

Bitkilerde Programlı Hücre Ölümü

Programmed Cell Death in Plants

Fatma YANIK¹ , Aslıhan ÇETİNBAŞ¹ , Filiz VARDAR¹ 

Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 34722, Göztepe Kampüsü, Kadıköy, İstanbul

Öz

Programlı hücre ölümü (PHÖ) yaşlanmış, görevini yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmesini sağlayan, genetik olarak kontrol altında olan bir ölüm mekanizmasıdır. PHÖ vejetatif-geratif organ gelişimi sırasında ve biyotik-abiyotik stres şartları altında bitkilerin farklı organ ve dokularında görülür. Bitkilerde gelişim sırasında hücre ölümü; kök şapkası hücrelerinin değişimi, trakeal elementlerin oluşumu, su bitkilerinde havalandırma parankimasının oluşumu, trikom gelişimi, yaprak senesensi, eşey belirlenmesi ve üreme organlarının gelişimi sırasında ortaya çıkar. Bunun yanında virüs, bakteri, mantar gibi biyotik ve UV ışık, kuraklık, tuzluluk, sıcaklık, donma, sel, ağır metaller, pestisitler gibi birçok abiyotik stres faktörü bitkilerde PHÖ'ye yol açar. Bitkilerdeki PHÖ mekanizması hayvan hücrelerindeki benzer şekilde nükleus morfolojisindeki değişiklikler, kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu, protoplastta büzülme, hücre iskeletinde değişiklikler ve kaspaz benzeri enzimatik aktiviteler ile gelişir. Apoptotik hücre ölümü görülmeyen bitkilerde, vakuoler ve nekrotik hücre ölümü olmak üzere iki tip ölüm vardır.

Anahtar Kelimeler: Nekrotik hücre ölümü, programlı hücre ölümü, reaktif oksijen türleri, vakuoler hücre ölümü

Abstract

Cell death which is one of the basic characteristics of both prokaryotic and eukaryotic cells is encountered within the whole organism. Programmed cell death (PCD) is a genetically controlled mechanism, allows retired, dysfunctional, overproduced, irregularly developed or genetically damaged cells to be destroyed safely for organism. It has been first used in 1964 by Lockshin and Williams. Animal apoptosis which is best characterized form of PCD is used first in 1972 by Kerr et al. According to the recent biochemical and molecular studies PCD is categorized in three basic groups: apoptosis, autophagy and necrosis. Plants do not undergo apoptotic cell death, and cell death is classified into two groups as vacuolar and necrotic cell death. In vacuolar cell death, alterations in nucleus morphology, chromatin condensation, DNA fragmentation, protoplast condensation, vacuolization, generation of reactive oxygen species, alterations in the cytoskeleton and caspase like enzymatic activities are observed, as in animal cells. Necrotic cell death has different features from vacuolar cell death such as ATP depletion, cell and mitochondria swelling. PCD appears in different organs and tissues of plants during vegetative-generative organ development and under biotic-abiotic stress conditions. It occurs during the development of plants such as regeneration of root cap cells, formation of tracheal elements, formation of aerenchyma in hydrophytes, trichome development, leaf senescence, sex determination and male-female organ development. Biotic stress factors such as virus, bacteria, fungus and abiotic stress factors such as UV light, drought, salinity, temperature, freezing, flood, heavy metals, pesticides lead to PCD. Under biotic and abiotic stress factors, the balance between antioxidant enzymes and generation of reactive oxygen species (ROS) changes. ROS are free radicals and cause lipid peroxidation, protein oxidation, nucleic acid damage and enzyme inhibition. These alterations in the cellular structures lead to oxidative stress. ROS accumulation also causes caspase-like activities by activating vacuolar processing enzymes, metacaspases, saspases and phytaspases. These proteolytic enzymes execute cell death and cut their substrates from specific amino acid residues such as aspartic acid. PCD can be visualized by light, fluorescence and electron microscopy. Besides DNA fragmentation during cell death is determined by TUNEL, comet assay and gel electrophoresis. Moreover, cytoplasmic cytochrome c identification, caspase like activities and alterations of mitochondrial membrane potential can be identified by biochemical analyses. Although a lot of morphological characteristic features are identified, plant cell death is still not clear with regard to molecular aspects. Molecular characterization of PCD will lead in the future to a better understanding of the mechanisms of plant development and stress tolerance for developing high quality plants.

Keywords: Necrotic cell death, programmed cell death, reactive oxygen species, vacuolar cell death

I. GİRİŞ

Prokaryotik ve ökaryotik canlıların temel karakterlerinden birisi olan ölüm, gerek hücre gerekse organizma düzeyinde sıklıkla karşılaşılan bir olaydır. Hücre ölümü ve hücre bölünmesi çok hücreli canlıların dokularında bir denge halindedir. İnsanlarda hücre bölünmesi ve ölümü arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya kanser, tip II diyabet gibi birçok sistemik hastalık çıkar. Çok hücreli ökaryotlarda, genetik bakımdan düzenlenmiş olan hücre ölümü normal gelişim ve büyüme için gereklidir. İlk kez 1964 yılında Lockshin ve Williams tarafından kullanılan programlı hücre ölümü (PHÖ) terimi, klonal bakteriler ve ökaryotik canlıların normal gelişim sürecinde veya biyotik-abiyotik strese karşı hücrel bir cevabın oluşturulması sırasında ortaya çıkan genetik olarak kontrol altında olan fizyolojik bir süreç olarak tanımlanmaktadır [1]. Diğer bir şekliyle yaşlanmış, görevini yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan kontrollü bir ölüm mekanizmasıdır [2, 3]. Hayvan hücrelerinde PHÖ'nün en iyi karakterize olmuş formu olan apoptoz (Yun: ayrılarak düşmek) terimi ise ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından bölgesel anemiye maruz kalan karaciğer dokusunun etrafında nekrozdan daha farklı özellikler gösteren hücre ölümü için kullanılmıştır [4]. Yakın zamana kadar hücre ölümü, genetik olarak programlı hücre ölümü olan apoptoz ve ani olarak ortaya çıkan programsız hücre ölümü nekroz olarak iki grupta inceleniyordu. Ancak son yıllarda yapılan biyokimyasal ve moleküler çalışmalar sonucunda PHÖ apoptoz, otofaji ve nekroz olarak 3 temel grupta sınıflandırılmıştır (Tablo 1) [5, 6].

