

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

SALİSİLİK ASİDİN ARPADA (*Hordeum vulgare* L.) SOĞUK
TOLERANSINI SAĞLAMA ve APOPLASTİK ile SİMPLASTİK
PROTEİNLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Salih MUTLU

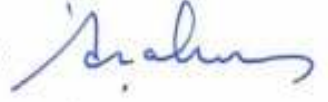
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2009

Her Hakkı Saklıdır.

Doç. Dr. Ökkeş ATICI danışmanlığında, Salih MUTLU tarafından hazırlanan bu çalışma 24/07/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

İmza : 

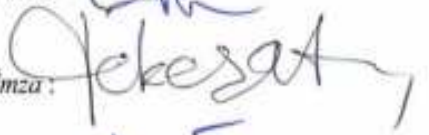
Üye : Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Güleray AĞAR

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Ökkeş ATICI

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Yavuz DEMİR

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Yusuf KAYA

İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Meryem ŞENGÜL

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

SALİSİLİK ASİDİN ARPADA (*Hordeum vulgare* L.) SOĞUK TOLERANSINI SAĞLAMA ve APOPLASTİK ile SİMLASTİK PROTEİNLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Salih MUTLU

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ökkeş ATICI
Ortak Danışman: Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

Bu araştırmada, soğuk stresine dayanıklı (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) ve hassas (*H. vulgare* cv. Akhisar) arpanın yapraklarında donma hasarı, buz nükleasyon aktivitesi, apoplastik ve simplastik antioksidan enzimlerin (katalaz, peroksidaz ve süperoksid dismutaz) aktivitesi, lipid peroksidasyonu, H₂O₂ miktarı ve apoplastik proteinlerin SDS-elektroforezi üzerine, soğuk ve salisilik asidin (SA) etkileri araştırılmıştır. Ekim gününe göre bitki yapraklarına 7. gün 0.0, 0.1, ve 1 mM SA uygulanmış ve bitkiler kesim günlerinden (10., 17., 24., ve 31.) 3 gün önce soğuğa (4/7 °C) transfer edilmişlerdir.

Soğuğa dayanıklı arpada 0.1 mM SA , 10 ve 17. günlerde 1 mM SA ise 24. günlerde, hassas arpada ise 0.1 mM SA, 10, 17 ve 24. günlerde 1 mM SA tüm günlerde donma hasarını azaltarak soğuğa karşı koruma sağlamıştır. Dayanıklı arpada soğuk uygulaması, 10 ve 17 günlük bitkilerde soğuk+SA uygulaması (0.1 ve 1 mM) tüm günlerde buz nükleasyon aktivitesini artırmıştır. Hassas varyetede ise soğuk uygulaması tüm günlerde soğuk+SA ise 10 ve 24 günlük bitkilerde buz nükleasyon aktivitesini artırmıştır.

Soğuk, dayanıklı arpada apoplastik CAT aktivitesini artırırken soğuk+1 mM SA aktiviteyi düşürmüştür. Hassas çeşitte ise soğuk aktiviteyi düşürürken soğuk+0.1 mM SA artırmıştır. Soğuk, apoplastik POD aktivitesini dayanıklı arpada artırırken soğuk+SA aktiviteyi düşürmüştür. Hassas çeşitte ise soğuk aktiviteyi 10 ve 31. günlerde düşürürken 17 ve 24. günlerde artırmış, soğuk+SA uygulaması ise artırmıştır. Hem dayanıklı hem hassas arpada soğuk apoplastik SOD aktivitesini düşürmüştür. Soğuk+SA uygulaması aktiviteyi dayanıklı çeşitte 10. ve 24. günlerde düşürmüş 17 ve 31.günlerde artırmış hassasta ise tüm günlerde artırmıştır.

Soğuk, dayanıklı ve hassas arpada simplastik CAT aktivitesini artırmıştır. Soğuk+SA uygulaması dayanıklı varyetede CAT aktivitesini artırırken hassasta ise düşürmüştür. Soğuk, simplastik POD aktivitesini dayanıklı ve hassas arpada düşürürken soğuk+SA uygulaması aktiviteyi artırmıştır. Simplastik SOD aktivitesi soğuk uygulamasıyla dayanıklı varyetede düşerken ve hassasta artmıştır. Soğuk+SA uygulaması dayanıklı varyetede (0.1 mM), hassasta (0.1 ve 1 mM) SOD aktivitesini artırmıştır.

Lipid peroksidasyonu (LPO) soğuk uygulamasıyla her iki varyetede de artarken soğuk+SA ise düşürmüştür. Soğuk, H₂O₂ miktarını her iki varyetede düşürürken soğuk+SA dayanıklı arpada miktarı artırmış hassasta ise düşürmüştür.

