosentezin stomatal olmayan sınırlanması; kloroplast lipidlerinin, pigmentlerinin ya da proteinlerinin oksidatif olarak hasar görmesiyle ilişkili olabilir. Bitkilerde fotosentetik kapasite, ortamın ışık yoğunluğu ve nispi su içeriğinin değişimine bağlı olarak da etkilenmektedir. Bununla beraber, karbondioksit fiksasyon reaksiyonları üzerine su stresinin inhibitör etkisi stomaların kapanması nedeniyle karboksilasyon bölgesine atmosferden CO₂ girişinin azalması ve fotosentezde rol alan önemli proteinlerin parçalanması ile ilgilidir (Lawlor ve Cornic, 2002).

Su stresi protein sentezini, protein parçalanmasını veya denaturasyonunu artırarak protein devri (turnover) ile ilgili bazı metabolik değişimleri uyarır. Örneğin karbondioksit fiksasyon reaksiyonlarındaki anahtar enzim ve dünyada en bol bulunan protein, ribuloz 1,5 bifosfat karboksilaz/oksigenazın inaktivasyonu su stresi altında fotosentezin stomatal olmayan sınırlamalarına katkı sağlar (Lawlor ve Cornic, 2002; Demirevska vd., 2008). Rubisco 55-56 kDa ağırlığında 8 büyük alt ünite ve 14-16 kDa ağırlığında 8 küçük alt ünitelerden oluşur. Büyük alt ünite yüksek bitkilerde kloroplastlardaki rbcL tarafından, küçük alt ünite ise nuklear rbcS tarafından kodlanır. Su stresi de dahil olmak üzere farklı çevresel şartlar altında rubisco aktivitesi ve miktarının nasıl regüle edildiği henüz ortaya

konulmamıştır (Zhang vd., 2013). Örneğin çeşitli çalışmalarla su stresinin bazı metabolik hasarlara özellikle rubisco aktivitesi ve protein içeriğinde azalmalara neden olduğu rapor edilmiştir. Bununla beraber, uzun süreli su stresine aklimasyon (alışma) gösteren ayçiçeği bitkilerinde rubisco içeriğinin arttığı da kaydedilmiştir (Pankovi' C vd., 1999). Rubisco'nun regülasyonunu araştırmak hem miktarı (parçalanma ve sentez) hem de aktivite değişimi nedeniyle zordur (Lawlor ve Tezera, 2009). Genellikle, su stresi altında rubisco aktivitesinin azalmasının nedeni rubisco aktivasyonunda rol oynayan rubisco aktivaz, ATP eksikliği, rubiloz 1,5 bifosfat (RuBP) miktarının azalması ve kloroplastlarda CO₂ seviyesinin düşmesi (düşük kloroplast CO₂ konsantrasyonu) ile ilgilidir (Lawlor ve Tezera, 2009; Pinheiro ve Chaves, 2011). Yüksek yapılı bitkilerde fotosentez oranı RuBP sentezi kadar rubisco aktivitesine bağlıdır (Reddy vd., 2004).

1.8. Yüksek Bitkilerde Fotosentetik Gen İfadesi

Fotosentez yüksek bitkilerin ve alglerin kloroplastlarında ışığı biyolojik enerjiye dönüştürür. Fotosentetik elektron taşınması ve Calvin-Benson döngüsü nuklear genomun ve de kloroplastların kodladığı pek çok gen ürününe ihtiyaç duyar. Her iki bölümdeki genlerin ifadesi oldukça aktiftir ve farklı faktörler tarafından etkilenir. Işık, kloroplast ve nukleustaki fotosentetik gen ifadesini düzenleyen primer çevresel belirleyicilerinden biridir. Işık aynı zamanda fitokrom gibi fotoreseptörler aracılığıyla fotosentetik genleri transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyede regüle eder. Fotosentetik gen ifadesini etkileyen diğer oluşumlar (prosesler) fotosentetik aktivite, gelişim ve biyotik ve abiyotik streslerdir. Nukleustan kloroplasta (anterograde) ve kloroplasttan nukleusa (retrograde) sinyaller farklı bölümler arasındaki birçok fotosentetik genin koordineli olarak ifadesini sağlarlar. Nukleustan kloroplasta iletilen sinyaller sigma faktörleri ve RNA-bağlama proteinleri gibi nuklear kodlu transkripsiyonel ve post-translasyonel regülatörleri içerir. Kloroplasttan nukleusa iletilen sinyaller nukleustaki fotosentetik genlerin ifadesini etkilemek için fotosentetik elektron taşınması ve redoks sinyali gibi fotosentetik oluşumları kullanırlar (Berry vd., 2013).

Kloroplast tarafından kodlanan genler; *rbcL*, (rubisco büyük alt ünitesi), *psaA-C, I, J* (Fotosistem I unsurları), *psbA-N, Tc, Z* (fotosistem II unsurları), *petA* (sitokrom f), *petB* (sitokrom b6), *petD* (sitokrom b6f kompleksinin 4 alt ünitesi), *pet G, L* (sitokrom b6f kompleksinin 4 kDa alt ünitesi), *atpF, H, I* (Cf₀ ATPaz alt üniteleri), *atpA, B, E* (CF₁ ATPaz

alt üniteleri), *rpl*, *rps* (ribozomal proteinlerin büyük ve küçük alt üniteleri) dir. Nukleus tarafından kodlanan fotosentetik genler ise *rbcS* (rubisco küçük alt ünitesi), *Rca* (rubisco aktivaz), *PsaD-H,K,L,N,O* (fotosistem I unsurları (komponentleri)), *Lhca1* (*cabI*)-6 (PS I'in anten pigment proteinleri), *PsbO-Tn,U, W-Y* (fotosistem II unsurları), *Lhcb1* (*cabII*)-6 (PS II'in anten pigment proteinleri), *PetC* (sitokrom b6f kompleksinin demir sülfür protein alt ünitesi), *PetM* (sitokrom b6f kompleksinin 4 kDa alt ünitesi), *PetE* (plastosiyanin), *PetF* (plastid ferrodoksin), *PetH* (ferrodoksin-NADPH oksidoredüktaz), *AtpC,D* (CF₁ alt üniteleri, (γ , δ) stromal domain) ve *AtpG* (CF₀ alt ünite II (transmembran domaini)'dir (Berry vd., 2013). Fotosentezdeki artış ribuloz 1,5 bifosfat karboksilaz aktivitesinin artmasıyla meydana gelebilir. Rubisco fotosentezin kontrolünde kritik bir rol oynar ve kloroplast genomundaki tek bir gen (RBCL) tarafından kodlanan sekiz büyük alt ünite ve nukleus multi-gen ailesi (RBCS) tarafından kodlanan sekiz küçük alt ünitelerden oluşur. Rubisco sentezindeki değişimler çeşitli iç ve dış sinyallere cevap olarak RBCL ve RBCS transkript miktarlarındaki değişimlerle açıklanabilir (Chen vd., 2011).

Stres altındaki bitkilerde fotosentetik fizyolojinin cevabının ve ilgili gen ifadesinin iyice anlaşılması bitkilerin strese dayanıklılık mekanizması geliştirilmesine ve iklim değişikliklerinin kültür bitkilerindeki olumsuz etkilerinin sınırlandırılmasına yardımcı olabilir (Zhu, 2016). Birçok çalışmada stresin elektron taşınım sistemi, fotosistemler, pigmentler, fotosentezle ilgili enzim aktiviteleri, gen ifadesi, gaz değişimleri ve klorofil fluoresansı üzerine etkileri bitkilerde kaydedilmiştir (Li vd., 2009; Song vd., 2014). Calvin döngüsünde fonksiyonu olan bazı genlerin sıcaklık gibi abiyotik stres şartlarında farklı şekilde ifade edildiği, rubuloz bifosfat karboksilaz/oksijenaz aktivaz (*Rca*)'ın önemli derecede up-regüle edildiği diğerlerinin ise down-regüle edildiği bildirilmiştir (Song vd., 2014). Ozon stresine maruz bırakılan mısır fidelerinde ise pigmentlerin ve C4-fosfoenolpirüvat karboksilaz (C4-PEPc)'yi kodlayan transkriptlerinin azaldığı, ribuloz 1,5 bifosfat karboksilaz/oksijenaz küçük ve PEPc proteinlerinin daha az azaldığı tespit edilmiştir (Leitao vd., 2007).

1.9. Alfa Lipoik Asit

Alfa-lipoik asit (ALA; tiotik asit, 1,2 ditiyolan-3 pentanoik asit), iki sülfür molekülü bulundurması sayesinde canlıları oksidatif stresten korumada etkilidir. ALA çeşitli ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde mevcuttur. Trikarboksilik asit döngüsü

reaksiyonlarında görevli pirüvat dehidrogenaz kompleksi (PDC) ve 2-oksoglutarat dehidrogenaz kompleksi (OGDC) ile lösin, izolösin ve valin amino asitlerinin metabolizmasını kataliz eden dallanmış zincirli α -ketoasit dehidrogenaz kompleksi gibi bazı multienzim kompleksleri için gerekli bir kofaktördür (Yasuno ve Wada, 1998; Gueguen vd., 2000). Dolayısıyla, ALA bitkilerde solunum ve dolaylı olarak karbondioksit fiksasyonu ve azot asimilasyonunda rol oynaması bakımından önemlidir (Taylor vd., 2004). ALA suda veya yağda çalışan diğer antioksidanların aksine hem suda hem de yağda çalışabilmektedir. Ayrıca diğer antioksidan maddelerden farklı olarak hem indirgenmiş (dihidrolipoik asit, DHLA) hem de yükseltgenmiş (lipoik asit) formda antioksidan özelliğini güçlü bir şekilde koruyabilmektedir (Navari-Izzo ve Quartacci, 2001). ALA ve DHLA güçlü bir antioksidan olarak dört farklı role sahiptir. Bunlardan biri, süperoksit, hidroksil radikali, peroksil radikali ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerini temizlemeleridir (Packer vd., 1995). İkinci rolü, organizma stres şartlarında glutatyon, askorbat, tokoferol, vitamin C ve vitamin E gibi antioksidanları kullandığında, yan ürünlerden antioksidanları tekrar oluşturabilmeleridir (Packer vd., 1997; Navari-Izzo ve Quartacci, 2001). ALA ve DHLA'nın üçüncü rolü metaller ile şelat oluşturma kapasitesine sahip olmalarıdır. Dördüncü rolü ise okside olmuş proteinleri bile tekrar eski hallerine dönüştürebilmeleridir (Navari-Izzo Ve Quartacci, 2001; Navari-Izzo vd., 2002). Böylece, ALA diğer antioksidanlardan çok daha farklı ve üstün bir özelliğe sahiptir. ALA insanda şeker hastalığı, katarak oluşumu, HIV aktivasyonu, sinir tahribatı ve radyasyon hasarı gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Packer vd., 1995). Kuraklık, aşırı bakır ve tuzluluk şartlarında lipoik asitin özel bir önemi olduğu bilinmektedir (Sgherri vd., 1993; Sgherri vd., 2002; Sgherri vd., 2007; Pe´rez-Lo´pez vd., 2010). Bununla beraber, bitkilerde dıştan uygulanan ALA'nın stres hasarlarını gidermesine yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır.

1.10. Mısır Hakkında Genel Bilgiler

Mısır, Poaceae familyasına ait monokotiledon bir bitkidir. Poaceae familyası içerisinde çiçeklenme biçimi bakımından diğer türlerden farklıdır. Çiçekleri monoik yapıda olup, erkek (tepe püskülü) ve dişi çiçekler (koçan) aynı bitki üzerinde fakat farklı yerlerde bulunmaktadır. Mısır, $2n=20$ kromozomlu olup diploid bir bitkidir. Mısır, geniş adaptasyon kabiliyeti nedeniyle Dünya'nın farklı bölgelerinde kültürü yapılabilmektedir.

50° kuzey enleminden 50° güney enlemlerine, deniz seviyesi ile 3000 m'ye kadar olan yüksekliklerde ve ayrıca birçok toprak tipinde tarımı yapılabilmektedir (Morris, 2002).

Mısır, geniş bir kullanım alanı olması nedeni ile diğer tahıllara göre oldukça farklı bir konuma sahiptir. İçerdiği zengin besin maddeleri ile mısır, hem insan hem de hayvan beslenmesinde kullanılabilir. Hayvan beslenmesinde yem hammaddesi olarak kullanılan mısır, insan beslenmesinde ise doğrudan kullanımının yanı sıra birçok gıda maddesinin üretiminde hammadde olarak kullanılmaktadır. Mısır danesinin yapısında ticari değere sahip birçok kimyasal bileşik vardır. Olgun bir danede % 70-75 nişasta, % 8-10 protein ve % 4-5 yağ içerir (Earle vd., 1946). Mısır, nişasta protein ve yağ kaynağı olarak kullanılmasının dışında diğer birçok kullanım alanları (glikoz; içeceklerde ve reçel yapımında, etanol; biodizel yakıt, plastik yapımında ve bunun gibi) ile de dikkat çekmektedir. Birçok kullanım alanı nedeniyle bugün; koçan uzunluğu ve şekli, tane büyüklüğü ve şekli, dane rengi, yapısı, aroması ve lezzeti, pişirim kalitesi, endospermi, yağ, protein ve nişasta içeriği gibi birçok farklı özelliklere sahip farklı mısır çeşitleri yetiştirilmektedir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitkilerin Büyütülmesi ve Alfa Lipoik Asit Uygulanması

Mısır (*Zea mays* L.) tohumları “Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nden” temin edildi.

Yüzey sterilizasyonu yapılan 10’ar adet tohum, çift katlı ıslak filtre kağıdı içeren petri kaplarında çimlendirildi. Işık yoğunluğu ($400-430 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), sıcaklık ($18-20 \text{ }^\circ\text{C}$) ve nem (% 50-70) kontrollü büyüme odasında, çimlenmeden bir hafta sonra, fideler Hoagland besin solüsyonu içeren plastik saksılara aktarıldı (Epstein, 1972). Aktarmadan 1 hafta sonra, iki haftalık olan fideler, % 20 polietilenglikol (PEG6000) içeren -0.6 MPa’lık kuraklık stresine 24 saat maruz bırakıldı. % 20 PEG içermeyen grup kontrol grubu olarak düzenlendi.

Farklı konsantrasyonlarda (2,5, 12, 24 ve 50 μM) hazırlanan ALA kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerin bulunduğu Hoagland Besin Solüsyonu içerine uygulandı. Her bir uygulama için en az dört saksı, dört tekrarlı olacak şekilde düzenlendi. ALA uygulama şeklinin belirlenmesi için aşağıda belirtilen analizler yapıldı ve elde edilen bulgulara göre en etkili ALA konsantrasyonu belirlendi. Belirlenen konsantrasyon kullanılarak yukarıdaki gibi büyütülen bitkilere stressiz şartlarda ALA uygulamasının yapıldığı ek bir deney grubu ilave edildi. Böylece aşağıdaki şekilde dört farklı deney grubu oluşturuldu:

- Hoagland besin solüsyonu
- Hoagland besin solüsyonu + PEG
- Hoagland besin solüsyonu + ALA
- Hoagland besin solüsyonu + PEG + ALA

2.2. ALA Uygulama Şeklinin Belirlenmesi için Yapılan Ölçümler

2.2.1. Su Durumu

ALA uygulamasının su durumu üzerine etkisini belirlemek için nispi su içeriği (NSİ) ölçümleri gerçekleştirildi. Bitki yapraklarından numuneler alındı ve nispi su içeriği tayini Castillo (1996)'a göre yapıldı. Bitkilerin yaprakların taze ağırlıkları ölçüldükten sonra gece boyunca suda bekletilerek turgid ağırlıkları alındı. Daha sonra 80°C'ye ayarlı fırında bekletilerek kuru ağırlıkları kaydedildi ve aşağıdaki formülde yerine koyularak nispi su içerikleri (NSİ) belirlendi.