Apoptoza uğrayan hücreler karakteristik olarak hacim kaybederek küçülürler. Bunun yanında hücrede sitoplazma ve kromatin yoğunlaşması, 180-200 bp'lik DNA fragmentasyonu, sitosolik Ca^{+2} artışı, fosfatidilserinin hücre zarının dışına göçü, sitoplazma ve nükleus parçaları bulunduran zarla çevrili apoptotik cisimlerin oluşması gibi morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler gözlemlenir. Hayvanlarda apoptoza uğrayan hücrelerden meydana gelen bu apoptotik cisimler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler [7, 8]. Apoptoz, hedef substratların aspartik asit aminoasidinden sonraki peptit bağımlı kırıncı ve kaspazlar (caspases-cysteine aspartic proteinases) olarak bilinen sistein proteinazlar familyasına ait düzenleyici proteinler tarafından başlatılır ve ilerler [9]. Kaspazlar hücreye apoptotik sinyal gelene kadar, hücre içerisinde inaktif prokaspazlar olarak bulunurlar. Bir kez aktive olan kaspaz geri dönüşümsüz olarak çalışmaya başlar ve diğer kaspazları da aktive eder. Kaspaz enzimlerinin yanı sıra antiapoptotik ve proapoptotik proteinlerden oluşan Bcl-2 gen ailesi de (bcl-2, bcl-xL, bax, bak, bad vb.) apoptozda ölüm mekanizmasının düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir [10, 11].

Otofaji (Yun: kendini yeme) evrimsel olarak oldukça korunmuş katabolik bir işlemdir. Otofagozom adını alan sitoplazmanın bir kısmını ve/veya organelleri içeren çift katlı ya da daha fazla zarlara sahip veziküller ile morfolojik olarak karakterize edilirler. Bu tip hücre ölümünde otofagozomlar, asidik hidrolazları içeren lizozomlar veya vakuoller ile birleşerek hücrenin kendi kendini sindirmesine neden olur [12]. Otofajik hücre ölümü, otofaji ile ilişkili genler (autophagy related genes – ATGs) tarafından düzenlenir. Bu tip ölümden apoptotik kaspazların aktivitesi gözlenmez. Otofaji, özellikle açlık, biyotik-abiyotik stres koşulları altında hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi açısından kritik bir rol oynar [13, 14]. Otofajik hücre ölümü çoğunlukla sitoplazmada zarla çevrili keseciklerle ortaya çıkarken, apoptozun ölüm sırasındaki en önemli hedefi nükleus ve DNA'dır [12].

Nekroz (Yun: doku ölümü) ise apoptoz ve otofajiden oldukça farklı özellikler taşır. Hücre ölümü tipleri ilk tanımlandığında, nekroz programlı olmayan, ani ve patolojik bir ölüm olarak değerlendirilmekteydi [5]. Kendine özgü morfolojik özellikler gösteren nekrozda, hücre hacminin artması, hücrel enerji kaynaklarının azalması, hücre zarı ve organellerde ani bozulmalar görülür. Nekrozun ilerlemesiyle hücrenin bütünlüğü bozularak, bulunduğu dokuda bir inflamasyona (yangı) neden olarak parçalanır. Apoptoz ve otofajiden farklı olarak, bu parçalanmada hücrel içerik tamamen sindirilemez, dokudaki diğer hücreler arasında inflamasyona neden olan hücrel artıklar kalır [15, 16, 17].

Tablo 1. Apoptoz, otofaji ve nekrozun morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre karşılaştırılması [18].

Morfolojik-Biyokimyasal Özellikler	Apoptoz	Otofaji	Nekroz
DNA fragmentasyonu	+	-	-
Kromatin yoğunlaşması	+	-	-
Apoptotik cisimler	+	-	-
Sitoplazmada vakuolleşme	-	+	+
Organel yıkılması	-	+	+
Mitokondride şişme	Nadir	Geç evrede	+
Sitoplazmik şişme	-	-	+
Hücre zarının ani parçalanması	-	-	+
ATP tüketimi	+	-	-
Kaspaz aktivitesi	+	-	-
Doku inflamasyonu (yangı)	-	-	+
Hücrel etki	Tek hücre	Tek hücre	Hücre grubu
Markır moleküller	Bcl-2, Kaspazlar, Bax, Bad, Bak	LC3, Beclin-1, Atg ailesi, FIP200	PARP1, TNF α , NF- κ B

II. BİTKİLERDE PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ

Prokaryotlar ve ökaryotlar arasında, benzer morfolojik ve biyokimyasal özellikleri olan PHÖ'nün ortak bir atasal hücre ölümü sürecinden evrimleştiği ve ortak bir düzenleyici mekanizmayı paylaştığı düşünülmektedir [19]. Ölen hücrelerin, komşu hücreler tarafından fagosite edilmesini önleyen hücre çeperine sahip olan bitkilerin, bu evrimsel süreçte kendilerine ait bir yol geliştirdikleri sanılmaktadır. Bunun yanında yapılan moleküler analizlerde, hayvanlardaki apoptotik genlerle dizi homolojisine sahip bitki genleri henüz tanımlanamadığı gibi çok az sayıda korunmuş ortak protein bulunmuştur [20].

Bitkilerde hücre ölümünün biyokimyasal ve moleküler mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Bitkilerde hücre ölümü sırasında görülen nukleus morfolojisindeki değişiklikler, kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu, protoplastta büzülme, hücre iskeletinde değişiklikler ve kaspaz benzeri enzimatik aktiviteler hayvanlardaki apoptoz ile benzer ve ortak morfolojik karakterlerdendir [21]. Ancak bitkilerde meydana gelen PHÖ apoptotik süreç ile gerçekleşmez [21, 22]. Bitkilerdeki PHÖ, vakuoler hücre ölümü ve nekrotik hücre ölümü olarak 2 grupta sınıflandırmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Bitkilerde vakuoler ve nekrotik hücre ölümünün özellikleri [21].

Hücre Ölümü Tipi	Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikler
Vakuoler hücre ölümü	Otofagozomların, küçük ve büyük litik vakuollerin oluşumu
	Sitoiskelet elemanlarının yeniden düzenlenmesi
	DNA fragmentasyonu
	Kromatin yoğunlaşması
	Nukleus zarının bozulması
	Vakuoler işlem enzimlerinin (VPE) aktivasyonu
	Tonoplastın parçalanmasına kadar organellerin bütünlüğünün ve turgorun korunması
	Tonoplastın parçalanması
	Hücre içeriğinin tamamen sindirilmesi
	Hücrenin şişmesi
Nekrotik hücre ölümü	Mitokondrilerde şişme
	Hücre solunumu ve ATP üretiminin durması
	Plazma zarının erken ve ani parçalanması
	Hücre içeriği sindirilemeden artıklar halinde kalması