SDS-PAGE de dayanıklı arpada soğukla, bant şiddeti artarken soğuk+SA ile düşmüştür. Hassasta ise soğukla artan bant şiddeti soğuk+SA ile artmaya devam etmiş ayrıca yeni bantlar oluşmuştur..

2009, 139 sayfa

Anahtar Kelimeler: Apoplast, antifriz proteinler, hidrojen peroksit, *Hordeum vulgare*, katalaz, lipid peroksidasyonu, reaktif oksijen türleri, peroksidaz, , süperoksid dismutaz, soğuk stresi

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

INVESTIGATING THE EFFECTS OF THE SALICYLIC ACID ON PROVIDING COLD TOLERANCE AND APOPLASTIC AND SYMPLASTIC PROTEINS ON BARLEY (*Hordeum vulgare* L.)

Salih MUTLU

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ökkeş ATICI
Co-Supervisor: Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

In this study, effects of cold and salicylic acid on the freezing injury, ice nucleation activity, apoplastic and symplastic antioksidant enzymes (catalase, peroxidase and superoxide dismutase) activity, lipid peroxidation, H₂O₂ level and apoplastic proteins on SDS-electrophoresis on the leaves of barley which are resistant (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) and sensitive (*H. vulgare* cv. Akhisar) to cold stress were investigated. According to planting day, 0.0, 0.1 and 1 mM SA were applied on plant leaves on the 7. day and plants were transferred into the cold (7/4 °C) before 3 days of cutting out (10., 17., 24. and 31.)

SA treatment provided protection against the cold by decreasing freezing injury at cold resistant barley with 0.1 mM at the 10. and 17. days and with 1 mM at the 24. days but at sensitive barley with 0.1 mM SA at 10., 17., and 24 days and with 1 mM SA in all days. Cold increased ice nucleation activity at 10 and 17 day plants but cold+SA (0.1 and 1 mM) increased it all days. But at sensitive variety, cold increased ice nucleation activity on all days and cold +SA did it at 10. and 24. day plants.

While cold increased apoplastic CAT activity on cold resistant barley, cold+1 mM SA decreased the activity. On sensitive variety, cold decreased the activity while cold+0.1 mM SA increased. While cold increased apoplastic POD activity on cold resistant barley, cold+SA decreased the activity. On sensitive variety, cold decreased the activity at 10. and 31. days while it increased at 17. and 24. days. But cold+SA treatment increased the activity. At the both cold resistant and sensitive barley, cold decreased apoplastic SOD activity. Cold+SA decreased the activity at resistant variety at 10 and 24. days while it increased 17 and 31. days but at sensitive one, it increased the activity on all days.

Cold increased symplastic CAT activity at both resistant and sensitive barley. CAT activity increased by cold+SA at resistant variety but it decreased at sensitive one. While cold decreased symplastic CAT activity at both resistant and sensitive barley, cold +SA increased it at both of them. While Cold decreased symplastic SOD activity at the resistant variety, it increased at the sensitive one. Cold+SA increased SOD activity at the resistant variety (0.1 mM) but at the sensitive (0.1 and 1 mM).

While lipid peroxidation (LPO) increased by the cold treatment at the both varieties, it decreased by the cold+SA treatment. While cold decreased H₂O₂ level at the both varieties, cold+SA increased it at the resistant but decreased at the sensitive.

At the SDS-PAGE, cold increased the band intensity at the resistant while cold+SA decreased it. At the sensitive, the band intensity which increased by the cold continued to increase and occur new bands by cold+SA.

2009, 139 pages

Keywords: Apoplast, antifreeze proteins, catalase, hydrogen peroxidase, lipid peroxidation, peroxidase, reactive oxygen species, superoxide dismutase, *Hordeum vulgare*, cold stress, barley

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma, TÜBİTAK 106T582 No'lu araştırma projesi olup, Sayın Doç. Dr. Ökkeş ATICI yöneticiliğinde gerçekleştirilmiştir. Tez konumun belirlenmesinden, araştırmaların planlanmasına ve sonuçların tartışılmasına kadar her an bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen başta değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ökkeş ATICI'ya ve Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünden Sayın Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. Faruk ALGUR'a, deneylerin planlanması ve gerçekleşmesi aşamalarında büyük emekleri olan Sayın Ömer KARADAĞOĞLU'na, ilgi, yardım ve desteğini gördüğüm Sayın Yard. Doç. Dr. Esen TAŞĞIN'a, Sayın Arş. Gör. Nevzat ESİM'e, Sayın Arş. Gör. Serkan ERDAL'a, Sayın Arş. Gör. Yahya TEPE'ye ve Sayın Arş. Gör. Özden CANLI'ya tez izleme komitesinden Sayın Doç. Dr. Yavuz DEMİR ve Sayın Yard. Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR'a, tohumları temin ettiğimiz Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne, çalışmalarını yürütmem için gerekli kolaylığı sağlayan müdürüm Sayın Erdoğan BEKTAŞ'a, ders programımı ayarlayan Turgay SANDIKÇI'ya ve tüm fedakâr öğretmen arkadaşlarıma ve hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, çalışmalarım sırasında ihmal ettiğim fakat, buna rağmen her an maddi manevi desteklerini esirgemeyen eşime ve aileme şükranlarımı sunarım.