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

2.2.2. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyon seviyesi, lipid peroksidasyonun bir ürünü olan malondialdehid içeriğine dayanarak Heath ve Packer (1968), metodunu takiben ölçüldü. Ekstraksiyon % 0.1 trikloro asetik asit (TCA) içerisinde yapıldı. Homojenat 15 000 x g de 5 dak santrifüj edildi. Süpernatantın 1 ml'sine 4 ml, % 20 TCA içerisinde hazırlanmış % 0,5 tiobarbutirik asit (TBA) ilave edildikten sonra, süpernatantın absorbansı 532 nm de kaydedildi. 600 nm de spesifik olmayan absorpsiyon için okunan değer hesaptan çıkarıldı. Elde edilen sonuç formülde (A = E.c.1) yerine konularak malondialdehit (MDA) konsantrasyonu hesaplandı. Lipid peroksidasyonu verileri, PRO muamelelerinin membranları koruyup korumadığını belirlemek amacı ile ölçüldü.

2.2.3. Klorofil İçeriği

Klorofil a ve b miktarı, Arnon (1949) metoduna göre belirlendi Kesilmiş taze yapraklar iyice parçalandı ve gece boyunca % 80 asetonda -10°C'de bekletildi. Ekstrakt 14000 g'de 5 dak santrifüj edildi ve süpernatantın absorbansı 480, 645 ve 663 nm'de ölçüldü.

2.2.4. Gaz Değişim Parametreleri

Net CO₂ asimilasyon oranı (A), transpirasyon (E), sub-stomatal iletkenlik (C_i) ve stomatal iletkenlik (g_s) gibi gaz değişim parametrelerini ölçmek için fotosentez sistemi (LI 6400-XT Licor, Lincoln, USA) kullanılarak 20±2 °C sıcaklıkta ölçüldü. Çember içerisindeki fotosentetik foton akış yoğunluğu, hava akış yoğunluğu ve nispi nem sırasıyla 1000 µmol m⁻²s⁻¹, 500 µmol s⁻¹ ve %50-60 olarak ayarlandı. Cihazla bütünleşik bir CO₂ karıştırıcısı sayesinde CO₂ konsantrasyonu kontrol altında tutuldu. Yaprak sisteme yerleştirildikten sonra, CO₂ konsantrasyonu 400 µmol CO₂ mol⁻¹ değerine ulaşana kadar en az 30 dakika CO₂ değerleri alındı. Ölçümler yaklaşık üç saat içinde tamamlandı.

2.3. Klorofil Floresans Analizleri

Yaprakların klorofil floresans değerleri ticari olarak geliştirilmiş bir fluorometre sistemi ile Genty vd., (1989)'a göre elde edildi. Bu sistem ile PSII deki aşırı yüklenmenin ısı ile dağıtılması sonucu klorofil floresansının ne oranda azaldığını ifade eden fotokimyasal olmayan sönme (NPQ), fotokimyasal sönme (qP), PSII nin maksimum kuantum etkinliği (F_v/F_m), PS II fotokimyasal kuantum verimi (Φ_{PSII}) ve elektron transfer hızı (ETR) gibi parametreler ölçüldü. Böylece ALA uygulamasının PSII'nin fotokimyasal etkinliğini nasıl değiştirdiği konusunda değerlendirmeler yapıldı.

2.4. Karbondioksit Fiksasyon Enzimlerinin Gen İfade Seviyelerinin Belirlenmesi

Karbondioksit fiksasyonuna karışan rubisco, fosfoenolpirüvat karboksilaz ve rubisco aktivaz enzimlerini kodlayan genlerin ifade seviyelerindeki değişimler real time PCR yöntemiyle belirlendi.

2.4.1. *Rubisco*, *PEPc* ve *Rca* Gen İfade Seviyelerinin Belirlenmesi

2.4.1.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Oluşturulması

Toplam RNA izolasyonu için taze ya da -80°C 'de saklanan numunelerden 0,1 g kullanıldı. Sıvı azot ile dondurulan örnekler, doku homojenizatörü ile parçalandıktan sonra Toplam RNA İzolasyon kiti (Quiagen RNeasy Plant Mini Kiti (Cat. No: 74904) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA örneklerinin miktarı ve saflığı nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, Nanodrop 2000, Amerika) ile ölçüldü. Miktarı ve saflığı belirlenen toplam RNA örnekleri cDNA eldesi için -80°C 'de saklandı.

İzole edilen toplam RNA örneklerinden grup başına 2000 ng olacak şekilde cDNA eldesi gerçekleştirildi. cDNA sentezi için Applied marka (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 4368814, Applied Biosystems) cDNA sentez kiti kullanıldı. Sentezlenen cDNA'lar Real Time PCR analizleri gerçekleştirilene kadar -20°C 'de saklandı.

2.4.1.2. Kantitatif Real-Time PCR Ölçümü

Elde edilen cDNA'lar, gen ifadelerinin belirlenmesi için Real Time PCR analizlerinde kullanıldı. Analizler için 5x HOT FIREPol Eva Green qPCR Supermix (08-36-00008, Solis Biodyne) ve CFX Connect Real Time PCR System (BioRad) cihazı kullanıldı. RT-PCR işlem basamakları ise Solis Biodyne talimatları modifiye edilerek; 95°C 'de 12 dakika, 95°C 'de 15 saniye 45 döngü, 60°C 'de 30 saniye, 72°C 'de 30 saniye, melt curve için 65°C 'den 95°C 'ye 0.5°C 'lik artışlarla olacak şekilde gerçekleştirildi. Her biyolojik tekerrür 3 teknik tekerrür şeklinde analiz edilerek ve ortalama teknik hata $0,5(\pm 1)$ Cq values olacak şekilde kabul edildi. İşlem basamakları Tablo 1'de verildi. Karbondioksit fiksasyonunda fonksiyonu olan *rubisco-SSU*, *rubisco-LSU*, *PEPc* ve *Rca* genlerinin anlatım düzeylerini incelemek için söz konusu genlere özgü primerler ile referans olarak *AKTIN 1* genine ait primer kullanıldı (Tablo 2). Real Time PCR kullanılarak eş zamanlı olarak ALA uygulamasından sonra gen ifadesi seviyesindeki değişimler takip edildi. Elde edilen bulgular Aktin genine göre normalize edilerek nispi gen ifadesi şeklinde ifade edildi.

Tablo 1. *Rubisco*, *PEPc* ve *Rca* gen ifade seviyeleri için RT-PCR işlem basamakları

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Aktivasyonu	95°C	12 dk	1
Denaturasyon	95°C	15 sn	44
Bağlanma	60°C	30 sn	
Uzama	72	30 sn	
Plate Okuma	-	-	
Melt Curve Analizi	65 -95°C'ler arası 0,5°C'lik artışlar 5 sn aralıklarla plate okuma		-

Tablo 2. Genlere özgü primer sekansları

Erişim no	Primer adı	Sekans
X 15238	PEPc, forward PEPc, reverse	5'- AGCCTTCAGAACCGATGAAATC -3' 5'- CATCCCATAGCGCATTTCG -3'
D 00170	Rubisco-SSU, forward Rubisco-SSU, reverse	5'-ATGTGGAAGCTGCCCATGTT- 3' 5'-GCCTCCTGCAGCTCCTTGTA- 3'
Z 11973	Rubisco-LSU, forward Rubisco-LSU, reverse	5'-AAAGCCTTACGCGCTCTACGT- 3' 5'- CGGACCTTGGAAAGTTTTTGAA-3'
AF 084478	Rca, forward Rca, reverse	5'-CTTCATGACCCTGCCAAACA- 3' 5'-GATTTTCCCTGGCCTTTGC-3'
XM_00864 6181.1	Mg-CHLI, forward Mg-CHLI, reverse	5'-TGTATGCTGCTCGAGTTGCA-3' 5'-CTTGCTGCTGATCCTGTGGA-3'
NCBI Reference Sequence: NM_001137311.1	Klorofilaz, forward Klorofilaz, reverse	5'- ACACCACCGAGGAGATCAAC -3' 5'- GTCCAGCTCGTCGTAGAAGG -3'
J 01238	Aktin, forward Aktin, reverse	5'- GATGGTCAGGTCATCACCATTG-3' 5'- AACAAGGGATGGTTGGAACAAC-3'

2.5. Klorofil Sentez ve Degredasyon Enzimlerinin Gen İfade Seviyelerinin Belirlenmesi

Klorofil sentezinde anahtar rol oynayan enzimlerden biri olan magnezyum şelataz (Mg-CHLI) ile klorofilin parçalanmasına karışan klorofilaz enzimini kodlayan genin ifade seviyelerindeki değişimler belirlendi.

2.5.1. Magnezyum Şelataz ve Klorofilaz Gen İfade Seviyelerinin Belirlenmesi

Magnezyum şelataz (Mg-CHLI) ve klorofilaz gen ifade seviyelerinin belirlenmesi için RNA izolasyonu ve cDNA oluşturulması Lıvak ve Schmittgen (2001)'e göre gerçekleştirildi. Quantitative real-time PCR ölçümü için kontrol olarak yine Aktin primerleri kullanılırken söz konusu genlere özgü Tablo 2'de gösterilen primerler kullanılarak uygulamadan sonra ekspresyon seviyelerindeki değişim takip edildi.

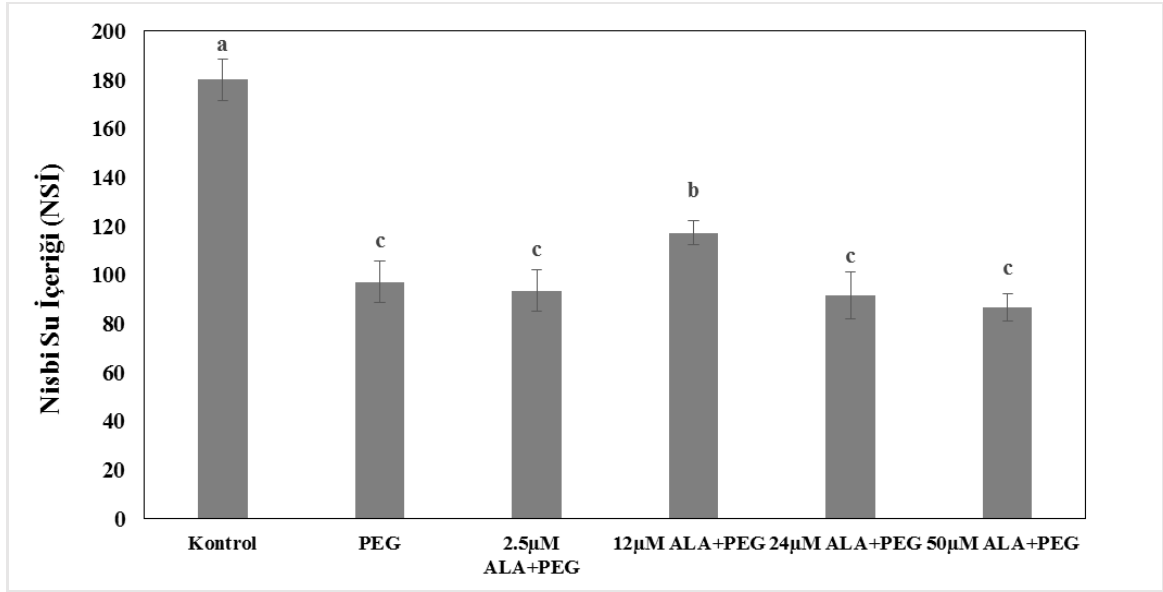
2.6. İstatistik Analizler

Stres uygulamaları arasındaki farklar SPSS istatistik programı kullanılarak test edildi. Altı tekrarlı bağımsız verilerin varyans analizi ANOVA kullanarak yapıldı ve LSD testi ile karşılaştırıldı.

3. BULGULAR

3.1. ALA Uygulamasının Nispi Su İçeriği Üzerine Etkisi

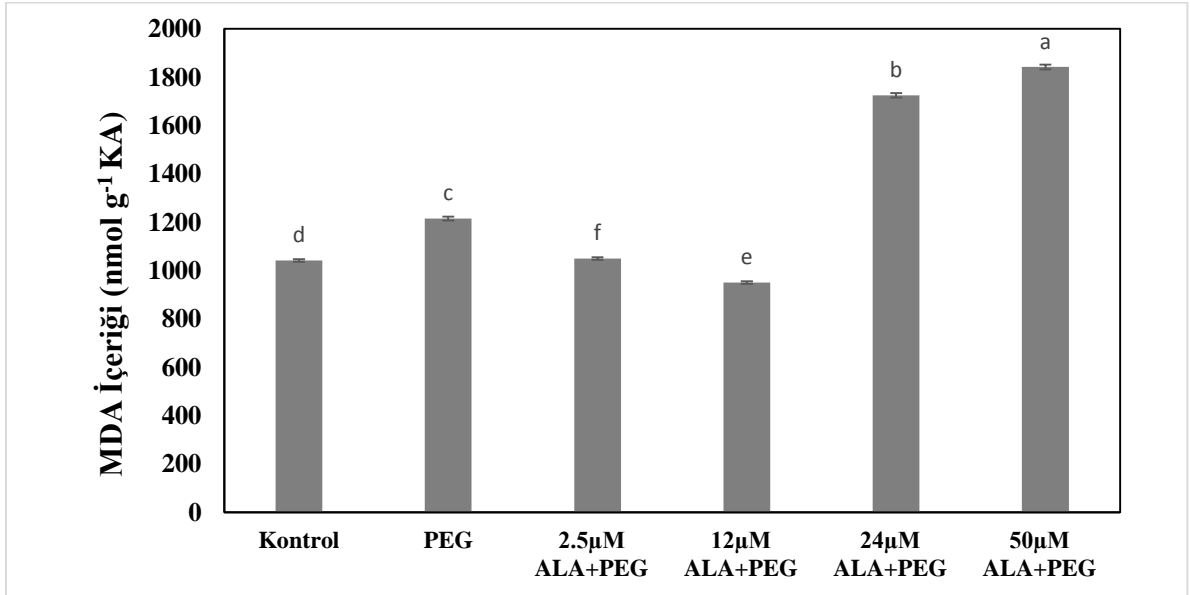
Kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerde nispi su içeriğinin azaldığı belirlendi. Stres şartlarında 12 μ M konsantrasyonda uygulanan ALA'nın NSİ değerindeki azalışı hafiflettiği saptandı. Diğer konsantrasyonların (2,5, 24, 50 μ M) nispi su içeriği üzerine istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 2).