Hayvanlardaki otofajik hücre ölümü ile ortak özellikler taşıyan vakuoler hücre ölümünde, vakuoller büyük önem taşımaktadır. Bilindiği gibi bitki hücrelerinde 2 tip vakuol vardır. Bunlardan biri çeşitli maddelerin biriktiği depo vakuolu, diğeri ise aspartat proteinazlar, sistein proteinazlar ve

nükleazlar gibi hidrolitik enzimleri içeren litik vakuollerdir [23]. Bitkilerde hücredeki litik vakuollerin hacminin artması ve en sonunda vakuol zarı olan tonoplastın parçalanarak hidrolitik enzimlerin sitoplazmaya geçmesi ile hücre ölümü gerçekleşir. Tonoplastın parçalanmasına kadar kromatinde yoğunlaşma ve DNA fragmentasyonu gözlemlenirken, henüz bozulmamış mitokondri, plastitler gibi sitoplazmik organeller hücrede varlığını ve aktivitesini korur. Vakuolün parçalanması ile birlikte tüm hücresel yapıların yıkılması gerçekleşir. Bunun yanında nekrotik hücre ölümünde plazma zarı ve organellerin erken ve ani parçalanması gerçekleştiği için vakuoler hücre ölümünden farklı özellikler gösterir. Nekrotik hücre ölümünde hücre ve hücre organelleri şişer, plazma zarı erken bozulma gösterir, mitokondri yapısı bozulduğu için hücre solunumu gerçekleşemez. Bununla birlikte bu tip ölümde hücrede reaktif oksijen türleri (ROT) artar ancak ATP üretimi azalır. Bitkilerde vakuoler hücre ölümü gelişim veya stres koşulları altında gerçekleşen fizyolojik bir olayken, nekrotik hücre ölümü bitkinin karşılaştığı ani ve şiddetli stres koşulları altında oluşan patolojik bir ölüm sürecidir [21].

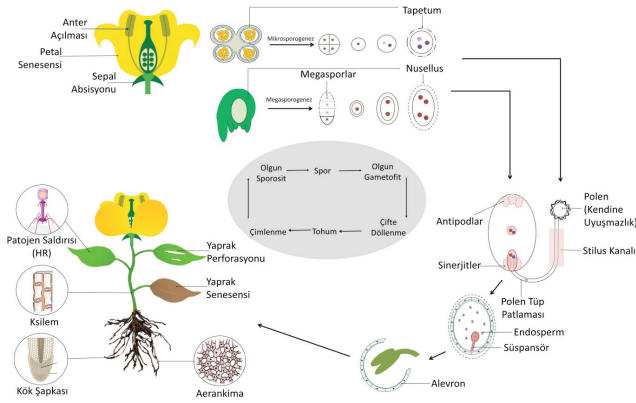
Bitkilerin çeşitli vejetatif ve generatif doku ve organlarının gelişimi ve olgunlaşması sırasında vakuoler hücre ölümü görülür. Bu PHÖ'nün ilgili hücrelerde zamanından önce veya geç görülmesi ya da hiç gerçekleşmemesi doku ve organ gelişiminde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara sebep olur. Bunun yanında bitkilerin maruz kaldığı biyotik ve abiyotik stres şartlarında da bitkilerin değişik doku ve organlarında PHÖ görülür.

2.1. Bitkilerde Gelişim Sırasında Görülen Programlı Hücre Ölümü

İletim demetli bitkiler embriyogenez, dölleme, doku ve organların normal gelişimleri sırasında PHÖ'ye uğrarlar (Şekil 1). Bitkiyi toprağa bağlayan vejetatif bir organ olan kök toprak içerisinde ilerlerken kök şapkası hücreleri onu mekanik zararlardan korur. Zarar gören veya yaşlanan kök şapkası hücreleri PHÖ'ye uğrayarak hızlı bir gelişim sürecinden geçer. Bitkilerde PHÖ sürecinden geçen ksilem elemanlarından trake-trakeitlerin oluşumu *Zinnia elegans*'ta ayrıntılı bir biçimde incelenmiştir. *Z. elegans*'ta mezofil hücrelerinin trakeal elementlere değişimi sırasında vakuoler hücre ölümü meydana gelir. Ancak çok hızlı gerçekleşen bu ölüm sürecinde nukleus değişiklikleri ve DNA fragmentasyonu gözlemlenmez. Hücresel içeriğin hızlı bir şekilde sindirilmesinden sonra geriye sekonder çeperlerden oluşan boru şeklinde hücreler kalır. Özellikle su bitkilerinin kök korteks tabakasında çeşitli gazların depo edilebilmesi için büyük boşlukların oluşumu sırasında da parankimatik

hücreler PHÖ'ye uğrar. Böylece havalandırma parankiması (aerenkima) oluşur. Bunların yanında sklerenkima oluşumu, trikoma (tüy) gelişimi, yaprak absisyonu ve senesensi, çiçeklerde dişi veya erkek eşeyin belirlenmesi ve üreme organlarının gelişimi sırasında PHÖ normal bir süreç şeklinde ortaya çıkar [24, 25, 26, 27].

Dişi ve erkek üreme organlarının gelişimi, bitkilerde PHÖ'nün gösterilmesi için zengin bir araştırma alanıdır. Erkek eşey organı gelişimi sırasında anter loblarını bir arada tutan konnektif doku, anter çeper tabakalarından tapetum, endotesyum ve ara tabaka hücreleri, polen tanelerinin tam olarak gelişip doğaya salınması için zamanı geldiğinde hücre ölümüne uğrarlar. Bunun yanında kendine uyumsuz bitkilerde polenlerin pistil ile etkileşimi sırasında, polen tüpü stilus içinde hücre ölümüne uğrayarak mikropile ulaşmadan körelir. Stilüste polen tüpünün geçişi için kanal yapısı bulunmayan türlerde tüpün ilerlediği yere rastlayan hücrelerde de PHÖ gerçekleşir. Dişi eşey organının gelişiminde ise mayoz sonunda faal olmayan megasporlarda, nusellus dokusunda, embriyo kesesi hücrelerinden sinerjit ve anti-potlarda, embriyoyu endosperma (besi doku) içine iten suspansör hücrelerinde, apomiktik kese oluşumunda ve tohum çimlenmesi sırasında endospermada PHÖ görülür [26, 28, 29, 30, 31].



Şekil 1. Bitkilerde gelişim sırasında vejetatif ve generatif organlarda görülen hücre ölümü [30].

Durme ve Nowack [32] bitkilerin gelişimi sırasında görülen hücre ölümünü 3 evreye ayırmıştır. 1. evrede öncelikle sinyal molekülü olan farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin tetiklemesi ile hücre ölümünde görevli hidrolitik enzimler litik vakuollerde birikmeye başlar. 2. evrede Ca^{+2} ve ROT gibi sekonder sinyal molekülleri hücre içinde ölüm mekanizmasını başlatırlar. Hücre ölümü öncelikle litik vakuoller içerisinde hidrolitik enzimlerin yardımıyla otofajik olarak gerçekleşmeye başlar. Sitosolik pH'nın düşmesi ile birlikte

hidrolitik enzimler sitoplazmaya geçmeye başlar. 3. evrede ise tonoplast ve sonrasında plazma zarı parçalanır. Hücrenin geriye kalan tüm bileşenleri sindirilir. Bazı tip hücrelerde (tapetum, megasporlar vb.) hücre ölümü sırasında hücre çeperi de tamamen sindirilirken, bazılarında ise (ksilem elemanları, sklerenkima vb.) sindirilmeden kalır. Her ne kadar bitkilerde gelişim sırasında görülen hücre ölümünün genetik olarak kontrol altında olduğu bilirse de, yaprak gibi bitki organlarının yaşlanarak ölümü olarak tanımlanan senesense bu genetik kontrol ani mevsimsel değişiklikler gibi çevresel etmenlerden de etkilenmektedir [30, 32].