Salih MUTLU

Temmuz 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	20
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	33
3.1.Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	33
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	34
3.3. Yöntemler.....	37
3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi.....	37
3.3.2. % Donma hasarının belirlenmesi.....	39
3.3.3. Buz nükleasyon aktivitesinin belirlenmesi.....	39
3.3.4. Apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu.....	40
3.3.5. Simplastik proteinlerin ekstraksiyonu.....	41
3.3.6. Apoplastik ve simplastik antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi.....	41
3.3.6.a. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi.....	41
3.3.6.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi.....	43
3.3.6.c. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi.....	43
3.3.7. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi.....	44
3.3.8.Lipid peroksidasyon aktivitesinin belirlenmesi	45
3.3.9. Hidrojen peroksit miktarının belirlenmesi.	46
3.4. İstatistik Analiz.....	47
4.BULGULAR.....	48
4.1. % Donma Hasarı Sonuçları.....	49
4.1.1. Soğuğa dayanıklı arpa varyetesi Tokak’tan elde edilen sonuçlar.....	49
4.1.2. Soğuğa hassas arpa varyetesi Akhisar’dan elde edilen sonuçlar.....	54
4.2. Buz Nükleasyon Aktivitesi Sonuçları.....	59

4.2.1. Soğuğa dayanıklı arpa varyetesi Tokak'tan elde edilen sonuçlar.....	59
4.2.2. Soğuğa hassas arpa varyetesi Akhisar'dan elde edilen sonuçlar.....	62
4.3. Apoplastik Enzim Aktivitesi Sonuçları.....	65
4.3.1. Soğuğa dayanıklı arpa varyetesi Tokak'tan elde edilen sonuçlar.....	65
4.3.1.a. Katalaz aktivitesi sonuçları.....	65
4.3.1.b. Peroksidaz aktivitesi sonuçları.....	67
4.3.1.c. Süperoksit dismutaz aktivitesi sonuçları.....	69
4.3.2. Soğuğa hassas arpa varyetesi Akhisar'dan elde edilen sonuçlar.....	71
4.3.2.a. Katalaz aktivitesi sonuçları.....	71
4.3.2.b. Peroksidaz aktivitesi sonuçları.....	73
4.3.2.c. Süperoksit dismutaz aktivitesi sonuçları.....	75
4.4. Simplastik Enzim Aktivitesi Sonuçları.....	77
4.4.1. Soğuğa dayanıklı arpa varyetesi Tokak'tan elde edilen sonuçlar.....	77
4.4.1.1. Katalaz aktivitesi sonuçları.....	77
4.4.1.2. Peroksidaz aktivitesi sonuçları.....	79
4.4.1.3. Süperoksit dismutaz aktivitesi sonuçları.....	81
4.4.2. Soğuğa hassas arpa varyetesi Akhisar'dan elde edilen sonuçlar.....	83
4.4.2.1. Katalaz aktivitesi sonuçları.....	83
4.4.2.2. Peroksidaz aktivitesi sonuçları.....	85
4.4.2.3. Süperoksit dismutaz aktivitesi sonuçları.....	87
4.5. Lipid Peroksidasyon Aktivitesi Sonuçları.....	89
4.5.1. Soğuğa dayanıklı arpa varyetesi Tokak'tan elde edilen sonuçlar.....	89
4.5.2. Soğuğa hassas arpa varyetesi Akhisar'dan elde edilen sonuçlar.....	91
4.6. Hidrojen Peroksit Miktarı Sonuçları.....	93
4.6.1. Soğuğa dayanıklı arpa varyetesi Tokak'tan elde edilen sonuçlar.....	93
4.6.2. Soğuğa hassas arpa varyetesi Akhisar'dan elde edilen sonuçlar.....	95
4.7. Apoplastik Proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları.....	97
4.7.1. Soğuğa dayanıklı arpa varyetesi Tokak'tan elde edilen sonuçlar.....	97
4.7.1. Soğuğa hassas arpa varyetesi Akhisar'dan elde edilen sonuçlar.....	101
5.TARTIŞMA ve SONUÇ.....	105
5.1. Donma Hasarı (DH) Üzerine Düşük Sıcaklık ve Salisilik Asidin Etkileri.....	107
5.2. Buz Nükleasyon Aktivitesi Üzerine Düşük Sıcaklık ve	