Şekil 2. ALA uygulamasının nispi su içeriği (NSİ) üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, tüm uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.2. ALA Uygulamasının MDA İçeriği Üzerine Etkisi

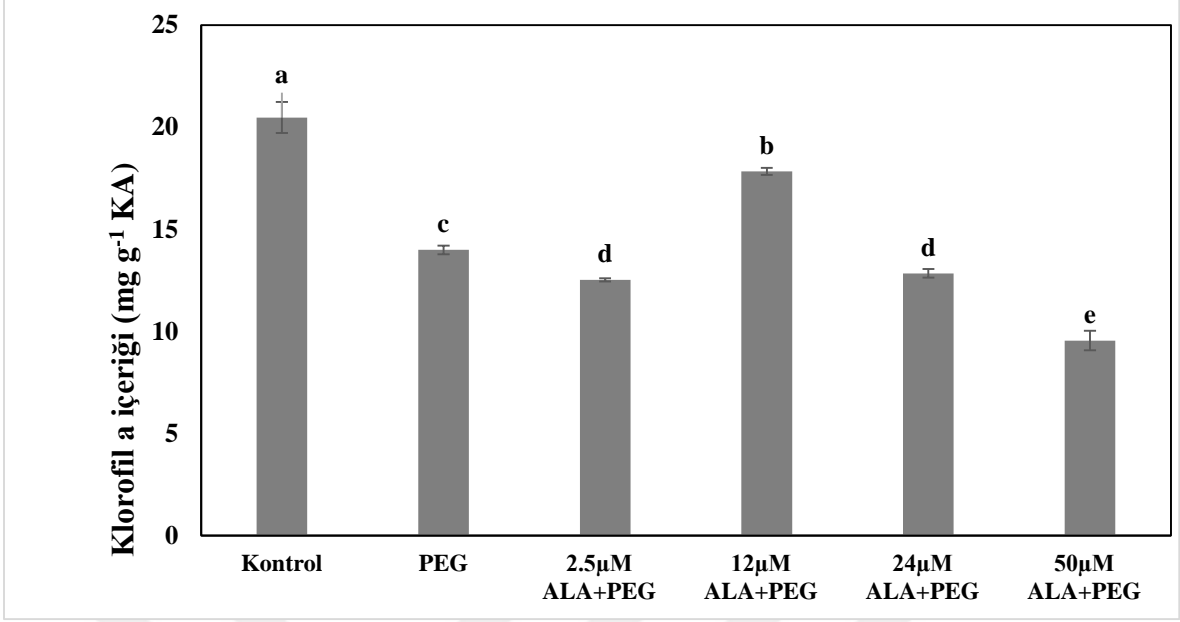
Stres şartlarında bitkilerde membran hasarının arttığı görüldü. Yüksek konsantrasyonlarda (24 ve 50 μM) uygulanan ALA'nın membran hasarını stres uygulanan bitkilere göre daha fazla artırdığı belirlendi. Aksine düşük konsantrasyonlarda (2,5 ve 12 μM) uygulanan ALA'nın MDA içeriğini kontrole (PEG) göre azalttığı ve bu azalışın 12 μM konsantrasyonda daha da fazla olduğu tespit edildi (Şekil 3).



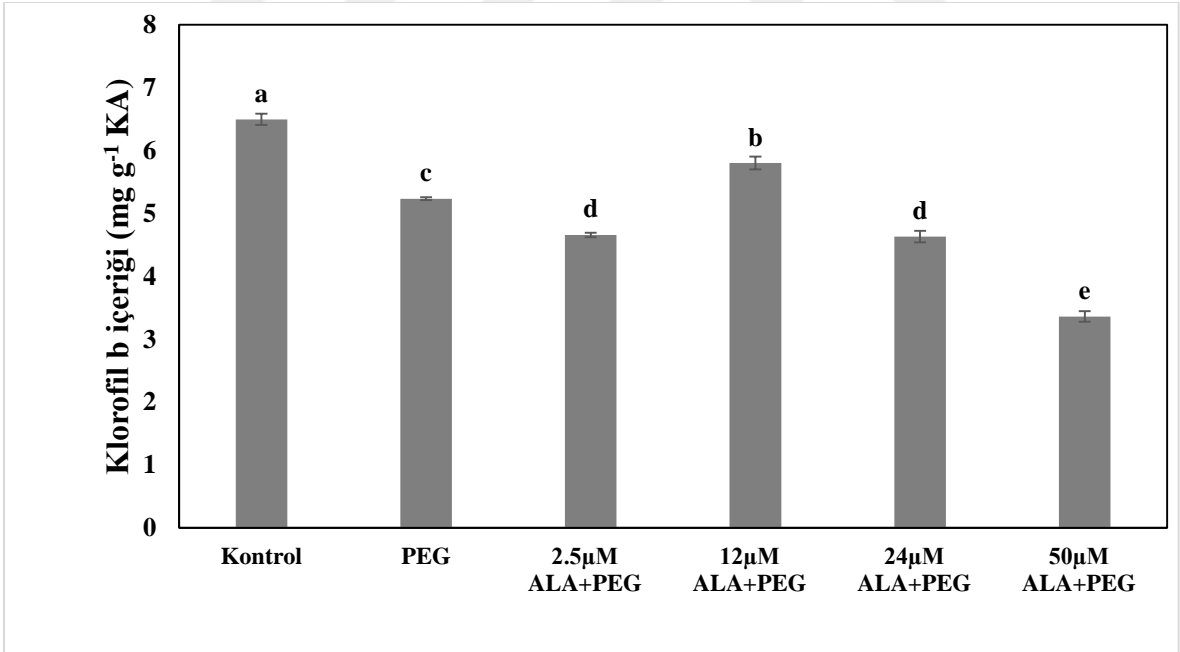
Şekil 3. ALA uygulamasının MDA içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, tüm uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.3. ALA Uygulamasının Klorofil İçeriği Üzerine Etkisi

Mısır fidelerinde stres şartlarında klorofil a ve klorofil b içeriğinin önemli seviyede azaldığı gözlemlendi. Yüksek ve düşük konsantrasyonlarda uygulanan ALA'nın pigment içeriği üzerine olumsuz etki yaptığı ve klorofil a ve klorofil b içeriğini daha da azalttığı belirlendi. Aksine stres şartlarında 12 μM konsantrasyonda uygulanan ALA'nın klorofil a ve klorofil b içeriğini kontrole (PEG) göre artırdığı belirlendi (Şekil 4, 5).



Şekil 4. ALA uygulamasının klorofil a içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, tüm uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

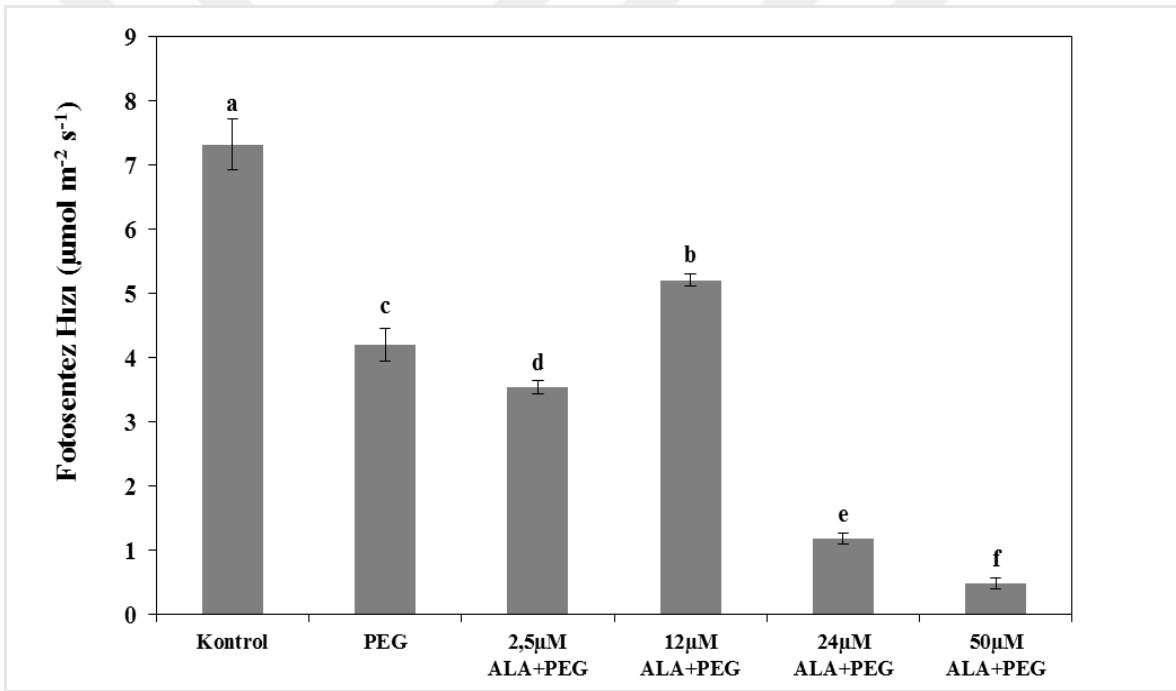


Şekil 5. ALA uygulamasının klorofil b içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, tüm uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.4. ALA Uygulamasının Gaz Değişim Parametreleri Üzerine Etkisi

3.4.1. Fotosentez Hızı

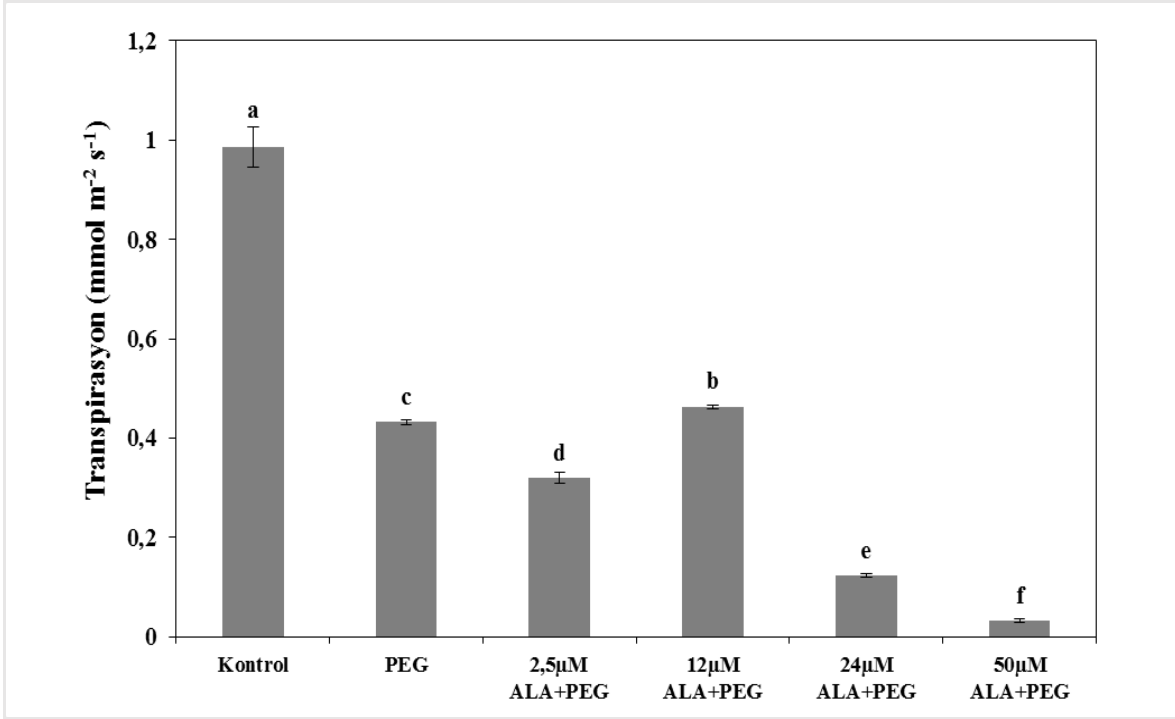
Farklı konsantrasyonlarda ALA uygulamaları üzerine yapılan çalışmalarda özellikle yüksek ve düşük konsantrasyonlarda uygulanan ALA'nın fotosentez hızını olumsuz etkilediği belirlendi. Bununla beraber 12 μM konsantrasyonda uygulanan ALA'nın stres şartlarında kontrole göre azalan fotosentez hızını istatistik olarak önemli seviyede iyileştirdiği görüldü (Şekil 6).



Şekil 6. ALA uygulamasının net CO₂ asimilasyon oranı (A) üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, tüm uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.4.2. Transpirasyon

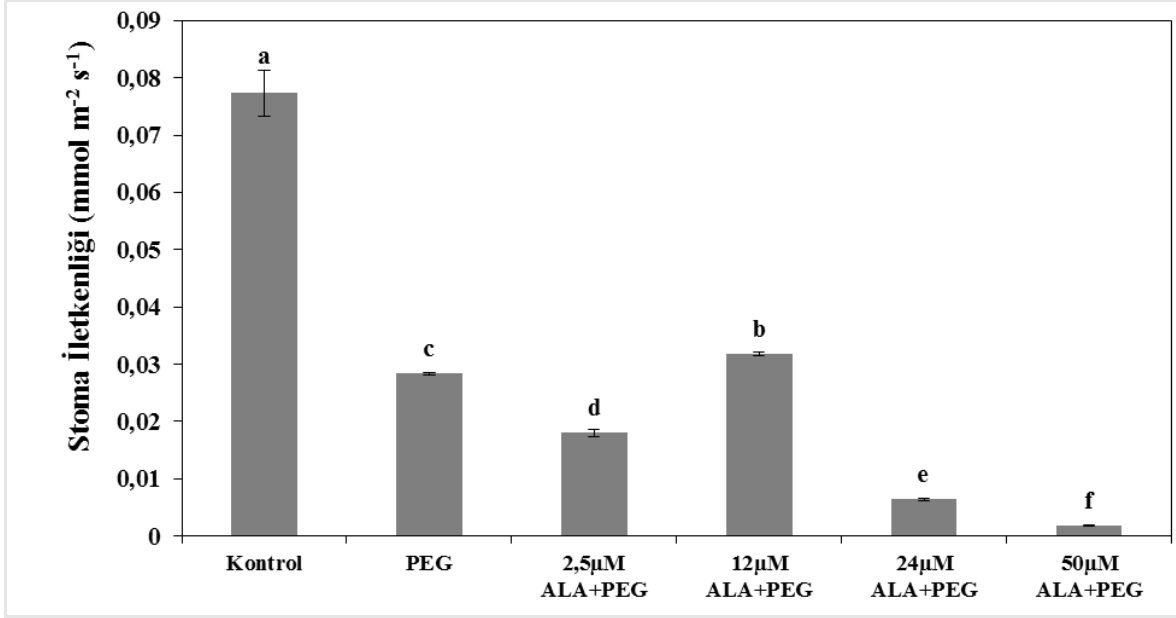
Strese maruz kalan bitkilerde transpirasyonun azaldığı, yüksek konsantrasyonlarda uygulanan ALA'nın transpirasyondaki azalışı daha da artırdığı saptandı. Aksine, 12 μM ALA'nın transpirasyondaki azalışı hafiflettiği yönünde veriler elde edildi (Şekil 7).