2.2. Bitkilerde Stres Sırasında Görülen Programlı Hücre Ölümü

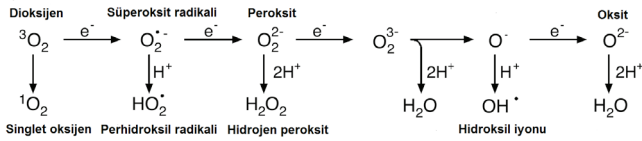
Bitkilerin bazı doku ve organları biyotik ve abiyotik stres koşulları altında PHÖ'ye uğrarlar [28, 33]. Bitkilerde çok yaygın olarak görülen virüs, bakteri, mantar gibi patojenlerin bitkiye bulaşması sonucunda ortaya çıkan ölüm "Aşırı Duyarlılık Cevabı" (Hypersensitive Response-HR) olarak adlandırılmaktadır [34]. Biyotik stres şartlarında ortaya çıkan bu ölüm sırasında, bir patojenin bitki tarafından tanınması ile programlı ölüm mekanizması hızlı bir şekilde devreye girer. Enfekte olan hücreler fenoller gibi çeşitli sekonder metabolitleri üreterek hem kendisinin ölümüne hem de çevresindeki hücreleri uyarak onların ölümüne sebep olur. Böylece patojenin enfekte ettiği hücrenin etrafını çeviren ölü hücrelerden oluşan bir tabaka meydana gelir. HR ile dokuda meydana gelen ölüm, patojenin daha fazla hücreyi etkileyip yayılmasını engellemekte ve bir sinyal oluşturarak bitkinin diğer savunma mekanizmalarını uyurabilmektedir [35]. Her ne kadar HR nekrotik ölüme benzer özellikler gösterse de litik vakuollerin oluşumu, otofajik aktivitenin artması, ROT artışı ve tonoplast parçalanması sonucunda gösterdiği hücre bozulma özellikleri bakımından vakuoller hücre ölümüyle ortak özellikler göstermektedir. Ancak nekrotik hücre ölümünde olduğu gibi ölüm sonrasında hücre artıklar tamamen sindirilemeden kalır [21].

Bitkiler biyotik stres faktörlerinin yanında yer değiştirememelerinden dolayı yaşam döngüleri boyunca büyüme ve gelişmelerini olumsuz yönde etkileyecek düzeyde UV ışık, kuraklık, tuzluluk, sıcaklık, donma, sel, ağır metaller, pestisitler, nanopartiküller gibi birçok abiyotik stres faktörü ile karşılaşılırlar. Biyotik stres koşullarında olduğu gibi abiyotik stres koşulları altında da ROT'ların üretimi artmaktadır. Hücresel ROT konsantrasyonunun artması durumunda, antioksidan savunma sistemleri ve ROT üretimi arasındaki denge bozulmakta ve zincirleme reaksiyonlar şeklinde bitkiler oksidatif strese girmektedir. Stres altında ROT üretiminin artışı lipidlerin peroksidasyonuna, proteinlerin

oksidasyonuna, nükleik asit hasarına, enzim inhibisyonuna neden olur ve bunların sonucunda PHÖ ortaya çıkar [36, 37, 38]. PHÖ stresin bitkiyi etkilemesine bağlı olarak ya bazı doku ve organlarda veya tüm bitkide gözlemlenebilir. Stres koşulları altında bitkilerde gözlemlenen hücre ölümü bitkinin normal gelişimini etkilediği gibi tarımsal açıdan bakıldığında verimi ve ürün eldesini de etkilemektedir. Bu durumda ekonomik bakımdan zararlara sebep olmaktadır.

2.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücre Ölümündeki Rolü

Reaktif oksijen türleri (ROT) bitkilerde endojen olarak kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda çeşitli enerji dönüşüm reaksiyonları sırasında oluşan serbest radikallerdir [39]. Bitkinin normal gelişim sürecinde de sentezlendikleri halde detoksifikasyon mekanizması ile aralarındaki denge sayesinde zararlı etki oluşturmazlar [40]. ROT'lar diğer moleküllere elektron verebildiklerinden ya da onlardan elektron alabilmelerinden dolayı organizmada indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar [41]. Hücrelerde bilinen başlıca ROT'lar moleküler oksijenin (O_2) indirgenmiş formlarıdır (Şekil 2). O_2 molekülünün elektron alması ile açığa çıkan ve en çok rastlanan ROT'lar singlet oksijen (1O_2), süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), peroksit (O_2^{2-}), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil iyonu (OH^{\cdot})'dur [42].



Şekil 2. Moleküler oksijenin indirgenerek ROT'ların oluşumu [43].

Gelişimsel ve çevresel strese karşı toleransı da kapsayan birçok hücrel süreçte ROT'lar düşük konsantrasyonlarda sekonder mesajcılar olarak da rol oynamaktadırlar. Ancak yüksek konsantrasyonda üretilen ROT'lar hücrede zararlı ve zincir etkilere sebep olmaktadır. Hücrede fazla üretilen ROT'ların detoksifikasyonu antioksidan enzimler ve enzimatik olmayan antioksidan sistemleri ile gerçekleştirilir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat glutatyon (AsA-GSH), askorbat peroksidad (APX), hidrojen peroksidad (POD) ve glutatyon redüktaz (GR) ROT'ların detoksifikasyonun rol alan antioksidan enzimlerdir. Askorbat (AsA), glutatyon (GSH), karotenoidler, tokoferoller ve fenolik bileşikler ise enzimatik olmayan antioksidanlar adı altında incelenmektedir [44]. Bitkilerde antioksidan savunma mekanizmasının aktivitesi çeşitli çevresel streslerin uyarmasına

bağlı olarak oluşan oksidatif stresin yok edilmesi sırasında artış gösterir. Bitkinin ROT'ları detoksifiye etmek için yüksek antioksidan kapasitesini koruması bitkinin strese olan toleransına bağlıdır. Hücre içerisinde anormal ROT birikiminin en önemli ROT yakalayıcı enzim olan katalazın yıkımına sebep olmaktadır. Bunun yanında ROT birikimi farklı mekanizmalar ile DNA'nın baz ve şekerinde hasar, tek ve çift zincir kırıkları, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım modifikasyonlara sebep olur. Bu şekilde hücrede artarak biriken ROT'lar PHÖ sürecinin başlayarak ilerlemesine sebep olur [45, 46].