Salisilik Asidin Etkileri.....	108
5.3. Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Düşük Sıcaklık ve Salisilik Asidin Etkileri.....	109
5.3.1. Apoplastik katalaz aktivitesine düşük sıcaklık ve salisilik asidin etkileri.....	109
5.3.2. Apoplastik peroksidaz aktivitesine düşük sıcaklık ve salisilik asidin etkileri.....	111
5.3.3. Apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesine düşük sıcaklık ve salisilik asidin etkileri.....	112
5.3.4. Simplastik katalaz aktivitesine düşük sıcaklık ve salisilik asidin etkileri.....	113
5.3.5. Simplastik peroksidaz aktivitesine düşük sıcaklık ve salisilik asidin etkileri.....	115
5.3.6. Simplastik süperoksit dismutaz aktivitesine düşük sıcaklık ve salisilik asidin etkileri.....	117
5.4. Lipid Peroksidasyon Aktivitesine Düşük Sıcaklık ve Salisilik Asidin Etkileri.....	119
5.5. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarına Düşük Sıcaklık ve Salisilik Asidin Etkileri.....	121
5.6. SDS-PAGE Elektroforezi Üzerine Düşük Sıcaklık ve Salisilik Asidin Etkileri.....	123
KAYNAKLAR.....	126
ÖZGEÇMİŞ.....	135

SİMGELER DİZİNİ

ABA	: Absisik asit
AFP	: Antifriz proteini
CAT	: Katalaz
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
E.C.	: Enzim kod numarası
E.Ü.	: Enzim ünitesi
HCl	: Hidroklorik asit
kDA	: Kilo dalton
KCN	: Potasyum siyanat
LPO	: Lipid peroksidasyon
MDA	: Malondialdehid
MeSA	: Metil salisilik asit
mM	: Milimolar
NBT	: Nitroblue tetrazolium klorür
OH [·]	: Hidroksil radikali
POD	: Peroksidaz
PVP	: Polivinilpirrolidon
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SA	: Salisilik asit
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiobarbutirik asit
TCA	: Trikloro asetik asit
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
xg	: Yerçekimi ivmesinin katı
rpm	: Devir/dakika

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Düşük sıcaklığa maruz kalmış bir yaprakta simplastik bölgedeki suyun apoplastik bölgelere gönderilmesi ile apoplastik bölgede buz oluşumu.....	8
Şekil 3.1. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik.....	42
Şekil 3. 2. Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik.....	47
Şekil 4.1. Arpa (Tokak) yapraklardaki 10. güne ait % donma hasarı değerleri.....	50
Şekil 4.2. Arpa (Tokak) yapraklardaki 17. güne ait % donma hasarı değerleri.....	51
Şekil 4.3. Arpa (Tokak) yapraklardaki 24. güne ait % donma hasarı değerleri.....	52
Şekil 4.4. Arpa (Tokak) yapraklardaki 31. güne ait % donma hasarı değerleri.....	53
Şekil 4.5. Arpa (Akhisar) yapraklardaki 10. güne ait % donma hasarı değerleri.....	55
Şekil 4.6. Arpa (Akhisar) yapraklardaki 17. güne ait % donma hasarı değerleri.....	56
Şekil 4.7. Arpa (Akhisar) yapraklardaki 24. güne ait % donma hasarı değerleri.....	57
Şekil 4.8. Arpa (Akhisar) yapraklardaki 31. güne ait % donma hasarı değerleri.....	58
Şekil 4.9.10 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi değerleri.....	60
Şekil 4.10. 17 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon naktivitesi değerleri.....	60
Şekil 4.11. 24 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi değerleri.....	61
Şekil 4.12.31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi değerleri.....	61
Şekil 4.13. 10 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi değerleri.....	63

Şekil 4.14. 17 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi değerleri.....	63
Şekil 4.15. 24 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi değerleri.....	64
Şekil 4.16. 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi değerleri.....	64
Şekil 4.17. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik katalaz (CAT) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	66
Şekil 4.18. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik peroksidaz (POD) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	68
Şekil 4.19. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	70
Şekil 4.20. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik katalaz (CAT) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	72
Şekil 4.21. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik peroksidaz (POD) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	74
Şekil 4.22. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	76
Şekil 4.23. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen simplastik katalaz (CAT) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	78

Şekil 4.24. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak)	
yapraklarından elde edilen simplastik peroksidaz (POD)	
aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	80
Şekil 4.25. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak)	
yapraklarından elde edilen simplastik süperoksid dismutaz (SOD)	
aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	82
Şekil 4.26. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar)	
yapraklarından elde edilen simplastik katalaz (CAT)	
aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	84
Şekil 4.27. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar)	
yapraklarından elde edilen simplastik peroksidaz (POD)	
aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	86
Şekil 4.28. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar)	
yapraklarından elde edilen simplastik süperoksid dismutaz (SOD)	
aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	88
Şekil 4.29. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak)	
yapraklarında belirlenen lipid peroksidasyon	
aktivitesi değerleri (nmol/g yaprak).....	90
Şekil 4.30. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar)	
yapraklarında belirlenen lipid peroksidasyon	
aktivitesi değerleri (nmol/g yaprak).....	92
Şekil 4.31. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak)	
yapraklarında belirlenen hidrojen peroksit	
miktarı değerleri (ng H ₂ O ₂ /g yaprak).....	94
Şekil 4.32. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar)	
yapraklarında belirlenen hidrojen peroksit miktarı	
değerleri (ng H ₂ O ₂ /g yaprak).....	96
Şekil 4.33. 10 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından	
elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid	
Jel Elektroforezi fotoğrafı.....	97