Şekil 7. ALA uygulamasının transpirasyon (E) üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, tüm uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.4.3. Stoma İletkenliği

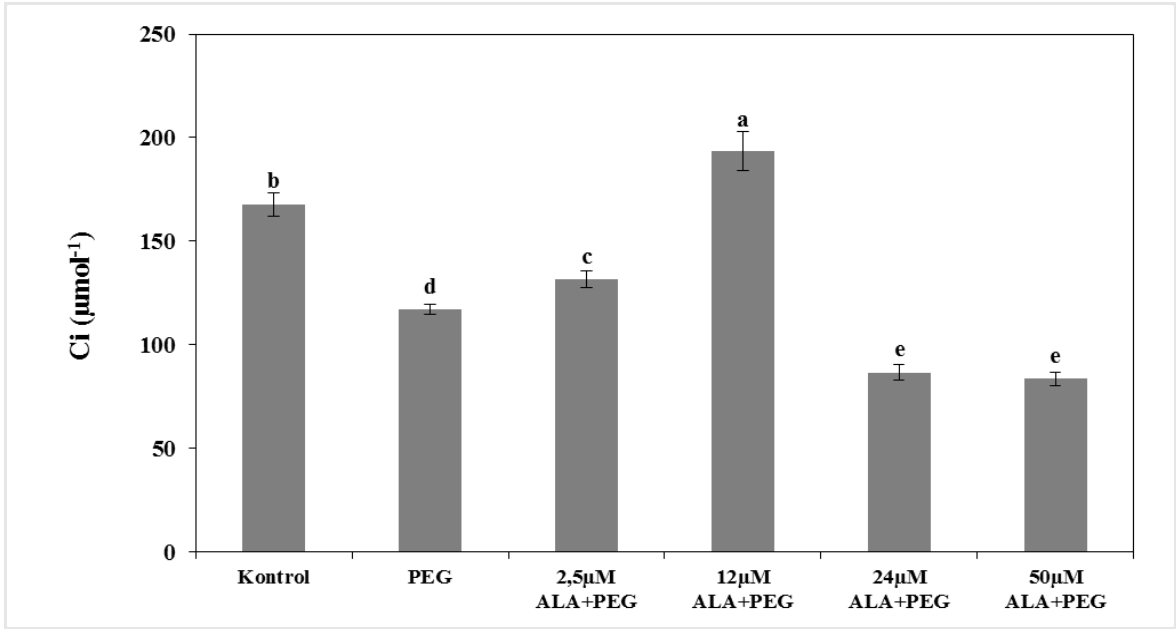
Stres şartlarında stoma iletkenliğinin azaldığı, yüksek konsantrasyonlarda uygulanan ALA'nın transpirasyondaki azalışı daha da artırdığı saptandı. Aksine, 12 μM ALA'nın stres şartlarında azalan transpirasyonu artırdığı belirlendi (Şekil 8).



Şekil 8. ALA uygulamasının stomata iletkenliği (gs) üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, tüm uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.4.4. Sub-stomatal İletkenlik

Diğer gaz değişim parametreleri bulgularına benzer şekilde stres şartlarında sub-stomatal iletkenliğin azaldığı, yüksek konsantrasyonlarda uygulanan ALA'nın C_i değerini daha da azalttığı belirlendi. Aksine, 2,5 μM ALA'nın C_i 'deki azalışı giderdiği, 12 μM ALA'nın ise C_i değerini kontrol bitkilerine göre daha da artırdığı tespit edildi (Şekil 9).



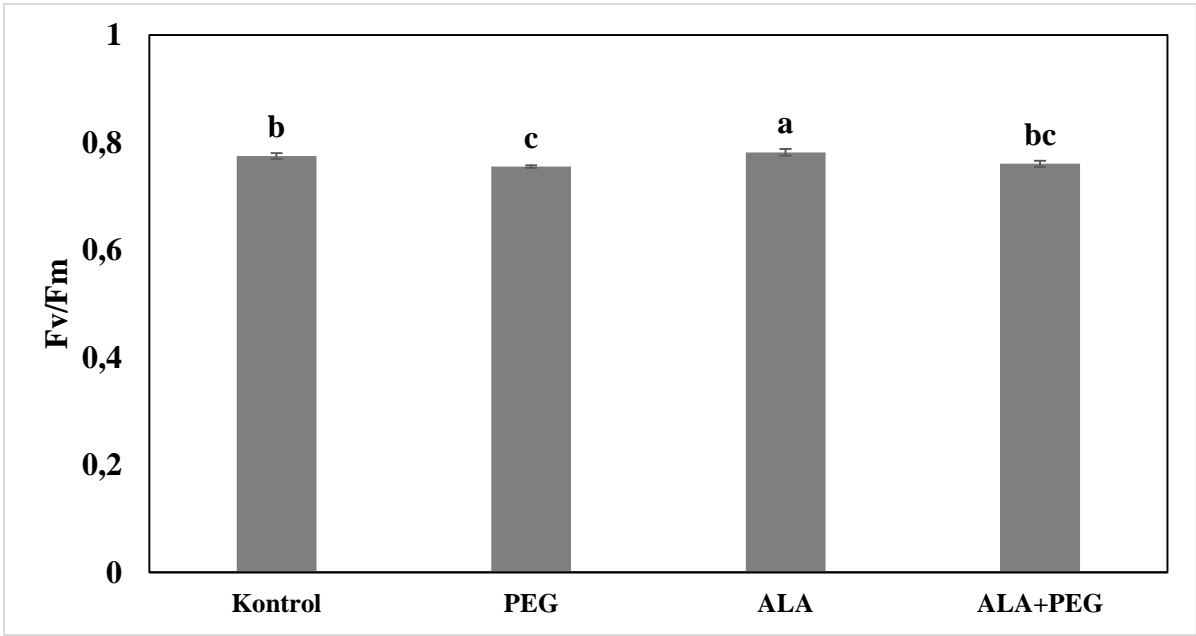
Şekil 9. ALA uygulamasının sub-stomatal iletkenlik (C_i) üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir ($n=3$). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, tüm uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.5. ALA Uygulamasının Klorofil Floresans Parametreleri Üzerine Etkisi

Yapılan konsantrasyon belirleme çalışmalarından elde edilen veriler ışığında kontrol, PEG, 12 μM ALA ve 12 μM ALA+PEG grubu bitkilerinde klorofil floresans parametrelerinin PS II maksimum kuantum etkinliği (F_v/F_m), PS II fotokimyasal kuantum verimi (Φ_{PSII}), elektron transfer hızı (ETR), fotokimyasal olmayan sönme (NPQ) ve fotokimyasal sönme (qP) stres uygulamasından 24 saat sonra ölçüldü.

3.5.1. PSII'nin Maksimum Kuantum Etkinliği (F_v/F_m)

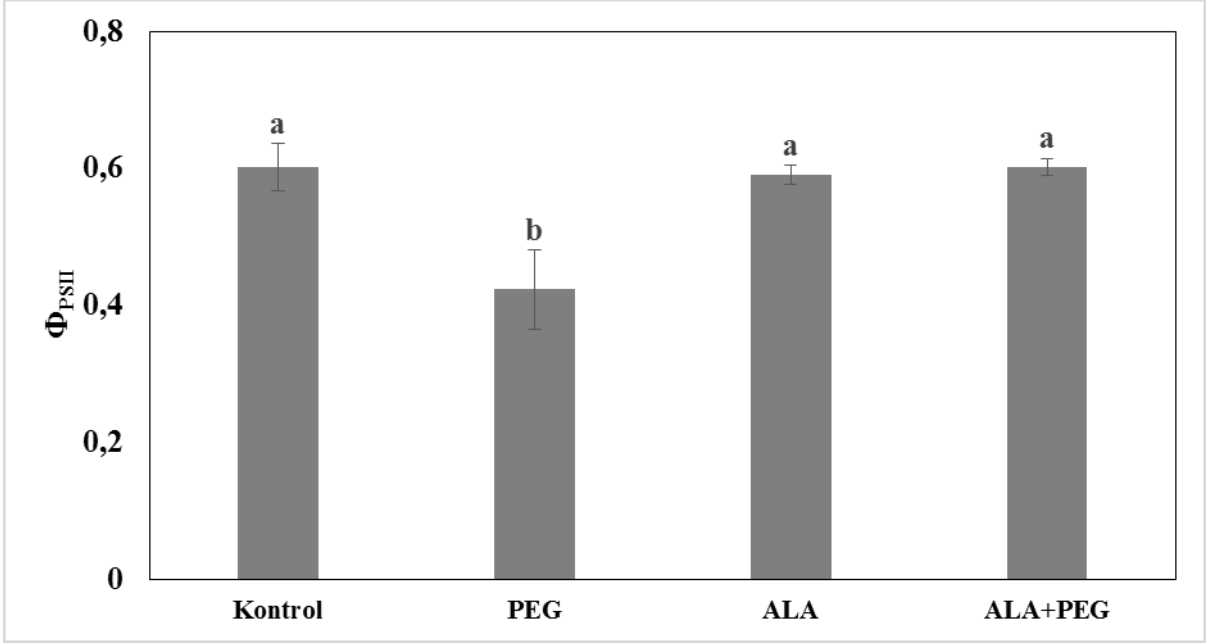
Hem stresli hem de stressiz durumlarda ALA uygulanmış bitkilerde, F_v/F_m değerinde bir artışın olduğu görüldü (Şekil 10). ALA+PEG grubu PEG grubu ile karşılaştırıldığında PS II fotokimyasal kuantum veriminde bir artış eğiliminin olduğu kaydedildi (Şekil 10).



Şekil 10. ALA uygulamasının PSII'nin maksimum kuantum etkinliği (F_v/F_m) üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, her bir zaman diliminde uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.5.2. PS II Fotokimyasal Kuantum Verimi (Φ_{PSII})

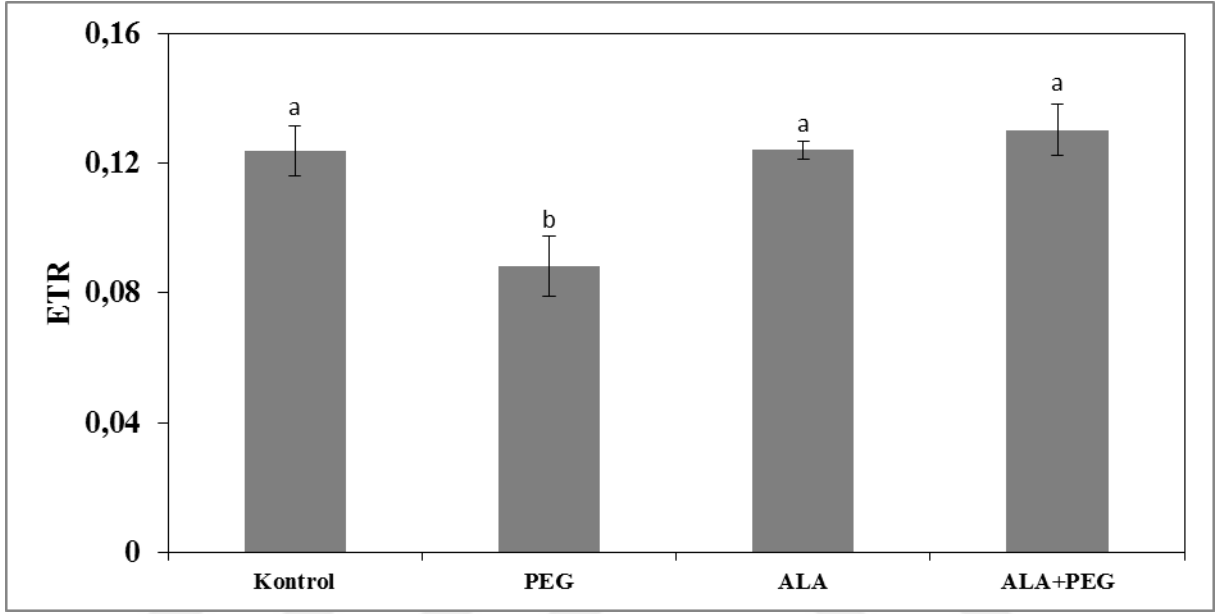
Kuraklık stresinde azalan Φ_{PSII} değerinin ALA uygulaması ile arttığı ve kontrol seviyesine ulaştığı tespit edildi. Stressiz şartlarda uygulanan ALA ise verimi önemli derecede etkilemedi (şekil 11).



şekil 11. ALA uygulamasının PS II fotokimyasal kuantum verimi (Φ_{PSII}) üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, uygulamalar arasındaki önemli farklılıkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.5.3. Elektron Transfer Hızı (ETR)

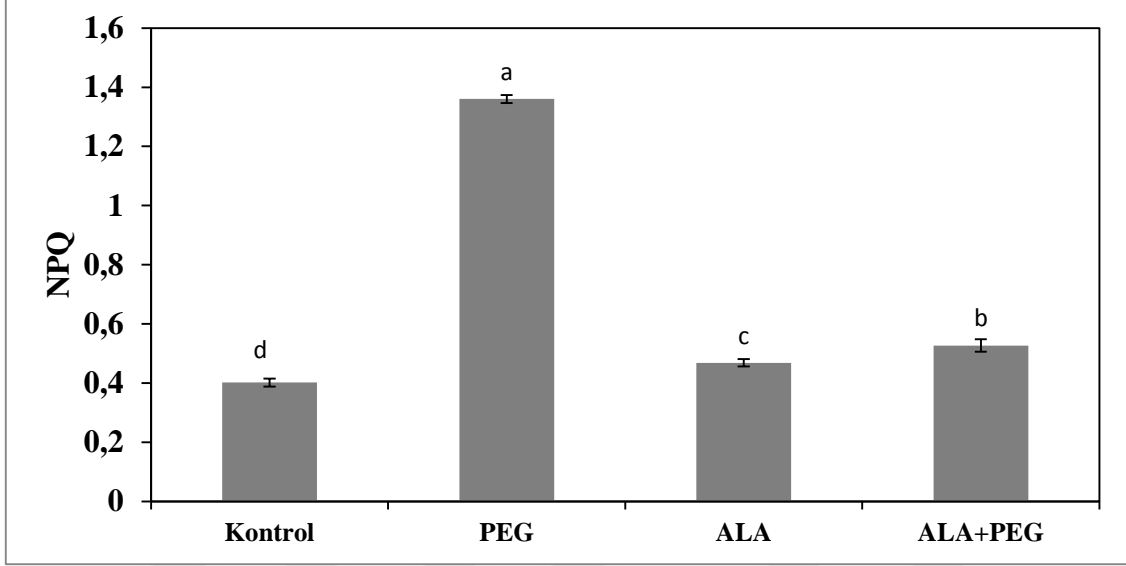
Stres durumunda Φ_{PSII} bulgularına benzer şekilde elektron transfer hızının azaldığı, stres şartlarında ALA uygulamasının ETR değerini uyardığı ancak stressiz şartlarda uygulanan ALA'nın ETR üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirlendi (Şekil 12).