Bitki gelişimde olduğu gibi abiyotik veya biyotik stres koşullarına maruz kalmış bitkilerde gelişen hücre ölümünün ROT miktarının değişmesi ile kontrol edildiği bilinmektedir [47]. En iyi bilinen gelişimsel hücre ölümü tipi olan organ senesensi ve çimlenme sırasında alevronlarda gerçekleşen hücre ölümünün, ROT ve etilen hormonu işbirliği ile gerçekleştiği bilinmektedir. ROT üretilmesi ve detoksifiye edilmesi arasındaki denge; herbisitler ve patojen saldırılar gibi çeşitli biyotik stresler veya tuzluluk, UV radyasyonu, kuraklık, ağır metaller, aşırı sıcaklık, besin eksikliği ve hava kirliliği gibi çeşitli abiyotik stresler tarafından bozulur. Bu dengenin bozulması, hücreler arasındaki ROT miktarının aniden artmasına ve hücre yapısında oksidatif hasara neden olabilir [48]. PHÖ her türdeki ROT'lar ile başlatılabilir. Hidroksil radikalleri lipid peroksidasyonunu başlatarak hem kendileri hem de bu olay sonucu açığa çıkan diğer ROT'lar ile hücre ölümünü başlatıp devam ettirebilir [39].

Pirinç *drc1* mutantında ROT birikiminin olmaması sebebiyle tapetal PHÖ'nün geciktiği ve steril (kısır) polenlerin geliştiği belirlenmiştir [49]. *Arabidopsis*'te ise tapetal PHÖ'nün zamanlaması ROT üretimindeki değişimler sebebiyle gecikmiş ve bunun sonucunda polen tanelerinin gelişimi ve olgunlaşmasında aksamalar meydana gelmiştir [50]. ROT birikiminin PHÖ'de rol oynayan proteazları aktive ettiği bilinmektedir. Bu durumun en iyi örneği haşhaşa kendine uyumsuz polenlerin polen tüplerinin oluşumu sırasında ve spermin yumurtaya nakli sırasında polen tüplerindeki ROT artışı verilebilir [51, 52]. Gelişim sırasında ROT üretimi ve birikiminin arttığı gibi, stres koşulları altında da ROT ve buna bağlı olarak antioksidan enzim artışı gözlenmektedir. Alüminyum stresine maruz kalan arpa köklerinde ROT artışı, süperoksit dismutaz ve peroksidad enzim aktivitesi ve bunların sonucu olarak da DNA fragmentasyonu gözlemlenmiştir [53].

2.4. Bitkilerde Kaspaz Benzeri Aktiviteler

Hayvan hücrelerinde PHÖ'nün en iyi karakterize olmuş formu olan apoptoz oldukça korunmuş ve kaspazlar olarak

bilinen sistein proteinaz ailesi tarafından yürütülür. Kaspazlar hedefledikleri substratları P1 pozisyonunda aspartik asit birimlerinden keserler. Kaspazlar hücre içerisinde inaktif zimojenler olarak sentezlenirler ve prokaspaz adını alırlar. Bu inaktif prokaspaz enzimleri apoptoz sinyalinin alınmasıyla birlikte aktifleşirler ve aktifleşen bu kaspazlar diğer inaktif kaspazları aktive ederler. Memelilerde 13 farklı kaspaz enzimi vardır. Bunlardan kaspaz-2, -8, -9, -10 başlatıcı, kaspaz-3, -6, -7 infazcı, kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -14 ise enflamatuvar kaspazlardır [54].

Bitkilerde proteoliz hücre yapısında birçok enzimi ve çeşitli proteolitik yolları içeren karmaşık bir süreçtir [55]. Bitkilerde gelişme, patojen ve abiyotik stres nedenli hücre ölümü ile ilişkili çok çeşitli proteolitik enzim bilinmektedir. Son yıllardaki çalışmalar hayvanlardaki kaspazlarla yapısal homoloji gösteren sistein proteinaz ve serin proteinazların hücre ölümünde rol aldığını (Tablo 3) ve hayvanlardaki kaspazlara benzer olarak substratlarını aspartik asit, aspargin, arginin veya lizinden sonra kestiğini ortaya koymuştur [54, 56]. Birçok destekleyici çalışma hücre ölümüne uğrayan bitkilerin ekstrelerinin insan kaspaz - 1 substratı YVAD-AMC ve insan kaspaz - 3 substratı DEVD-AMC gibi sentetik kaspaz substratlarına etki ettiğini göstermiştir. Benzer olarak YVAD-CHO ve DEVD-CHO gibi kaspaz inhibitörlerinin bitki hücre ölümünü birçok sistemde baskıladığı gösterilmiştir [19, 20, 57]. Bu çalışmalar bitkilerde kaspaz benzeri aktivitenin varlığını kuvvetli bir şekilde ortaya koyar. Çok hücreli organizmalarda muhtemel hücre ölümünün kökeni ve apoptozun bazı özelliklerinin korunmasının kısmen de olsa moleküler seviyede yansımaları beklenmektedir. Fakat *Arabidopsis* genom dizisi tamamlandığı halde sadece çok az bitki geninin memelilerde görülen apoptoz geni ile ortak olduğu görülmüştür. Bitkilerde kesin kaspaz homologları olmadığı halde ölen bitki hücrelerinde proteolitik kaspaz benzeri aktivitenin artması, hayvan kaspazları ile fonksiyonel olarak eş olan özel bitki proteinazlarının bulunduğunu düşündürür [20, 58, 59, 60].

İlk kez 1998'de tütünde bakteriler tarafından oluşturulan PCD'de sentetik kaspaz - 1 substratına karşı proteolitik aktivite gözlemlenmiştir [56]. Bitkilerde vakuollerde bulunan ve kaspaz - 1 substratını katalizleyen bir sistein proteinaz olan vakuoler işlem enziminin (Vacuolar processing enzyme-VPE) gelişim ve stres sırasında hücre ölümünde kritik rol oynadığı belirlenmiştir [61]. Bu bulgularla birlikte kaspaz benzeri aktivite çeşitli sentetik kaspaz substratları kullanılarak belirlenmiştir [62, 63]. Bunun yanında son yıllarda protoza, mantar ve bitkilerde ortak olarak bulunan bir sistein proteinaz olan kaspaz ortologları da bulunmuştur. Metakaspazlar hayvansal kaspazlarla yapısal benzerlik gösterse de substratlarını arjinin ve lizin aminoasitlerinden

sonra kesmektedirler. *Arabidopsis* ile yapılan çalışmalarda 9 farklı metakaspazın farklı düzeylerde farklı dokularda sentezlendiği belirlenmiştir [64]. *Avena sativa*'da (yulaf) patojen saldırısı sonucunda meydana gelen PHÖ'nde kaspaz - 6 benzeri aktivite gösteren serin proteinazlara ait fitaspaz ve saspaz aktiviteyi gözlemlenmiştir. Buna ek olarak *Arabidopsis thaliana*'da 26S proteozom $\beta 1$ alt ünitesinin ksilem gelişiminde ve bakteri enfeksiyonu sırasında kaspaz - 3 substratını katalizleyerek PHÖ'ne aracılık ettiği belirlenmiştir [54].