Şekil 4.34. 17 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı.....	98
Şekil 4.35. 24 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı.....	99
Şekil 4.36. 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı.....	100
Şekil 4.37. 10 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı.....	101
Şekil 4.38. 17 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı.....	102
Şekil 4.39. 24 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı.....	103
Şekil 4.40. 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı.....	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bitkiler için başlıca stres kaynakları.....	3
Çizelge 4.1. 20/18 °C‘de büyütülen arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra 10. günde kesilen yapraklardaki % donma hasarı değerleri.....	50
Çizelge 4.2. 20/18 °C‘de büyütülen arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra 17. günde kesilen yapraklardaki % donma hasarı değerleri.....	51
Çizelge 4.3. 20/18 °C‘de büyütülen arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra 24. günde kesilen yapraklardaki % donma hasarı değerleri.....	52
Çizelge 4.4. 20/18 °C‘de büyütülen arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra 31. günde kesilen yapraklardaki % donma hasarı değerleri.....	53
Çizelge 4.5. 20/18 °C ‘de büyütülen arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra 10. günde kesilen yapraklardan elde edilen % donma hasarı değerleri.....	55
Çizelge 4.6. 20/18 °C ‘de büyütülen arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra 17. günde kesilen yapraklardan elde edilen % donma hasarı değerleri.....	56
Çizelge 4.7. 20/18 °C ‘de büyütülen arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra 24. günde kesilen yapraklardan elde edilen % donma hasarı değerleri.....	57

Çizelge 4.8. 20/18 °C 'de büyütülen arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra 31. günde kesilen yapraklardan elde edilen % donma hasarı değerleri.....	58
Çizelge 4.9. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (Tokak çeşidi) yapraklarından elde edilen buz nükleasyon aktivitesi (°C) değerlerinin ortalaması.....	59
Çizelge 4.10. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (Akhisar çeşidi) yapraklarından elde edilen buz nükleasyon aktivitesi (°C) değerlerinin ortalaması.....	62
Çizelge 4.11. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik katalaz (CAT) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	66
Çizelge 4.12. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik peroksidaz (POD) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	68
Çizelge 4.13. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	70
Çizelge 4.14. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik katalaz (CAT) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	72
Çizelge 4.15. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik peroksidaz (POD) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	74
Çizelge 4.16. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	76
Çizelge 4.17. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen simplastik katalaz (CAT) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	78
Çizelge 4.18. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak) yapraklarından elde edilen simplastik peroksidaz (POD) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	80

Çizelge 4.19. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak)	
yapraklarından elde edilen simplastik süperoksid dismutaz (SOD)	
aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	82
Çizelge 4.20. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar)	
yapraklarından elde edilen simplastik katalaz (CAT)	
aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	84
Çizelge 4.21. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar)	
yapraklarından elde edilen simplastik peroksidaz (POD)	
aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	86
Çizelge 4.22. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar)	
yapraklarından elde edilen simplastik süperoksid dismutaz (SOD)	
aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).....	88
Çizelge 4.23. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak)	
yapraklarında belirlenen lipid peroksidasyon aktivitesi	
değerleri (nmol/g yaprak).....	90
Çizelge 4.24. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar)	
yapraklarında belirlenen lipid peroksidasyon aktivitesi	
değerleri (nmol/g yaprak).....	92
Çizelge 4.25. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Tokak)	
yapraklarında belirlenen hidrojen peroksit miktarı	
değerleri (ng/g yaprak).....	94
Çizelge 4.26. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (<i>Hordeum vulgare</i> cv. Akhisar)	
yapraklarında belirlenen hidrojen peroksit miktarı	
değerleri (ng H ₂ O ₂ /g yaprak).....	96