Şekil 12. ALA uygulamasının elektron transfer hızı (ETR) üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.5.4. Fotokimyasal Olmayan Sönme (NPQ)

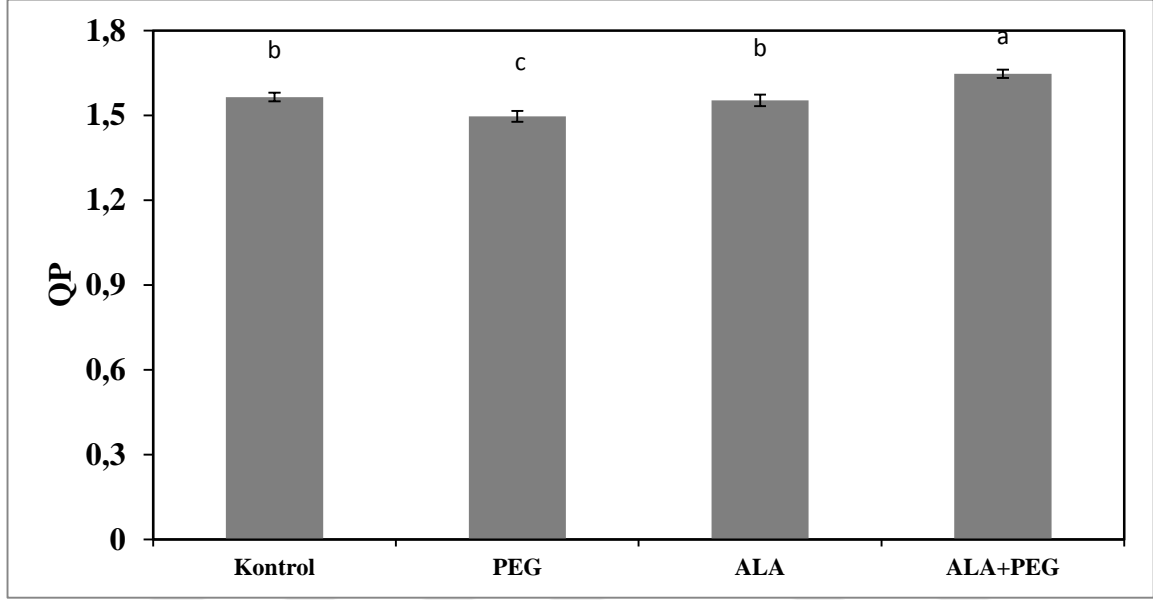
Kuraklık şartlarında NPQ değerinin arttığı ancak ALA uygulamasının bu artışı engellediği saptandı. Stresiz şartlarda uygulanan ALA'nın NPQ değerini artırdığı görüldü (Şekil 13).



Şekil 13. ALA uygulamasının fotokimyasal olmayan sönme (NPQ) üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.5.5. Fotokimyasal Sönme (qP)

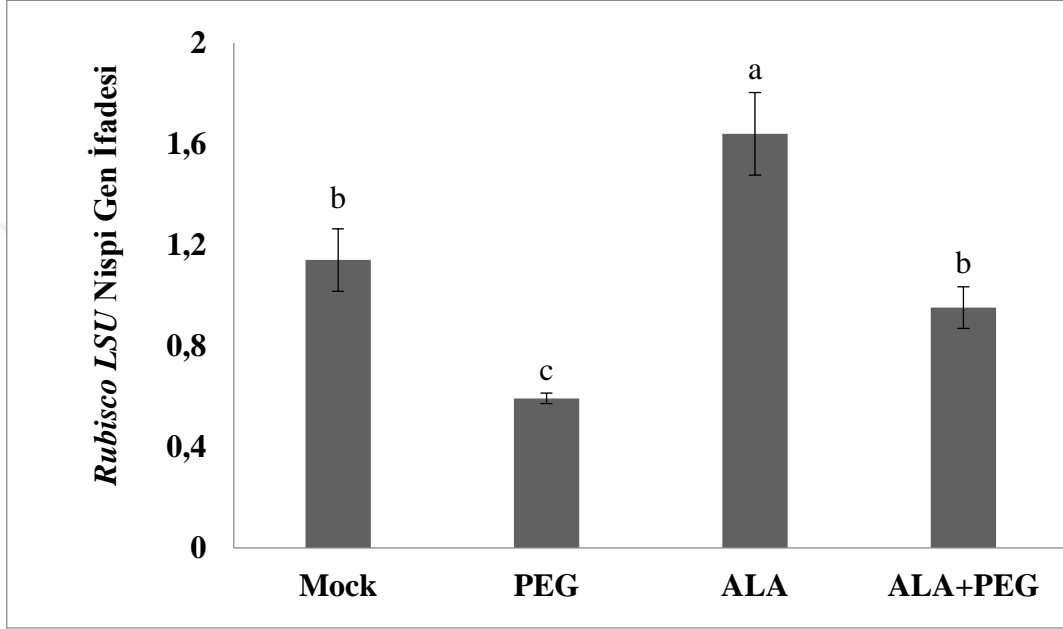
Kuraklık stresine maruz bırakılan fidelerde qP değerinin azaldığı gözlemlendi. Stressiz şartlarda ALA uygulamasının qP değerini etkilemediği, stresli şartlarda ALA uygulamasının ise qP değerini uyardığı tespit edildi (Şekil 14).



Şekil 14. ALA uygulamasının fotokimyasal sönme (qP) üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

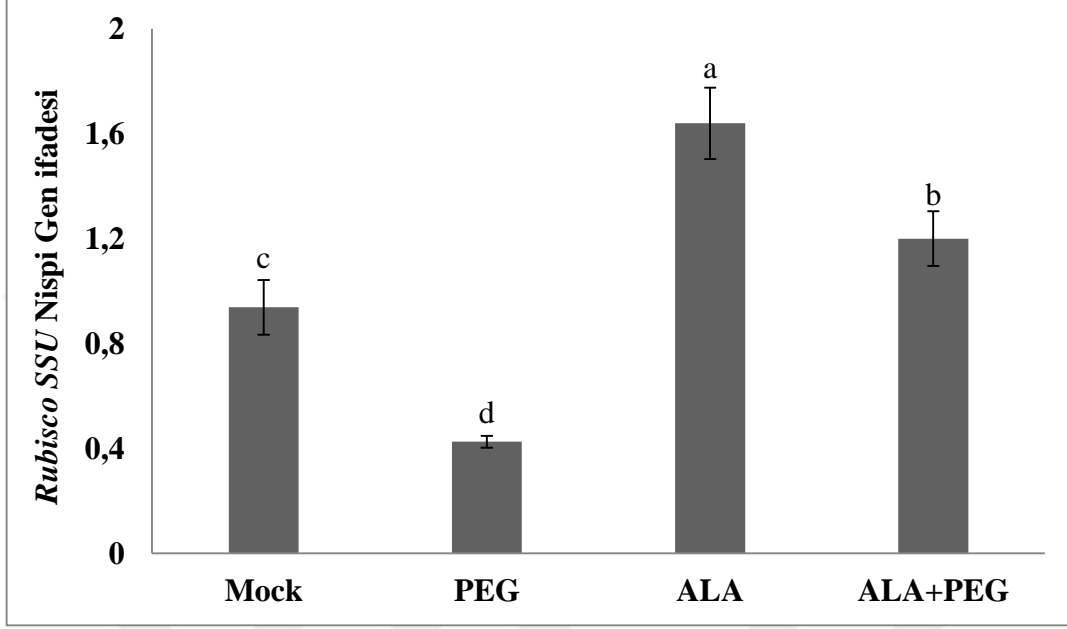
3.6. ALA Uygulamasının *Rubisco*, *PEPc* ve *Rca* Gen İfade Seviyeleri Üzerine Etkisi

Rubisco büyük alt ünitesinin (*rubisco LSU*) gen ifadesinin stres şartlarında azaldığı belirlendi. ALA uygulanmış bitkilerde ise hem stressiz hem de stresli şartlarda rubisco *LSU* nispi gen ifadesinin kontrollerine göre uyarıldığı görüldü (Şekil 15).



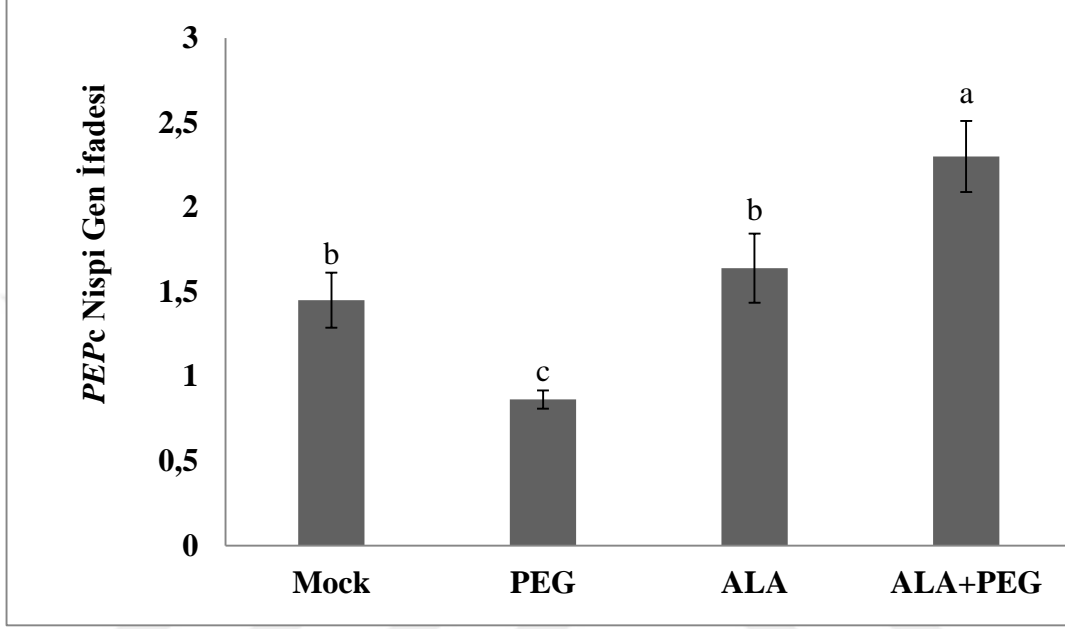
Şekil 15. ALA uygulamasının rubisco büyük alt ünitesinin gen ifadesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

Rubisco büyük alt ünitesinin gen ifadesi bulgularına benzer olarak rubisco küçük alt ünite (*rubisco SSU*) gen ifadesinin stres şartlarında azaldığı bulundu. ALA uygulanmış bitkilerde ise hem stressiz hem de stresli şartlarda rubisco *SSU* nispi gen ifadesinin kontrollerine göre uyarıldığı görüldü (Şekil 16).



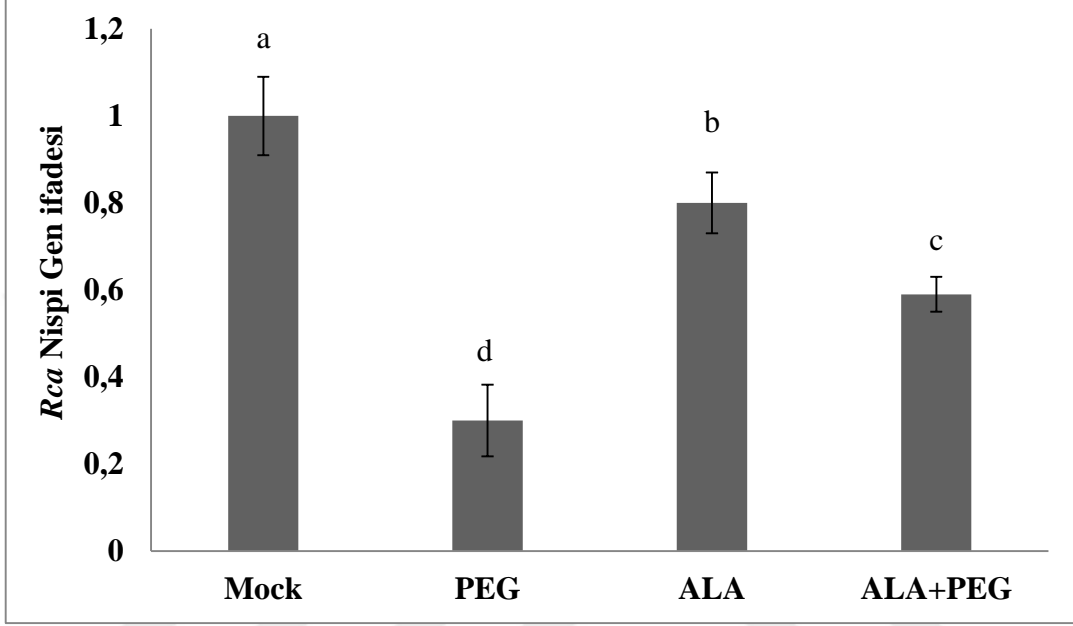
Şekil 16. ALA uygulamasının rubisco küçük alt ünitesinin gen ifadesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

Fosfoenolpirüvat karboksilaz gen ifadesinin kuraklığa maruz kalan bitkilerde azaldığı belirlendi. ALA uygulamasının stressiz şartlarda *PEPc* gen ifadesini etkilemediği ancak stresli şartlarda uygulanan ALA'nın *PEPc* gen ifadesini belirgin şekilde uyardığı bulundu (Şekil 17).



Şekil 17. ALA uygulamasının fosfoenol pirüvat karboksilazın gen ifadesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

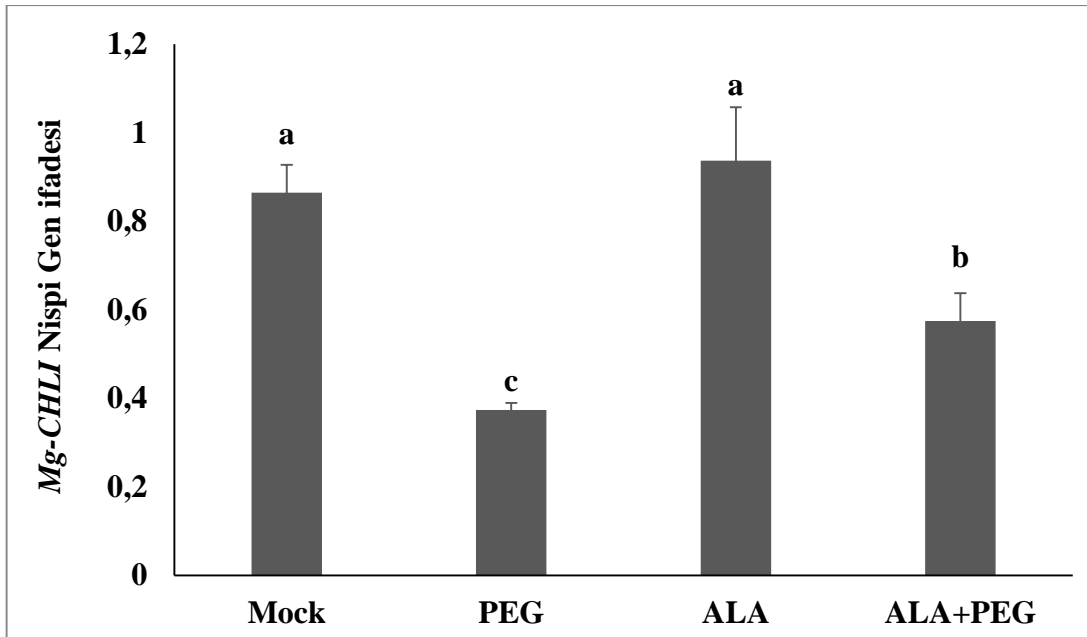
Rubisco aktivaz gen ifadesinin stres şartlarında belirgin seviyede azaldığı gözlemlendi. Stresiz şartlarda uygulanan ALA'nın da *Rca* gen ifadesini az da olsa azalttığı belirlendi. Stresli şartlarda uygulanan ALA'nın ise *Rca* gen ifadesini uygulama yapılmamış bitkilere göre artırdığı bulundu (Şekil 18).