Tablo 3. Bitkilerde programlı hücre ölümü ile ilişkili proteinazlar

Proteinaz adı	Proteinaz ailesi	Substrat	Etki ettikleri kaspaz substratı
VPE	Sistein proteinaz	Asparjin Aspartik asit	YVAD (kaspaz-1 substratı)
26S proteozom $\beta 1$ alt ünitesi	Treonin proteinaz	Glutamik asit Aspartik asit	DEVD (kaspaz-3 substratı)
Saspaz	Serin proteinaz	Aspartik asit	VKMD (kaspaz-6 substratı)
Fitaspaz	Serin proteinaz	Aspartik asit	IETD (kaspaz-8 substratı)
Metakaspaz	Sistein proteinaz	Arjinin, lizin	VEID (kaspaz-6 substratı)

III. BİTKİLERDE PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜNÜN ANALİZİ

Hayvan hücrelerinde olduğu gibi bitki hücrelerinde de PHÖ süreci birçok yöntem ile baştan sona gözlemlenebilir. PHÖ'nün varlığı temel olarak mikroskopik teknikler kullanılarak belirlenir. Özellikle hematoksilen, toluidin mavisi gibi genel yapı boyalarının kullanılması ile nükleus morfolojisindeki değişiklikler karşılaştırmalı olarak saptanabilir. Nükleus ve kromatin değişiklikleri DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), Hoechst, propidium iodit gibi nükleus ve kromatine özgü işaretleyiciler yardımıyla floresan mikroskopta da görüntülenebilir. PHÖ ile DNA'da nukleozomlar arası bölgelerde oluşan kırıklar TUNEL (TdT-dUTP nick-end-labelling) yöntemi ile de özgül olarak belirlenebilir. Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi ve fluorescein gibi floresan boyalarla işaretli nükleotidler kullanılarak yapılan *in situ* işaretleme ile ışımaya yapan (PHÖ geçiren) ve ışımaya yapmayan (PHÖ geçirmeyen) hücreler belirlenebilir. Nükleus ve kromatin yapısındaki değişikliklerin yanı sıra PHÖ sırasında hücrenin ince yapısında meydana gelen değişiklikler, elektron mikroskobu kesitleri ile ayrıntılı olarak incelenebilir [65]. Vardar ve Ünal [26] *Lathyrus undulatus* L. anter çeper tabakalarından tapetumun gelişimini ayrıntılı olarak incelemiştir. Tapetumun gelişimi sırasında PHÖ'nün polen taneleri tetrattan salındıktan sonra başladığı toluidin

mavisi, DAPI ve TUNEL işaretleme yöntemleriyle saptanmıştır. Araştırmacılar ayrıca elektron mikroskobu ile PHÖ sırasında hücrenin ince yapısında meydana gelen değişiklikleri de ayrıntılı olarak belirlemişlerdir. Araştırmacıların elde ettikleri sonuçlara göre, PHÖ vakuolleşme, nukleus ve kromatin değişiklikleri ile başlayıp, tonoplastın parçalanmasıyla birlikte tüm hücrel içeriğin sindirilerek sonlanmaktadır.

Mikroskopik tekniklerin yanı sıra PHÖ'nün belirlenmesi için en sık kullanılan yöntem genomik DNA'da meydana gelen fragmentasyonun belirlenmesidir. Bu amaç için genomik DNA agaroz jel elektroforezinde yürütülür. PHÖ geçirmeyen örneklerde genomik DNA jelde ilerleme göstermezken, DNA'sı fragmente olmuş örneklerde farklı büyüklüklerdeki DNA parçaları jelde farklı hızlarda ilerleyerek merdiven basamağı görüntüsü oluşturur. Jel elektroforezi yöntemi nekroz ve vakuoler hücre ölümünün karşılaştırılmasında da kullanılabilir. Nekrozda ani ve rastgele DNA parçalanması gerçekleştiği için bu parçalar jelde ilerlerken merdiven basamağından çok, yayılmış (smear) bir görüntü verir [65]. Agaroz jel elektroforezi yönteminin yanında PHÖ kaynaklı DNA hasarı komet yöntemiyle de belirlenebilmektedir. Bitkisel materyalden izole edilen nukleuslar etidyum bromür, akrinin oranj gibi DNA bağlayıcı floresan boyalarla boyanırlar [16]. Eğer DNA kırık içeriyorsa, gevşemiş ve kırılmış DNA parçaları elektrik yüklü ortamda, nukleustan anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü verir. DNA hasarını saptamak için kuyruk uzunluğu ölçülerek hasarın büyüklüğü karşılaştırılmalı olarak belirlenir. Kontrol grubundaki nukleuslarda DNA fragmentasyonu olmadığı için kuyruk oluşumu görülmez, küresel şeklini korur [66]. Vardar ve ark. [67] farklı Gramineae türlerinde, abiyotik stres faktörlerinden biri olan alüminyum (Al) toksisitesinin PHÖ'nün hangi saatte başladığını belirlemek için agaroz jel elektroforezini kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre Al toksisitesi tritikale, çavdar, arpa ve yulafta 2 saat içerisinde PHÖ'nün belirteçlerinden biri olan DNA fragmentasyonuna sebep olmuştur. Benzer şekilde Yanık ve Vardar [68] nanopartikül stresine maruz kalmış köklerde zaman ve doza bağımlı olarak DNA fragmentasyonu gözlemlenmiştir. Bunun yanında tritikale, buğday ve çavdar köklerinde Al toksisitesi 15. dakikadan itibaren komet analizi kullanılarak, uzamış kuyuk oluşumlarının ölçülmesi ile belirlenmiştir [69].