1. GİRİŞ

Doğadaki canlıların önemli bir bölümünü oluşturan **bitkiler**, canlı yaşamın devamlılığı açısından ekosistemin temel elamanlarından biridir. Besin piramidinin tabanında yer aldıklarından dolayı, ekosistemin primer üreticileri konumundadırlar. Yaşadıkları ortamdan aldıkları hammaddeleri (azot, fosfor, potasyum, kalsiyum gibi besin elementleri ve karbondioksit) kullanarak kendileri ve diğer canlıların yaşamları için gerekli olan besinleri sentezlerler. Yeşil bitkilerin önemi, sadece primer üretici olmaları ile sınırlı değildir. Ekosistemin oksijen ve karbondioksit dengesinin korunması ve buna bağlı olarak yeryüzündeki sıcaklık kontrolünün sağlanmasında da vazifelidirler. Ayrıca erozyonu önleyerek, toprağa organik madde kazandırarak, canlılara barınma ve beslenme ortamı temin ederek ekosistemin devamlılığını da sağlarlar. Bunların dışında; tarımda, mobilyacılıkta, tekstilde, ilaç ve kimya sanayinde ve süs bitkisi olarak peyzaj düzenlemelerinde de kullanılırlar. Tüm bu görevleri, bitkilerin doğanın vazgeçilmez unsurları olduklarının çok açık bir göstergesidir. Fakat canlı yaşamı için bu kadar önemli olan bitki gelişimi ve verimliliği, çeşitli çevresel faktörlerden de olumsuz etkilenir (Levitt 1980; Özcan *et al.* 2004; Kaya 2008; Yağmur 2008).

Yirminci yüzyılda dünya nüfusu 5,5 milyara ulaşmıştır. Her yıl ortalama 90 milyonluk artış göstererek 2050 yılında 8,5 milyara ulaşması beklenmektedir. Nüfusun artmasına paralel olarak kişi başına düşen işlenebilir tarım arazisi günden güne azalmaktadır. Son dönemlerde, modern tarımın gelişmesiyle global besin üretimi bir ölçüde artırılmıştır. Buna rağmen, günümüzde dünya nüfusunun 1/5'i kronik açlıkla karşı karşıyadır (Rao *et al.* 1999). FAO'nun (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu) 2003 yılı istatistik verilerine göre ülkemiz topraklarının %33,2'si tarımsal amaçlı olarak kullanılmaktadır. Ancak dünyada olduğu gibi, ülkemizde de işlenebilir tarım alanlarının çeşitli stres faktörlerinin etkisiyle kullanılamaz durumda olması ve nüfus artışı, şu anda herhangi bir kıtlık tehlikesi olmasa da, uzun dönemde risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (Doğru 2006).

Bitkiler, yaşadıkları çevrelerde yaşamlarının her döneminde büyüme ve gelişme şanslarını sınırlayıcı pek çok olumsuz şartlara maruz kalarak strese girebilirler. **Stres** kısaca; bitkilerde zarar meydana getiren güç (potansiyel) olarak kabul edilir. Bu zarar metabolizmanın bozulması sonucu açığa çıkar ve sonuçta; bir bitkinin veya organlarının büyüme, gelişme ve hatta verimliliğinde azalmaya neden olabilir. Bitkiler streslere karşı, birçok mekanizmanın yanında, biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmalarını devreye sokarak cevap verirler. Bu mekanizmaların tepkileri sınırlı olması hesabıyla, bitkiler bir veya daha fazla olumsuz şartlara karşı sınırlı bir cevap kapasitesine sahiptirler (Hale and Orcutt 1987; Kocaçalışkan 2004; Mutlu 2005).

Canlıların stressiz bir ortamda yaşamaları nadir bir olaydır ve bu durumda sıfır stres denilen bir olaydan söz edilir. **Sıfır stres**, canlılarda hasar meydana getirmeyen, verim ve kalitede bir azalmaya yol açmayan bir ortamda yaşamayla sağlanır. Bu durum bitkiler açısından büyüme için optimum şartlarla sağlanabilir. Bitkiler üzerinde stresin dereceleri geniş sınırlar içerisinde dağılım gösterir ve sıfır stresten, ılımlı ve şiddetli strese kadar çok değişken dereceleri bulunur. Stresin derecesi bitki türüne göre de değişebilmektedir. Yani bir bitki türünde yüksek derecede strese sebep olan bir faktör, diğer bitki türünde ılımlı veya sıfır strese sebep olabilir. Strese dayanıklılık, bitkinin büyüme ve gelişme dönemine göre de değişebilir. Bitkilerin bazı kısımları (tohumlar, tomurcuk ve dormant hücreler) strese dayanıklı iken, diğer kısımları (meristemler, sukkulent organlar ve fideler) daha duyarlıdır. Ayrıca bitkiler yaşamak zorunda oldukları çevreye kısmen veya tamamen adapte olabilme özelliğine sahiptirler (Bidwell 1974; Hale and Orcutt 1987; Salisbury and Ross 1992). Birçok bitki, stresin öldürücü olmayan dozlarına maruz kaldıktan sonra strese daha dayanıklı olabilir. Bu olay **kuvvetlenme** (hardening) veya aklımasyon safhası olarak adlandırılır. Strese dayanıklılığın belli başlı iki tipinden birisi sakınma ve diğeri de toleranstır. **Sakınma**, dış çevrede stres oluşturabilecek koşullar olmasına rağmen, bitki hücrelerini stres altına sokmayan bir iç ortam sağlanmasıdır. **Tolerans** ise aşırı dış stres şartlarında işlevliğini ya da canlılığını devam ettirme yani strese dayanma kapasitesidir (Kocaçalışkan 2004; Taşgın 2004).