Şekil 18. ALA uygulamasının *rubisco aktivazın* gen ifadesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

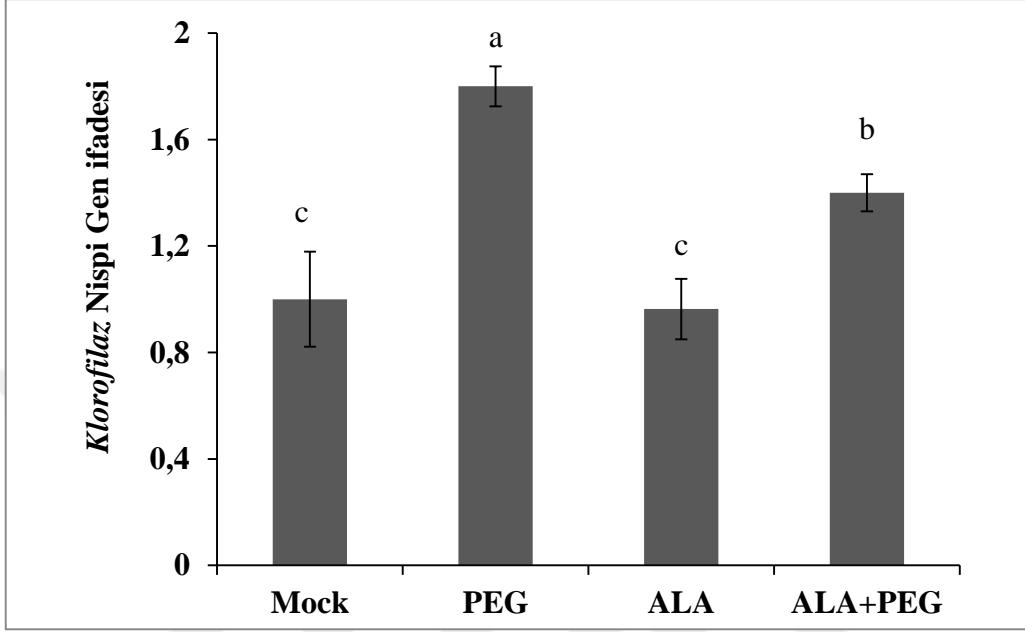
3.7. ALA Uygulamasının *Magnezyum Şelataz* ve *Klorofilaz* Gen İfade Seviyeleri Üzerine Etkisi

ALA uygulanmış fidelerde klorofil sentezinde rol alan *magnezyum şelataz* (*Mg-CHLI*) ile klorofil degradasyon yolunda görev alan *klorofilaz* gen ifadesindeki değişimler belirlendi. *Mg-CHLI* nispi gen ifadesinin stres şartlarında azaldığı ancak ALA uygulamasının söz konusu azalışı hafiflettiği bulundu. Stresiz şartlarda uygulanan ALA'nın ise *Mg-CHLI* nispi gen ifadesini önemli derecede etkilemediği tespit edildi (Şekil 19).



Şekil 19. ALA uygulamasının magnezyum şelataz gen ifadesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

Klorofilaz gen ifadesinin stres şartlarında kontrol fidelerine göre arttığı gözlemlendi. Stresli şartlarda uygulanan ALA'nın *klorofilaz* gen ifadesini stresli şartlara göre azalttığı tespit edildi (Şekil 20).



Şekil 20. ALA uygulamasının *klorofilazın* gen ifadesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

4. TARTIŞMA

ALA'nın insanda çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılması, güçlü bir antioksidan olması ve iki sülfür grubu bulundurması bakımından askorbik aside benzemesi onun bitki gelişiminde yararlı bir fonksiyonu olduğunu düşündürmüştür. Bununla beraber, strese maruz kalan bitkilerde dıştan uygulanan ALA'nın fotosentez üzerine iyileştirici etkilerinin olup olmadığı konusunda herhangi bir kayıta rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, strese maruz bırakılan mısır fidelerinde öncelikle nispi su içeriği, membran hasarı, fotosentetik pigmentler ve gaz değişim parametreleri ölçülerek fotosentezi olumlu etkileyen ALA konsantrasyonu belirlenmiştir. Daha sonra klorofil floresans parametreleri ile rubisco, *PEPc*, *Rca*, *magnezyum şelataz* ve *klorofilaz* gen ifade seviyelerindeki değişimler incelenerek ALA'nın fotosentez üzerine etki mekanizması ayrıntılı olarak araştırılmıştır.

Bitkide stres şartlarında değişen ve bitkideki su eksikliğinin derecesini gösteren parametrelerden birinin, nispi su içeriğindeki azalmanın olduğu ileri sürülmüştür (Flower ve Ludlow, 1986). Bu nedenle çalışmamızda öncelikle nispi su içeriğindeki değişimler belirlenmiş ve böylece bitkilerin strese maruz kalıp kalmadığı, kalmışsa maruz kaldığı stresin derecesi tespit edilmiştir. Nispi su içeriğinin stres şartlarında azaldığı, ALA uygulamalarının ise NSİ değerindeki azalışı hafiflettiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar literatürdeki stres esnasında bitki su içeriği üzerine yapılan benzer çalışmalarla uygunluk içerisindedir. Örneğin, *Xerosicyos danguyi* (Cucurbitaceae)'de kontrol şartlarında % 92 olan NSİ değerinin stres şartlarında % 50'ye düştüğü tespit edilmiştir (Bastide vd., 1993). Yine, mısırdaki yapılan benzer bir çalışmada, kontrol bitkilerinin yapraklarındaki NSİ değişmezken, kuraklığa maruz bırakılan bitkilerdeki NSİ değerinin azaldığı belirlenmiştir (Foyer vd., 1998). Mevcut çalışmada, ALA uygulanmış bitkilerde NSİ değerindeki azalışın ALA uygulanmamış bitkilere göre daha az olması ALA'nın su kaybına karşı bitkileri koruduğuna işaret etmektedir. Nitekim, iki bitki türü aynı kuraklık şiddetine maruz kaldığı zaman birinin diğerine göre daha fazla NSİ'ye sahip olması o bitkinin kuraklığa karşı daha dayanıklı olduğunu göstermektedir (Passiosura vd., 1993).

Bitkilerde stres durumunun önemli indikatörlerinden biri de lipid peroksidasyonudur. Çalışmamızda kuraklık şartlarında MDA içeriğinin arttığı, ALA uygulamasının ise membran hasarını hafiflettiği görülmüştür. Çeşitli streslerde dıştan uygulanan antioksidan maddelerin membranları koruduğu bilinmektedir. Örneğin çalışmamıza benzer olarak

strese maruz bırakılan bezelye bitkilerinde yapılan bir çalışmada, dıştan uygulanan prolinin lipid peroksidasyonunu azalttığı kaydedilmiştir (Shahid vd., 2014).

Çalışmalarımızda, kuraklık şartlarında klorofil a ve klorofil b seviyesinin azaldığı, ALA uygulamalarının ise kuraklığın neden olduğu klorofil kaybını hafiflettiği görülmüştür. Çeşitli stres şartlarında fotosentetik pigment içeriğinin azalabileceği bilinmektedir. Örneğin Anjum vd. (2011), kuraklık şartlarında bitkilerde klorofil pigmentinin degrades olduğunu ve böylece fotosentez oranının da azaldığını rapor etmiştir. Hayat vd. (2012), ise çeşitli abiyotik stres faktörlerinin klorofil sentezini ve stomaların fonksiyonunu değiştirdiğini kaydetmiştir. Diğer taraftan, çalışmamıza benzer olarak Ali vd. (2007), su stresine maruz kalan mısır bitkilerinde fotosentetik pigmentlerin azaldığını, bununla beraber antioksidan özelliğe sahip maddelerin bitkilere uygulanmasının pigment içeriği üzerine olumsuz etkileri hafiflettiğini ileri sürmüştür.

Bilindiği gibi kuraklık stresi azalan stomatal iletkenlik nedeniyle net fotosentez oranının da azalmasına veya fotosentetik metabolizmanın değişmesine neden olmaktadır (Shahid vd., 2014; Moaveni, 2011). Kuraklık aynı zamanda sub-stomatal CO₂ konsantrasyonunun ve transpirasyon oranının da azalmasını uyarır. Ayrıca kuraklığa maruz kalan bitkilerde azalan klorofil içeriği nedeniyle net fotosentez oranının da azaldığı rapor edilmiştir (Reddy vd., 2004). Bununla beraber, kuraklık şartlarında çeşitli kimyasal maddelerin bitkilere uygulanmasıyla stresin fotosentez hızı üzerindeki olumsuz etkilerin giderilebileceği de belirlenmiştir. Çalışmamızda PEG uygulanmış bitkilerde fotosentez hızı, stoma iletkenliği, transpirasyon ve içsel CO₂ miktarının azaldığı görülmüştür. Stres etkisiyle oluşan söz konusu azalmaların en fazla 12 µM ALA uygulamasıyla giderildiği tespit edilmiştir. Bu sonuç dıştan uygulanan ALA'nın muhtemelen su durumunu etkileyerek fotosentezi koruyabileceği fikrini desteklemektedir. Ayrıca literatürde yapılan benzer bir çalışmada, kuraklık stresinin net fotosentez, transpirasyon oranı, stoma iletkenliği ve içsel CO₂ oranını azalttığı, dıştan antioksidan madde uygulamasının ise gaz değişim parametreleri üzerine olumsuz etkileri hafiflettiği rapor edilmiştir (Ali vd., 2007).

Çalışmamızda çeşitli konsantrasyonlarda ALA uygulanmış bitkilerde yaprak su durumu, membran hasarı, pigment içeriği ve gaz değişim parametreleri bulguları değerlendirildiğinde 12 µM ALA uygulamasının diğer konsantrasyonlara göre stres hasarlarını hafifletmede daha etkili olduğu görülmüştür. Çalışmanın sonraki aşamasında bu uygulama şekli ve konsantrasyonu kullanılarak kuraklık şartlarında ALA uygulamasının

PSII'nin etkinliği, klorofil metabolizması ve karbondioksit fiksasyon enzimlerinin gen ifade seviyeleri üzerine etkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır.

PSII'nin etkinliğini belirlemek için kullanılan tekniklerden biri fluoresans tekniğidir. Ayrıca klorofil fluoresansı, PSI ve PSII arasındaki enerji dağılımının düzenlenmesi (Allen, 2002), PSII ışık yakalama kompleksinin yapısının aydınlatılması (Hooper ve Eggink, 1999), fotosentetik elektron taşınmasının düzenlenmesi çalışmalarında (Kramer vd., 2004) verimli bir biçimde kullanılmıştır. Kuraklığa maruz bırakılan mısır yapraklarında PSII'nin maksimum fotokimyasal etkinliğinin (F_v/F_m), fotokimyasal verimin (Φ_{PS2}) ve elektron taşınım oranının (ETR) azaldığı kaydedilmiştir (Tanyolaç vd., 2007). Mevcut alışmada, Tanyolaç vd. (2007), bulgularına benzer şekilde stres şartlarında F_v/F_m , Φ_{PS2} , ETR, q_P değerlerinin stressiz bitkilere göre azaldığı belirlenmiştir. Yine alışmamızda stres şartlarında NPQ değerinin kontrole göre arttığı bulunmuştur. Stres şartlarında ALA uygulanmış bitkilerde ise PSII aktivitesinin uygulama yapılmamış bitkilere göre uyarıldığı tespit edilmiştir. Elde edilen bulguların literatür çalışmalarıyla uygunluk içerisinde olduğu görülmüştür. Örneğin, Yan vd. (2011), antioksidan maddelerin bitkilere uygulanmasının fotosistem II etkinliğini artırdığını rapor etmiştir. Kuraklık stresi şartlarındaki *Arabidopsis thaliana* yapraklarında yapılan başka bir çalışmada, prolin püskürtülen yapraklarda PSII'nin fonksiyonunun korunduğu ve F_v/F_m değerinin kontrol bitkilerine yakın bir değere ulaştığı ileri sürülmüştür (Moustakas vd., 2011). Çalışmamızda stres şartlarında fotosistem II etkinliğinin ALA uygulamasıyla uyarılması fotosentetik verim kayıplarının ALA uygulamasıyla azaltılabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca, alışmamızda kuraklık şartlarında ALA uygulamasının karbondioksit fiksasyon reaksiyonlarına karışan bazı enzimlerin gen ifadesi üzerine etkisinin aydınlatılmasına yönelik olarak rubisco *LSU*, rubisco *SSU*, *PEPc* ve *Rca* gen ifadeleri çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çeşitli evresel streslere maruz kalan bitkilerde fotosentetik genlerden bazılarının ifadesinin aktifleştiği bazılarının ise inaktifleştiği kaydedilmiştir (Song vd., 2014). Bilindiği gibi kuraklık stresi azalan stomatal iletkenlik nedeniyle CO_2 asimilasyon oranını azaltır. Ayrıca, kuraklık stresi fotosentetik karbon indirgenme döngüsü anahtar enzimi olan rubisco'nun da dahil olduğu enzimlerinin içeriği ve aktivitelerindeki azalmayı da uyarır (Reddy vd., 2004). Diğer taraftan, bitkilerin dehidrasyona toleransını anlamak için kuraklık stresi şartlarında antioksidan maddelerin rolü aktif bir şekilde araştırılmaktadır (Reddy vd., 2004). Mevcut çalışmada, literatürdeki verilerle uygunluk içerisinde, kuraklık şartlarında karbon indirgenmesine karışan rubisco,

PEPc ve *Rca* gen ifade seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir. Nitekim, ozon stresine maruz bırakılan mısır fidelerinde rubisco *SSU*, rubisco *LSU*, *Rca* ve *PEPc* transkript seviyelerinin stres derecesine bağlı olarak azaldığı ileri sürülmüştür (Leitao vd., 2007). Yine, yapılan bir çalışmada, stres şartlarında rubisco'nun deaktivasyonunun stres toleransı için koruyucu bir aklimasyon stratejisi olabileceği bildirilmiştir (Sharkey ve Zhang, 2010). Çalışmamızda, strese maruz kalan bitkilere ALA uygulamasının rubisco *LSU*, rubisco *SSU*, *PEPc* ve *Rca*'nın transkripsiyonel ve translasyonel nispi gen ifadesini artırdığı belirlenmiştir. Bu bilgiler dıştan uygulanan ALA'nın karbondioksit fiksasyon enzimlerini uyardığını göstermiştir. Elde edilen bulgulara benzer şekilde, Chen vd. (2011), dıştan H₂S (NaHS formunda) uygulanan ıspanak fidelerinde rubisco aktivitesi ve rubisco LSU protein ifadesinin arttığını ileri sürmüştür.