Daha önce de belirtildiği gibi bitkilerde kaspaz benzeri aktiviteler hayvan hücrelerindeki kaspaz substratları ve inhibitörleri kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenebilir. Birçok araştırmacı bitkilerde özellikle abiyotik stres sonucunda oluşan kaspaz benzeri aktiviteyi kaspaz-1 (YVAD), kaspaz-3 (DEVD), kaspaz-8 (IETD) ve kaspaz-9 (LEHD) substratlarını kullanarak kolorimetrik ve florometrik olarak ölçmüşlerdir [62, 63]. Bunun yanında PHÖ sırasında hem

hayvan hem de bitki hücrelerinde ortak olarak gözlemlenen mitokondrilerden sitokrom c salınımı western blotlama (immunoblotlama) yöntemiyle belirlenebilmektedir. Bu yöntemde hücrelerden izole edilmiş bir protein karışımı içindeki belirli bir proteinin varlığını ve büyüklüğünü saptamak için antikör-antijen özgüllüğü kullanılır. Panda ve ark. [70] Al stresine maruz kalan tütün hücrelerindeki mitokondriyel değişiklikleri izlemişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları ayrıntılı çalışmalar sonucunda hücrede ROT'ların artması ile birlikte mitokondri iç zarının potansiyelinde değişiklikler meydana geldiği ve bunun sonucunda da sitokrom c'nin sitoplazmaya salınarak PHÖ'ne sebep olduğunu belirtmişlerdir.

IV. SONUÇ

PHÖ prokaryotik ve ökaryotik tüm canlılarda gelişimsel ve çevresel sinyallerin tetiklenmesi ile başlayan, genetik olarak kontrol altında olan bir süreçtir. Bitkiler de hücre ölümü hayvanlardaki apoptozla ortak morfolojik özelliklere sahiptir. Ancak hayvanlardaki apoptotik genlerle dizi homolojisine sahip bitki genleri ve homolog proteinler henüz tanımlanamamıştır. Morfolojik bakımdan gelişim sırasında görülen hücre ölümünün vakuoler hücre ölümü tipinde, strese bağımlı hücre ölümünün ise hem nekrotik hem de vakuoler hücre ölümü tipinde olduğu belirlenmiştir. Ancak PHÖ'nün başlatılması, devamı ve sonuçlanması sırasında gerçekleşen moleküler olaylar ve transkripsiyon faktörleri henüz aydınlatılamamıştır. Bunun yanında gelişimsel ve stres kaynaklı PHÖ'nün aynı veya farklı mekanizma tarafından mı kontrol edildiği de hala tartışma konusudur [60]. Bitkilerde hücre ölümünü kontrol eden proteinlerin ve genlerin tanımlanarak anlaşılması, özellikle stres koşulları altında gelişen hücre ölümünün engellenmesi ve bitkide strese karşı tolerans mekanizmasının geliştirilmesi açısından önemlidir. Çevresel streslere karşı tolerans geliştirilmesi, gelecekte birçok tarımsal ürünün ıslahı ve veriminin artırılması bakımından çok önemlidir. Bunun yanında normal gelişim sırasında meydana gelen PHÖ'nün erken gerçekleşmesi, gecikmesi veya hiç olmaması ile gerçekleşen gelişimsel bozuklukların önlenmesinde de yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Lockshin, R.A., Williams, C.M., (1964). Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of Insect Physiology*, 10, 643-649.
- [2] Bayles, K.W., (2014). Bacterial programmed cell death: Making sense of a paradox. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 63-69.

- [3] Wang, J., Bayles, K.W., (2013). Programmed cell death in plants: Lessons from bacteria? *Trends in Plant Science*, 18(3), 133-139.
- [4] Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-257.
- [5] Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovskiy, B., Melino, G., Kroemer, G., (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 107-120.
- [6] Green D.R., Galluzzi L., Kroemer G., (2011). Mitochondria and the autophagy–inflammation–cell death axis in organismal aging. *Science*, 333(6046), 1109-1112.
- [7] Hengartner, M.O., (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-776.
- [8] Elmore, S., (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
- [9] Jacobsen, M.D., Weil, M., Raff, M.C., (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88, 347-354.
- [10] Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H., (1999). Mammalian caspases: Structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 383-424.
- [11] Denault, J.B., Salvesen, G.S., (2002). Caspases: Keys in the ignition of cell death. *Chemical Reviews*, 102, 4489-4499.
- [12] Öz-Arslan, D., Korkmaz, G., Gözüaçık, D., (2009). Otofajji: Bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2, 184-194.
- [13] Ouyang, W., Liao, W., Luo, C.T., Yin, N., Huse, M., Kim, M.V., Peng, M., Chan, P., Ma, Q., Mo, Y., Meijer, D., Zhao, K., Rudensky, A.Y., Atwal, G., Zhang, M.Q., Li, M.O., (2012). Novel foxo1-dependent transcriptional programs control T-reg cell function. *Nature*, 22, 491(7425), 554-559.
- [14] Michaeli, S., Galili, G., Genschik, P., Fernie, A.R., Avin-Wittenberg, T., (2016). Autophagy in plants: What's new on the menu. *Trends in Plant Science*, 21(2), 134-144.
- [15] Leist, M., Jaattela, M., (2001). Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(8), 589-98.
- [16] Wu, J.J., Poon, K.Y., Channual, J.C., Shen, A.Y., (2012). Association between tumor necrosis factor inhibitor therapy and myocardial infarction risk in patients with psoriasis. *Archives of Dermatology*, 148(11), 1244-50.
- [17] McCall, K., (2010). Genetic control of necrosis – another type of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(6), 882-888.
- [18] Galluzzi, L., Vitale, I., Kroemer, G., (2011). Cell death signaling and anticancer therapy. *Frontiers in Oncology*, 1, 1-18.
- [19] Woltering, E.J., Van der Bent, A., Hoeberichts, F.A., (2002). Do plant caspases exist? *Plant Physiology*, 130, 1764-1769.
- [20] Danon, A., Rotari, V.I., Gordon A., Mailhac N., Gallois, P., (2004). Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis* which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and defender against apoptotic death. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 779-787.
- [21] van Doorn, W.G., Beers, E.P., Dangl, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A.M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L.A., Petersen, M., Smertenko, A., Taliansky, M., Van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E., Zhivotovskiy, B., Bozhkov, P.V., (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation*, 18(8), 1241-1246.
- [22] Gunawardena, A.H., (2008). Programmed cell death and tissue remodelling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 59(3), 445-51.
- [23] Huang, S., Mira, M.M., Stasolla, C., (2016). Dying with style: Death decision in plant embryogenesis. In: *In vitro embryogenesis in higher plants*, M.A. Germaná, M. Lambardi, (eds), Springer, New York, USA. s. 101-115.
- [24] Munné-Bosch, S., (2016). Flower senescence and other programmed cell death processes in plants: Attribute to the late Wouter G. Van Door. *Journal of Experimental Botany*, 67(20), 5885-5886.
- [25] Hülskamp, M., (2004). Plant trichomes: A model for cell differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(6), 471-480.
- [26] Vardar, F., Ünal, M., (2012). Ultrastructural aspects and programmed cell death in the tapetal cells of *Lathyrus undulatus* Boiss. *Acta Biologica Hungarica*, 63(1), 52-66.
- [27] Çetinbaş-Genç A., (2016). Türkiye endemiği olan *Crataegus tanacetifolia* (Lam.) Pers. (Alıç)' in üreme biyolojisinin analizi. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, Türkiye, s. 106-107.
- [28] Wu, H.M., Cheung, A.Y., (2000). Programmed cell death in plant reproduction. *Development*, 44, 267-281.
- [29] Wei, C.X., Lan, S.Y., Xu, Z.X., (2002). Ultrastructural features of nucleus degradation during programmed cell death of starchy endosperm cells in rice. *Acta Botanica Sinica*, 44, 1396-1402.
- [30] Van Hautegeem, T., Waters, A.J., Goodrich, J., Nowack, M.K., (2015). Only in dying, life: programmed cell death during plant development. *Trends in Plant Science*, 20: 102-113.
- [31] Vardar, F., Ünal, M., (2011). Development and programmed cell death in the filament cells of *Lathyrus undulatus* Boiss. *Caryologia*, 64(2), 164-172.
- [32] Van Durme, M., Nowack, M.K., (2016). Mechanisms of developmentally controlled cell death in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 29, 29-37.