Bir ekosistemde bitkilere etkiyen pek çok stres kaynakları bulunabilir. Bunlar fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç gruba ayrılabilir (Çizelge 1.1) (Kocaçalışkan 2004; Kadioğlu 2004).

Çizelge 1.1. Bitkiler için başlıca stres kaynakları

Fiziksel stresler	Kimyasal stresler	Biyolojik stresler
Kuraklık	Hava kirliliği	Rekabet
Sıcaklık	Allelokimyasallar	Allelopati
Radyasyon	Besinler (inorganik mad.)	Simbiyosis
Sel	Pestisitler, toksinler	İnsan tahribi
Makineler, elektrik	Tuzlar	Hastalık etkenleri
Manyetik alan, rüzgâr	Toprağın pH' sı	Böcekler

Dünya genelinde bitkisel üretimde ürün kaybının başlıca nedeni abiyotik streslerdir ve önemli tarımsal ürünlerin ortalama üretimini yaklaşık %50 azaltarak tarım endüstrisinin geleceğini tehdit etmektedir (Mahajan and Tuteja 2005). Dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar stres faktörlerine göre sınıflandırıldığında, doğal bir stres faktörü olan kuraklık stresi %26, bunu %20 ile mineral stresi ve %15 ile soğuk ve don stresi takip etmektedir. Bunların dışında kalan diğer tüm stresler %29'luk bir pay alırken, yalnızca % 10'luk bir alan herhangi bir çevresel stres faktörüne maruz kalmamaktadır (Blum 1986; Güler 2008).

Dünyada kontrol edilemeyen iklimatik faktörlerin başında sıcaklık gelir. Bitkiler ise poikiloterm canlılardır; yani çevrelerindeki sıcaklığa uyum gösterirler. Bu nedenle **düşük sıcaklık** bitki büyümesi ve gelişmesi ile ürün miktarı ve kalitesini kısıtlayan en önemli stres faktörlerinden birisi konumundadır. Steponkus (1992), ekonomik öneme sahip bitkileri düşük sıcaklık zararından korumak için dünya genelinde yıllık olarak yaklaşık 100 milyon dolar harcanmasına rağmen, yıllık ekonomik kaybın 10-100 milyon dolar civarında olduğunu belirtmiştir. Düşük sıcaklık bitkilerde çimlenme, büyüme ve gelişme, reproduktif organlar ve hasat sonrası depolama süresi de dâhil olmak üzere birçok olay üzerinde etkili olan çevresel bir faktördür (Lyons 1973; Wang

1990). Örneğin dünyanın ortalama sıcaklığındaki 1 °C'lik düşüş pirinç üretiminde %40 azalmaya neden olabilmektedir. Yine narenciye ağaçlarında, bazı sebzelerde ve tahıl bitkilerinde 2 °C'lik bir dona dayanıklılık sağlanabilse, yeryüzü ekim alanlarının genişlemesiyle birlikte bunların toplam veriminde bir artış olacağı açıktır (Hale and Orcutt 1987; Taşgın 2004).

Bitkilerin soğuğa uyumu nasıl gerçekleştiğinin anlaşılması, açlığın bir risk faktörü olduğu gelecekte, soğuk olduğu için tarım yapılamayan işlenebilir tarım arazilerinin kullanılabilmesine imkân sağlayacaktır. **Soğuğa uyum**, bitki metabolizmasında birçok morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişimin meydana geldiği oldukça karmaşık bir olaydır. Bu değişimler arasında büyümenin durması, dokulardaki su miktarının azalması, rozet oluşumu, absisik asit (ABA) miktarının geçici olarak artması, membran lipid kompozisyonunun değişmesi, serbest prolin, çözünebilir karbohidratlar ile antifriz proteinler gibi osmotik etkinliğe sahip moleküllerin birikimi, antioksidan enzimlerin aktiviteleri ile antioksidan moleküllerin miktarının yanında, birçok genin ifadesinin artması sayılabilir. Sayılan bu parametrelerin bitkisel dokulardaki miktarı ve aktivitelerindeki değişimlere göre, bir bitkinin düşük sıcaklığa duyarlı mı yoksa toleranslı mı olduğu, toleranslı ise soğuğa uyumun sağlanması için hangi metabolik değişimlerin oluşması gerektiği konusunda fikir elde edilebilmektedir (Tao *et al.* 1998; Doğru 2006).