Mevcut araştırmada, strese maruz bırakılan mısır fidelerinde klorofil sentezi ve parçalanması üzerine etkisinin belirlenmesi için ise klorofil parçalanması yolundaki ilk enzim olan *klorofilaz* (Matile vd., 1997) gen ifadesi ile klorofil sentezinde rol alan Mg şelataz gen ifadesi (Mahajan ve Tuteja, 2005; Tsuzuki vd., 2013) western blot analizi çalışmaları yapılmıştır. Kuraklık stresi şartlarında *klorofilaz* gen ifadesinin arttığı görülmüştür. Nitekim, stres şartlarında klorofili degrede eden enzimlerin ve klorofilazın aktivitesinin artmasıyla klorofilin degrede olduğu ve böylece fotosentetik pigmentlerin de azaldığı kaydedilmiştir (Kordi vd., 2013). Ayrıca mevcut çalışmada elde ettiğimiz bulgulara benzer olarak bazı literatürlerde kuraklık stresine cevap olarak klorofil parçalanmasında rol alan genlerin ifadesinin aktifleştiği ve klorofilazın yüksek derecede ifade edildiği bildirilmiştir (Abebe vd., 2010).

Kuraklık stresine cevapta fotosentez ve klorofil senteziyle ilgili bazı genlerin ifadesinin azaldığı kaydedilmiştir (Mahajan ve Tuteja, 2005). Literatür kayıtları ile uyumlu olarak strese maruz kalan fidelerde *Mg-CHLI* nispi gen ifadesinin inaktifleştiği belirlenmiştir. Bekçi hücrelerinde Mg şelataz H alt ünitesinin aşırı ifadesinin *Arabidopsis thaliana*'da kuraklığa toleransı artırdığı rapor edilmiştir (Tsuzuki vd., 2013). Elde edilen bulgulara, göre stres şartlarında ALA uygulanmış bitkilerde Mg-şelataz gen ifadesi belirgin şekilde artmıştır. Artan Mg şelataz gen ifadesinin mısır fidelerinde stres toleransını artırdığını ifade edebiliriz. Böylece elde edilen veriler ışığında, kuraklığa maruz bırakılan fidelere dıştan uygulanan ALA'nın klorofil sentezinde rol alan genleri uyardığını söyleyebiliriz.

Sonuç olarak, mevcut çalışmadan elde edilen veriler, stres şartlarında dıştan uygulanan ALA'nın daha çok fotosentezin karbondioksit fiksasyon reaksiyonlarında rol alan anahtar enzimler ile klorofil sentezinde görev alan enzimlerin gen aktivitesini uyardığını göstermiştir. Kuraklık şartlarında ALA uygulamasının aynı zamanda fotosentezin PSII aktivitesini uyardığı böylece fotosentetik hasarları hafiflettiği, klorofil sentezi ve fotosentezin devamlılığını sağladığı ortaya konulmuştur.



5. SONUÇLAR

Yapmış olduğumuz bu çalışma sonucunda;

1. Mısır fidelerinde stres şartlarında klorofil a ve klorofil b içeriğinin azaldığı gözlemlendi. Yüksek ve düşük konsantrasyonlarda uygulanan ALA'nın pigment içeriğini azalttığı, aksine 12 μ M konsantrasyonda uygulanan ALA'nın klorofil a ve klorofil b içeriğindeki azalışı hafiflettiği tespit edildi.
2. Kuraklığa maruz kalan bitkilerde fotosentez, transpirasyon, stoma iletkenliği ve sub-stomatal iletkenliğin azaldığı, 12 μ M ALA uygulamasının A, E ve gs değerlerindeki azalışları, 2,5 ve 12 μ M ALA'nın ise Ci değerindeki azalışları hafiflettiği, diğer konsantrasyonların ise olumsuz etkilediği belirlendi.
3. Kuraklık stresinde azalan Fv/Fm, Φ_{PSII} , ETR ve qP değerlerinin ALA uygulaması ile arttığı tespit edildi.
4. Kuraklık stresi şartlarında NPQ değerinin arttığı, ALA uygulamasının bu artışı engellediği belirlendi.
5. Kuraklık şartlarında azalan rubisco büyük alt ünitesi (*rubisco LSU*) ve rubisco küçük alt ünitesi (*rubisco SSU*) gen ifadelerinin ALA uygulaması ile uyarıldığı görüldü.
6. Fosfoenolpirüvat karboksilaz gen ifadesinin kuraklık stresi altındaki bitkilerde azaldığı, ALA uygulamasının azalan PEPc gen ifadesini artırdığı belirlendi.
7. *Rubisco aktivaz* gen ifadesinin stres şartlarında belirgin seviyede azaldığı gözlemlendi. Stresli şartlarda uygulanan ALA'nın ise gen ifadesini uygulama yapılmamış bitkilere göre artırdığı belirlendi.
8. Magnezyum şelataz nispi gen ifadesinin stres şartlarında azaldığı ancak ALA uygulamasının söz konusu azalışı hafiflettiği gözlemlendi.
9. *Klorofilaz* gen ifadesinin stres şartlarında kontrol fidelerine göre arttığı gözlemlendi. Stresli şartlarda uygulanan ALA'nın ise *klorofilaz* gen ifadesini azalttığı tespit edildi.

Kısaca bu çalışma sonucunda, kuraklık stresine maruz bırakılan mısır (*Zea mays* L.) fidelerinde dıştan ALA uygulamasının fotosentezin karbondioksit fiksasyon reaksiyonlarına karışan anahtar enzimler ile klorofil sentezine karışan enzimlerin gen aktivitesini ve fotosentezin PSII aktivitesini uyararak fotosentezi iyileştirdiği,

stres hasarını hafiflettiği ve böylece kuraklık stresini hafifletmede rolünün olabileceği belirlenmiştir.



6. ÖNERİLER

ALA hem indirgenmiş (dihidrolipoik asit, DHLA) hem de yükseltgenmiş (lipoik asit) formda güçlü antioksidan özelliğini koruması, suda veya yağda çalışan diğer antioksidanların aksine hem suda hem de yağda çalışabilen bir özelliğe sahip olması nedeniyle antioksidanlar arasında özel bir yere sahiptir. Diğer taraftan, son yıllarda artan küresel ısınma kuraklık stresine neden olmakta ve dünya ölçeğinde tarımı yapılan mısır bitkisi zaman zaman kuraklık stresinden etkilenmektedir. Bu çalışmada, kuraklık stresine maruz kalmış mısır fidelerine ALA uygulamasının fotosentezi iyileştirmek için etkili olup olmayacağı ilk defa belirlenmiş ve ALA uygulamasının fotosentetik hasarı iyileştirmede etkili olabileceği konusunda önemli bilgilere ulaşılmıştır. Böylece, düşük konsantrasyonlarda insan sağlığına yararlı etkisi olan ALA'nın stres şartlarında iyileştirme sağlamak amacıyla tarımda kullanılma ihtimali ortaya konmuştur. Bu çalışmanın verim kaybını azaltmaya yönelik yapılabilecek diğer çalışmalara da temel teşkil edebileceği söylenebilir.

Ayrıca mevcut çalışma, ALA'nın iyonlar üzerine etkisi, yeni bir protein sentezine katkısı fotorespirasyon üzerine etkileri gibi birçok çalışmanın da temelini oluşturacak nitelikte olup bundan sonraki çalışmalarda bu konunun daha ayrıntılı araştırılması önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Abaaszadeh, P., Sharifi, A., Lebaschi, H. ve Moghadasi, F., 2007. Effect of drought stress on proline, soluble sugars, chlorophyll and RWC level in *Melissa oegicinalis*. Iranian J. Med. Plants Res, 23, 504-513.
- Abebe, T., Melmaiee, K., Berg, V. ve Wise, R.P., 2010. Drought response in the spikes of barley: gene expression in the lemma, palea, awn, and seed. Functional and Integrative Genomics, 10, 191-205.
- Agarwal, P.K., Agarwal, P., Sudhir, M.K.R. ve Sopory, K., 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. Plant Cell Reports, 25, 1263-1274.
- Ali, Q., Ashraf, M. ve Athar, H.R., 2007. Exogenously applied proline at different growth stages enhances growth of two maize cultivars grown under water deficit conditions. Pakistan Journal of Botany, 39, 1133–1144.
- Ali, Q. ve Ashraf, M., 2011. Induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: growth, photosynthesis, water relations and oxidative defence mechanism. Agronomy and Crop Science, 1, 1-14.
- Allen, J.F., 2002. Plastoquinone redox control of chloroplast thylakoid protein phosphorylation and distribution of excitation energy between photosystems: discovery, background, implications. Photosynthesis Research, 73, 139-48.
- Anjum, S., Xie, X., Wang, L., Saleem, M., Man, C. ve Lei, W., 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. Journal of African Agricultural Research, 6, 2026-2032.
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 24, 1–15.
- Arora, A. ve Mohan, J., 2001. Expression of dwarfing genes under nitrogen and moisture stress in wheat (*Triticum spp*): dry matter partitioning, root growth and leaf nitrogen. Journal of Agronomy and Crop Science, 186, 111-118.
- Ashraf, M. ve Foolad, M.R., 2007. Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress tolerance. Environmental and Experimental Botany, 59, 206–216.
- Baret, F., Houlès, V. ve Guèrif, M., 2007. Quantification of plant stress using remote sensing observations and crop models: the case of nitrogen management. Journal of Experimental Botany, 58, 869–880.

- Bastide, B., Sipes, D., Hann, J. ve Ting, I.P., 1993. Effect of severe water stress on aspects of crassulacean acid metabolism in xerophytes. Plant Physiology, 103, 1089-1096.
- Berry, J.A., Yerramsetty, P., Zielinski, A.M. ve Mure, C.M., 2013. Photosynthetic gene expression in higher plants. Photosynthesis Research, 117, 91-120.
- Bidwell, R.G.S., 1974. Plant Physiology. New York: Macmillan Publishing Com. Inc.
- Bray, E.A., 1997. Plants responses to water deficit, Trends in Plants Science, 2, 48-54.
- Blum, A., 1988. Plant Breeding for Stress Environments. Boca Raton, USA: CRC Press.
- Buchanan, B.B. ve Balmer, Y., 2005. Redox regulation: a broadening horizon. Annual Review of Plant Biology, 56, 187-220.
- Campbell, M.K., 1991. Fort Worth Biochemistry. USA: Harcourt Brace Jovanovich College Publishers.
- Castillo, F.J., 1996. Antioxidative protection in the inducible CAM plant *Sedum album* L. following the imposition of severe water stress and recovery, Oecologia, 107, 469-477.
- Chen, J., Wu, F.H., Wang, W.H., Zheng, C.J., Lin, G.H., Dong, X.J., He, J.X., Pei, Z.M. ve Zheng, H.L., 2011. Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. Journal of Experimental Botany, 62, 4481-4493.
- Cornic, G., 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture not by affecting ATP synthesis. Trends in Plant Science, 5, 187-188.
- Çırak, C. ve Esenal, E., 2006. Soyada kuraklık stresi, OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 21, 231- 237.
- D'amico, M.L., Navari-Izzo, F., Sgherri, C. ve Izzo, R., 2004. The role of lipoic acid in the regulation of the redox status of wheat irrigated with 20% sea water. Plant Physiology and Biochemistry, 42, 329-34.
- Dan, Y., Armstrong, C.L., Dong, J., Xiaorong, F. ve Fry, J.E., 2009. Lipoic acid-A unique plant transformation enhancer. In Vitro Cellular Developmental Biology Plant, 45, 630-8.
- Demirevska, K., Simova-Stoilova, L., Vassileva, V. ve Feller, U., 2008. Rubisco and some chaperone protein responses to water stress and rewatering at early seedling growth of drought sensitive and tolerant wheat varieties. Plant Growth Regulation, 56, 97-106.

- Demmig-Adams, B., William, W. ve Adams, I., 2006. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. New Phytologist, 172, 11–21.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. ve Thorpe, T.A., 1981/82. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase, Journal of Experimental Botany, 32, 93-101.
- Earle, F. R., Curtis, J. J. ve Hubbard, J. E., 1946. Composition of the component parts of the kernel. Cereal Chemistry, 23, 504-511.
- Egert, M. ve Tevini, M., 2002. Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). Environmental and Experimental Botany, 48, 43-49.
- Epstein, E., 1972. Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives, John Wiley and Sons, New York.
- Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Bota, J., Galmés, J., Henkle, M., Martínez-Cañellas, S. ve Medrano, H., 2006. Decreased rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. New Phytologist, 172, 73-82.
- Flower, D.J. ve Ludlow, M.M., 1986. Contribution of osmotic adjustment to the dehydration tolerance of water stressed pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) Millsp. Leaves. Plant Cell Environ., 9, 33-40.
- Foyer, C.H., Valadier, M.H., Migge, A. ve Becker, T.W., 1998. Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolisms in maize leaves. Plant Physiology, 117, 283-292.
- Fu, J. ve Huang, B., 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. Environmental and Experimental Botany, 45, 105-114.
- Genty, B., Briantais, J.M. ve Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochimica Et Biophysica Acta, 990, 87-92.
- Grassi, G. ve Magnani, F., 2005. Stomatal mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. Plant, Cell and Environment, 28, 834–849.
- Gueguen, V., Macherel, D., Jaquinod, M. ve Douce, R., 2000. Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. The Journal of Biological Chemistry, 275, 5016-25.

- Güven, F.G., 2013. Kuraklığa Hassas ve Dayanıklı Mısır Çeşitlerinde Alfa Lipoik Asit Ön Muamelesinin Kuraklık Toleransı Üzerine Etkisi, Doktora Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine* (Second Edition). Oxford: Clarendon Press.
- Hamdia, M.A. ve Shaddad, M.A.K., 2010. Salt tolerance of crop plants. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 6, 64-90.
- Handa, S., Bressan, R.A., Handa, A.K., Carpita, N.C. ve Hasegawa, P.M., 1983. Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress, Plant Physiology, 73, 834-843.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Handa, S. ve Handa, A.K., 1984. Cellular mechanisms of tolerance to water stress, Horticultural Science, 19, 371-377.
- He, L., Gao, Z. ve Li, L., 2009. Pretreatment of seed with H₂O₂ enhances drought tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. African Journal of Biotechnology, 8, 6151-6157.
- Heath, R.L. ve Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, Archives in Biochemistry and Biophysics, 125, 189-98.
- Hoober, J.K. ve Eggink, L.L., 1999. Assembly of light-harvesting complex II and biogenesis of thylakoid membranes in chloroplasts. Photosynthesis Research, 61, 197-215.
- Hopkins, W.G., 1995. *Introduction to Plant Physiology*. New-York: John Wiley & Sons.
- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W. ve Sanchez-Diaz, M., 1992. Alfalfa leaf senescence induced by drought stress: photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evolution. Physiologiae Plantarum, 84, 67-72.
- Jackson, M.B. ve Armstrong, W., 1999. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. Plant Biology, 1, 274-287.
- Jaleel, C.A.P., Manivannan, B., Sankar, A., Kishorekumar, R., Gopi, R., Somasundaram, R. ve Panneerselvam, 2007. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*; effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. Colloids Surf. B: Biointerfaces, 60, 110-116.
- Jaleel, C.A.P., Manivannan, A., Wahid, M., Farooq, R., Somasundaram, R. ve Panneerselvam, 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. International Journal of Agriculture and Biology, 11, 100-105.