- [33] Drew, M.C., He, C.J., Morgan, P.W., (2000). Programmed cell death and aerenchyma formation in root. *Trends in Plant Science*, 5, 123-127.
- [34] Jones, A.M., Dangl, J.L., (1996). Logjam at the styx: Programmed cell death in plants. *Trends in Plant Science*, 1, 1360-1385.
- [35] Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., Dangl, J.L., (1994). *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell*, 77, 565-577.
- [36] Smirnov, N., (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125, 27-58.
- [37] Sghery, C.L.M., Pinzino, C., 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.
- [38] Büyüç, İ., Soydam-Aydın, S., Aras, S., (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69, 2, 97-100.
- [39] Van Breusegem, F., Dat, J. F., (2006). Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*, 141, 384-390.
- [40] Levitt, J., (1972). Responses of plants to environmental stresses. New York, London.
- [41] Flora, S. J., (2007). Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cellular and Molecular Biology*, 53, 1-2.
- [42] Gill, S.S., Tuteja, N., (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- [43] Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., Laloi, C., (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, 28, 1091-1101.
- [44] Noctor, G., Foyer, C. H., (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, 49, 249-279.
- [45] Zaefyzadeh, M., Quliyev, R., Babayeva, S., Abbasov, M., (2009). The effect of the interaction between genotypes and drought stress on the superoxide dismutase and chlorophyll content in durum wheat landraces. *Turkish Journal of Biology*, 33, 1-7.
- [46] Chen, Q., Zhang, M., Shen, S., (2010). Effect of salt on malondialdehyde and antioxidant enzymes in seedling roots of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 273-278.
- [47] Apel, K., Hirt, H., (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- [48] Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidant defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, Article ID 217037, 26.
- [49] Yi, J., Moon, S., Lee, Y.S., Zhu, L., Liang, W., Zhang, D., Jung, K.H., An, G., (2016). Defective tapetum cell death 1 (DTC1) regulates ROS levels by binding to metallothionein during tapetum degeneration. *Plant Physiology*, 170, 1611-1623.
- [50] Xie, H.T., Wan, Z.Y., Li, S., Zhang, Y., (2014). Spatiotemporal production of reactive oxygen species by NADPH oxidase is critical for tapetal programmed cell death and pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26, 2007-2023.
- [51] Wilkins, K.A., Poulter, N.S., Franklin-Tong, V.E., (2014). Taking one for the team: Self-recognition and cell suicide in pollen. *Journal of Experimental Botany*, 65, 1331-1342.
- [52] Duan, Q., Kita, D., Johnson, E.A., Aggarwal, M., Gates, L., Wu, H.M. Cheung, A.Y., (2014). Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 5, 3129.
- [53] Yalçın, G., Vardar, F., (2016). The alleviating effects of salicylic acid application against aluminium toxicity in barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Biologia*, 71(12), 1338-1344.
- [54] Hatsugai, N., Yamada, K., Goto-Yamada, S., Hara-Nishimura, I., (2015). Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Frontiers in Plant Science*, 6, 234.
- [55] Grudkowska, M., Zagdańska, B., (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, 51, 609-624.
- [56] Coffeen, W.C., Wolpert, T.J., (2004). Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell*, 16, 857-873.
- [57] Del Pozo, O., Lam, E., (1998). Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Current Biology*, 8(20), 1129-1132.
- [58] Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L., Pisabarro, M.T., Sesagiri, S., Koonin, E.V., Dixit, V.M., (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT Lymphoma. *Molecular Cell*, 6, 961-967.
- [59] Suarez, M.F., Filonova, L.H., Smertenko, E.I., Clapham, D.H., von Arnold, S., Zhivotovsky, B., Bozhkov, P.V., (2004). Metacaspase dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Current Biology*, 14, 339-340.
- [60] Huysmans, M., Lema, S., Coll, N.S., Nowack, M.K., (2017). Dying two deaths-Programmed cell death regulation in development and disease. *Current Opinion in Plant Science*, 35, 37-44.
- [61] Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*, 305, 855-858.
- [62] Ayturk, O., Vardar, F., (2014). Aluminum-induced caspase-like activities in some Gramineae species. *Advances in Food Sciences*, 37(2), 71-75.
- [63] Yanik, F., Ayturk, O., Vardar, F., (2017). Programmed cell death evidence in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots induced

- by aluminum oxide (Al₂O₃) nanoparticles. *Caryologia*, 70(2), 112-119.
- [64] Tsiatsiani, L., van Breusegem, F., Gallois, P., Zavalov, A., Lam, E., Bozhkov, P.V., (2011). Metacaspases. *Cell Death and Differentiation*, 18, 1279-1288.
- [65] Güleş, Ö., Eren, Ü., (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 73-78.
- [66] Fidan, A.F., (2005) DNA Hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(1), 41-52.
- [67] Vardar, F., Çabuk, E., Aytürk, Ö., Aydın, Y., (2016). Determination of aluminum induced programmed cell death characterized by DNA fragmentation in Gramineae species. *Caryologia* 69, 111-115
- [68] Yanık, F., Vardar, F., (2015). Toxic effects of aluminum oxide Al₂O₃ nanoparticles on root growth and development in *Triticum aestivum*. *Water Air and Soil Pollution*, 226, 296-309.
- [69] Vardar, F., Akgül, N., Aytürk, Ö., Aydın, Y., (2015). Assessment of aluminum induced genotoxicity with comet assay in wheat rye and triticale roots. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24, 3352-3358.
- [70] Panda, S.K., Yamamoto Y., Kondo H., Matsumoto H., (2008). Mitochondrial alterations related to programmed cell death in tobacco cells under aluminum stress. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 597-610.