- Kadioğlu, A. ve Terzi, R., 2007. A dehydration avoidance mechanism: Leaf rolling. The Botanical Review, 73, 290-302.
- Kalefetoğlu, T. ve Ekmekçi, Y., 2005. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 18, 723-740.
- Kerepesi, I. ve Galiba, G., 2000. Osmotic and salt-stress induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. Crop Science, 40, 482-487.
- Kessler, B., 1961. Nucleic acids as factors in drought resistance of higher plants. Recent Advance in Botany, 2, 1153-1159.
- Kiss, A.Z., Ruban, A.V. ve Horton, P., 2008. The PsbS protein controls the organization of the photosystem II antenna in higher plant thylakoid membranes. Journal of Biological Chemistry, 283, 3972–3978.
- Knight, H. ve Knight, M.R., 2001. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. TRENDS in Plant Science, 6, 262-267.
- Kordi, S., Saidi, M. ve Ghanbari, F., 2013. “Introduction to drought tolerance in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) by salicylic acid”, International Journal of Agricultural and Food Research, 2, 18-26.
- Kramer, P.J., 1980. *Water Relations in Plants*, New York: Academic Press.
- Kramer, D.M., Johnson, G., Kiirats, O. ve Edwards, G.E., 2004. New fluorescence parameters for the determination of Q(A) redox state and excitation energy fluxes, Photosynthesis Research, 79, 209-218.
- Krause, G.H. ve Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis—the basics. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 42, 313–349.
- Krasensky, J. ve Jonak, C., 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks, Journal of Experimental Botany, 63, 4, 1593–1608.
- Lawlor, D.W. ve Cornic, G., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. Plant, Cell and Environment, 25, 275–294.
- Lawlor, D.W. ve Tezara, W., 2009. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. Annals of Botany, 103, 561-579.
- Lawson, T., Kramer, D.M. ve Raines, C.A., 2012. Improving yield by exploiting mechanisms underlying natural variation of photosynthesis. Current Opinion in Biotechnology, 23, 215–220.

- Leitao, L., Maoret, J.J. ve Biolley, J.P., 2007. Changes in PEP carboxylase, rubisco and rubisco activase mRNA levels from maize (*Zea mays*) exposed to a chronic ozone stress. Biological Research, 40, 137-153.
- Levitt, J., 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses. New York: Academic Press.
- Li, X.P., Muller-Moule, P., Gilmore, A.M. ve Niyogi, K.K., 2002. PsbS dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 99, 15222–15227.
- Li, P.M., Cheng, L.L., Gao, H.Y., Jiang, C.D. ve Peng, T., 2009. Heterogeneous behavior of PSII in soybean (*Glycine max*) leaves with identical PS II photochemistry efficiency under different high temperature treatments. Journal of Plant Physiology, 166,1607–1615.
- Livak, K.J. ve Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods, 25, 402-408.
- Mahajan, S. ve Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics, 444, 139-158.
- Massacci, A.S.M., Nabiev, L., Pietrosanti, S.K., Nematov, T.N., Chernikova, K., Thor, J. ve Leipner, 2008. Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. Plant Physiology and Biochemistry, 46, 189-195.
- Matile, P., Schellenberg, M. ve Vicentini, F., 1997. Localization of chlorophyllase in the chloroplast envelope. Planta, 201, 96-99.
- Mattos, L.M. ve Moretti, C.L., 2015, Oxidative stress in plants under drought conditions and the role of different enzymes. Enzyme Engineering, 5, 136.
- Maxwell, K. ve Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence-A practical guide. Journal of Experimental Botany, 51, 659-68.
- McKersie, B.D. ve Lehsem, Y., 1994. Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Mihailovic, N., Lazarevic, M. ve Dzeletovic, Z., 1997. Chlorophyllase activity in wheat, *Triticum aestivum* L leaves during drought and its dependence on the nitrogen ion form applied. Plant Science, 129, 141-146.
- Moaveni, P., 2011. Effect of water deficit on some physiological traits of wheat (*Triticum aestivum*). Agricultural Science Research Journal, 16, 64-68.

- Morris, M. L., 2002. Impacts of International Maize Breeding Research in Developing Countries, 1966-98. DF:CIMMYT, Mexico.
- Moustakas, M., Sperdoui, I., Kouna, T., Antonopoulou, C.I. ve Therios, I., 2011. Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of *Arabidopsis thaliana* leaves. Plant Growth Regulation, 65, 315-325.
- Mundree, S.G., Baker, B., Mowla, S., Peters, S., Marais, S., Willigen, C.V., Govender, K., Maredza, A., Muyanga, S., Farrant, J.M. ve Thomson, J.A., 2002. Physiological and molecular insights into drought tolerance. African Journal of Biotechnology, 1, 23-38.
- Murchie, E.H. ve Lawson, T., 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications, Journal of Experimental Botany, 64, 13, 3983–3998.
- Murchie, E.H. ve Niyogi, K.K., 2011. Manipulation of photoprotection to improve plant photosynthesis. Plant Physiology, 155, 86–92.
- Navari-Izzo, F. ve Quartacci, M.F., 2001. Phytoremediation of metals: mechanisms against oxidative stress. Minerva Biotechnology, 13, 73-83.
- Navari-Izzo, F., Quartacci, M.F. ve Sgherri, C., 2002. Lipoic Acid: A unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species, Plant Physiology and Biochemistry, 40, 463-70.
- Pankovi'c, D., Saka'c, Z., Kevre'san, S. ve Plesni'car, M., 1999. Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: photosynthesis electrontransport and carbon metabolism. Journal of Experimental Botany, 50, 127-138.
- Pinheiro, C. ve Chaves, M.M., 2011. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? Journal of Experimental Botany, 62, 869-882.
- Pinheiro, H.A., Da Malta, F.M., Agnoldo, R., Chaves, M., Loureiro, M.E. ve Ducatta, C., 2005. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. Annals of Botany, 96, 101-108.
- Packer, L., Witt, E.H. ve Tritschler, H.J., 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radical Biology and Medicine, 19, 227-50.
- Padurariu, C., Harovitz, T., Paltineau, R. ve Negomi, V., 1969. On the relationship between soil moisture and osmotic potential in maize and sugar beet plants. Physiologiae Plantarum, 22, 850-860.

- Passiosura, J.B., Condon, A.G. ve Richards, R.A., 1993. The Development of Leaf Area Crop Productivity, In: Water Deficits, Smith, J.A.C. ve Griffiths, H., Eds., Bios Scientific Publishers, Oxford, 253-263.
- Pastori, G.M. ve Trippi, V.S., 1992. Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought resistant maize strain. Plant and Cell Physiology, 33, 957-961.
- Pe´rez-Lo´pez, U., Robredo, A., Lacuesta, M., Sgherri, C., Mena-Petite, A., Navari-Izzo, F. ve Mun˜oz-Rueda, A., 2010. Lipoic acid and redox status in barley plants subjected to salinity and elevated CO₂. Physiologia Plantarum, 139, 256–268.
- Razmjoo, K.P., Heydarizadeh, M.R. ve Sabzalian, 2008. Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomile*. International Journal of Agriculture and Biology, 10, 451–454.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. ve Vivekanandan, M., 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology, 161, 1189-1202.
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Lebedev, N. ve Apel, K., 1996. PORA and PORB, two light-dependent protochlorophyllide-reducing enzymes of Angiosperm chlorophyll biosynthesis. The Plant Cell, 8, 763–769.
- Ruban, A.V., Johnson, M.P. ve Duffy, C.D.P., 2012. The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. Biochimica et Biophysica Acta, 1817, 167–181.
- Sağlam, A., 2011. Kurak şartlardaki Mısır Çeşitlerinde Yaprak Kıvrılması Sırasında Fotosentetik Aygıttaki Değişimlerin Araştırılması, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Sairam, R.K., Chandrasekhar, V. ve Srivastava, G.C., 2001. Comparison of hexaploid and tetraploid wheat cultivars in their responses to water stress. Biologia Plantarum, 44, 89-94.
- Salisbury, F.D. ve Ross, C.W., 1992. Plant Physiology. California: Wadsworth Publishing Co.
- Schulze, E.D., Beck, E. ve Müller-Hohenstein, K., 2005. Plant Ecology, USA: Springer.
- Sgherri, C.L.M. ve Navari-Izzo, F., 1995. Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defence mechanisms, Physiologia Plantarum, 93, 25-30.
- Sgherri, C.L.M., Pinzino, C. ve Navari-Izzo, F., 1996. Sunflower Seedlings Subjected to Increasing Water Stress by Water Deficit: Changes in O₂- Production Related to the Composition of Thylakoid Membranes, Physiologia Plantarum, 96, 446-452.

- Sgherri, C.L.M., Maffei, M. ve Navari-Izzo, F., 2000. Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering, Journal of Plant Physiology, 157, 273-279.
- Shahid, M.A., Balal, R.M., Pervez, M.A., Abbas, T., Aqeel, M.A., Javaid, M.M. ve Garcia-Sanchez, F., 2014. Exogenous proline and proline-enriched *Lolium perenne* leaf extract protects against phytotoxic effects of nickel and salinity in *Pisum sativum* by altering polyamine metabolism in leaves. Turkish Journal of Botany, 38, 914-926.
- Shao, H.B., Chu, L.Y., Jaleel, C.A., Manivannan, P., Panneerselvam, R. ve Shao, M.A., 2009. Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants-biotechnologically and sustainably improving agriculture and the environment in arid regions of the globe, Critical Review in Biotechnology, 29, 131-151.
- Shao, H.B., Chu, L.Y., Shao, M.A., Abdul Jaleel C., ve Hong-Mei, M., 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. Comp. Rend. Biol., 331: 433–441
- Sharkey, T.D., Zhang, R. 2010. High temperature effects on electron and proton circuits of photosynthesis. Journal of Integrative Plant Biology, 52, 712-722.
- Sgherri C.L.M., Pinzino, C. ve Navari-Izzo, F., 1993. Chemical changes and $O_2^{\cdot-}$ production in thylakoid membranes under water stress. Physiologia Plantarum, 87, 211–216.
- Sgherri, C., Quartacci, M.F., Izzo, R. ve Navari-Izzo F., 2002. Relation between lipoic acid and cell redox status in wheat grown in excess copper. Plant Physiology and Biochemistry, 40, 591–597.
- Sgherri, C., Navari-Izzo, F., Pardossi, A., Soressi, G.P. ve Izzo, R. 2007. The influence of diluted seawater and ripening stage on the content of antioxidants in fruits of different tomato genotypes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 2452–2458.
- Sivaramakrishnan, S., Patell, V.Z., Flower, D.J. ve Peacock, J.M., 1988. Proline accumulation and nitrate reductase activity in contrasting sorghum lines during mid-season drought stress. Physiologia Plantarum, 74, 418-426.
- Smirnoff, N., 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytologist, 125, 27-58.
- Song, Y., Chen, Q., Ci, D., Shao, X. ve Zhang, D., 2014. Effects of high temperature on photosynthesis and related gene expression in poplar. BMC Plant Biology, 14, 111.
- Street, H.E. ve Opik, H., 1992. The Physiology of Flowering Plants: Their Growth and Development (Cambridge Studies in Modern Biology), Third Edition, Baltimore: Cambridge University Press, USA.

- Taiz, L. ve Zeiger, E., 2006. *Plant Physiology*, Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Tambussi, E.A., Bartoli, C.G., Beltrano, J., Guiamet, J.J. ve Araus, J.L., 2000. Oxidative damage to tylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologiae Plantarum*, 108, 398-404.
- Tanyolaç, D., Ekmekci, Y. ve Unalan, S., 2007. Changes in photochemical and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper, *Chemosphere*, 67, 89-98.
- Taylor, N.L., Day, D.A. ve Millar, A.H., 2004. Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism, *Journal of Experimental Botany*, 55, 1-10.
- Terzi, R., Kalaycıoğlu, E., Demiralay, M., Sağlam, A. ve Kadioğlu, A., 2015. Exogenous ascorbic acid mitigates accumulation of abscisic acid, proline and polyamine under osmotic stress in maize leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 43.
- Tezara, W., Mitchell, V.J., Driscoll, S.D. ve Lawlor, D.W., 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 401, 914-917.
- Thomas, H., 1997. Chlorophyll: a symptom and a regulator of plastid development. *New Phytologist*, 136, 163-181.
- Thompson, J.E., Ledge, R.L. ve Barber, R.F., 1987. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist*, 105, 317-344.
- Touchette, B.W., Smith, G.A., Rhodes, K.L. ve Pool, M., 2009. Tolerance and avoidance: two contrasting physiological responses to salt stress in mature marsh halophytes *Juncus roemerianus* Scheele and *Spartina alterniflora* Loisel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 380, 106-112.
- Tsuzuki, T., Takahashi, K., Tomiyama, M., Inoue, S.I. ve Kinoshita, T., 2013. "Overexpression of the Mg-chelatase H subunit in guard cells confers drought tolerance via promotion of stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*", *Frontiers in Plant Science*, 4, 440.
- Yan, Z. Guo, S., Shu, S., Sun, J. ve Tezuka, T., 2011. Effects of proline on photosynthesis, root reactive oxygen species (ROS) metabolism in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.) under NaCl stress. *African Journal of Biotechnology*, 10, 18381-18390.
- Yasuno, R. ve Wada, H., 1998. Biosynthesis of Lipoic Acid in Arabidopsis: Cloning and Characterization of The cDNA for Lipoic Acid Synthesis. *Plant Physiology*, 118, 935-43.

- Yıldız, M., Akcalı, N. ve Terzi, H., 2015. Proteomic and biochemical responses of canola (*Brassica napus* L.) exposed to salinity stress and exogenous lipoic acid. Journal of Plant Physiology, 179, 90-99.
- Yılmaz, E., Tuna, L.A. ve Bürün, B., 2011. Bitkilerin tuz stresi etkilerine karşı geliştirdikleri tolerans stratejileri. Celal Bayar University Journal of Science, 71, 47-66.
- Yiu, J.C, Liu, C.W., Fang, D.Y. ve Lai, Y.S., 2009. Waterlogging tolerance of Welsh onion (*Allium fistulosum* L.) enhanced by exogenous spermidine and spermine. Plant Physiology and Biochemistry , 47, 710–716.
- Yordanov, I., Velikova, V. ve Tsonev, T., 2000. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. Photosynthetica, 38, 171-186.
- Yordanov, I., Velikova, V. ve Tsonev, T., 2003. Plant responses to drought and stress tolerance. Bulgarian Journal of Plant Physiology, 187-206.
- Zhu, J.K., 2016. Abiotic stress signaling and responses in plants. Cell, 167, 313-324.

ÖZGEÇMİŞ

Salih CİNEMRE, 09.03.1965 yılında Trabzon/Akçaabat'ta doğdu. İlk ve orta öğrenimini Akçaabat'ta, lise eğitimini Trabzon Teknik Lisesi'nde tamamladı.1982 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans öğrenimini 1986 yılında tamamladı. Aynı yıl Karabük Demir Çelik Lisesi Biyoloji Öğretmenliğine atandı. 2000 yılında istifa ederek dersane öğretmenliğine geçtikten sonra 2009 yılında Trabzon Fatih Çocuk Yuvas'ına öğretmen olarak atandı. 2010-2011 eğitim öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Şu anda öğretmen olarak görevine devam etmektedir.