Çevre sıcaklığının suyun donma noktasının altına düştüğü durumlarda, birçok bitkide **üşüme ve donma hasarı** ortaya çıkar. Bu hasarın ortaya çıkış derecesi soğuğun şiddetine, bitkinin soğukta kalma süresine, soğukta kaldığı olgunluk safhasına, bitki yapısındaki çözülebilir şeker ile prolin içeriğine, bitki bünyesindeki büyümeyi düzenleyicilerin dengesine (Wang 1982) ve son yıllardaki bulgulara göre antifriz özelliğindeki apoplastik (ekstraselüler) polipeptitleri sentezleyebilme yeteneklerine göre değişebilmektedir (Hale and Orcutt 1987; Urritia *et al.* 1992; Griffith *et al.* 1992; Hon *et al.* 1994; Taşgın 2004).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, soğuğa toleranslı bitkilerde bulunan antifriz proteinlerinin, bitkilerin apoplastik bölgelerinde suyun donma noktasını düşürerek ve

oluşan buzun morfolojisini değiştirerek canlının soğuğa karşı toleranslı olmasını sağladığı bulunmuştur (Griffith *et al.* 1992; 1997; Yu and Griffith 2001; Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b; ve 2003; Taşgın *et al.* 2006). **Apoplast**, bitkinin içsel bir çevresidir. Bizim vücudumuz lenf ve doku sıvısı gibi içsel bir çevreye sahip olmasıyla benzer şekilde, bütün bitki hücreleri de apoplast (ekstarselular ve interselular alanlar) adı verilen sıvı bir ortamla kuşatılır. Apoplast, gelişme, beslenme, sinyal iletimi ve savunma gibi pek çok olayın meydana geldiği dinamik bir bölgedir. Bizim vücudumuzdaki içsel çevrenin çok önemli fonksiyonlarına karşılık, apoplastın dinamik fonksiyonu da bitki hayatının devamında pek çok şeyden önce gereklidir (Kim *et al.* 2000; Mutlu 2005; Taşgın *et al.* 2006).

Apoplastın birçok önemli fonksiyonları içerisinde şunlar sayılabilir (Sakurai 1998; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Chikov and Bakirova 2004).

1. Apoplastik enzimler aracılığı ile polisakkarit, protein ve lignin gibi hücre duvarı moleküllerinin sentezi, yıkımı ve düzenlenmesi.
2. Ozon, soğuk ve sülfür dioksit gibi zararlı çevresel faktörlere ve patojen saldırılarına karşı hücre içinin (simplast) korunması.
3. Sadece su gibi iyi taşınan moleküllerin değil, aynı zamanda inorganik ve organik bileşiklerin taşınmasının düzenlenmesi.
4. İyon dengesi, pH ve su içeriğini ayarlayarak içsel homeostasisin düzenlenmesi.

Son on yılda, özellikle stres altındaki bitkilerin apoplastik bölgelerinde bulunan bileşikler üzerine yoğun araştırmalar yapılmış ve bitkinin çevresel streslere cevabında ve streslere tolerans kazanmasında bu bölgenin önemine dikkat çekilmiştir (Michael *et al.* 1993; Duran-Carril and Bujan 1998; Atıcı and Nalbantoğlu 1999 a, b; 2003; Wang *et al.* 2004). Birçok çalışmada ise antioksidan enzimlerin bitki hücrelerinin apoplast (ekstraselular) bölgesinde de lokalize olduğu ve çevresel streslere cevapta önemli rollerinin bulunduğu belirtilmiştir. Bu üçlü antioksidan sistem (katalaz, peroksidaz, süperoksid dismutaz), hücresel hasarların ilk başladığı apoplastik bölgede ROT bileşiklerinin sistemli bir şekilde uzaklaşmasını gerçekleştirirler (Lin and Kao 2001; Hernandez *et al.* 2000; Minibaeva and Gordon 2003; Mutlu *et al.* 2009).

Düşük sıcaklıklarda soğuğa toleranslı birçok canlı, dokularda buz oluşumuna rağmen uzun bir süre canlı kalabilir (Burke *et al.* 1976). Önceleri soğuğa toleranslı böyle canlı dokulardaki buz oluşumunun kendiliğinden meydana geldiği ve daha sonra sıcaklığın düşüşüne bağlı olarak canlının diğer dokularına yayıldığı kabul edilmekteydi (Burke *et al.* 1976; Burke and Lindow 1990). Ancak soğuğa toleranslı böcekler, eklem bacaklılar, balıklar ve bitkilerde yapılan çalışmalar böyle canlılarda ekstraselular buz oluşumunun özel bazı proteinler tarafından kontrol edilerek donma hasarının tolere edildiği gösterilmiştir (Storey and Storey 1988; Duman *et al.* 1991; Griffith *et al.* 1992; Taşgın 2004).

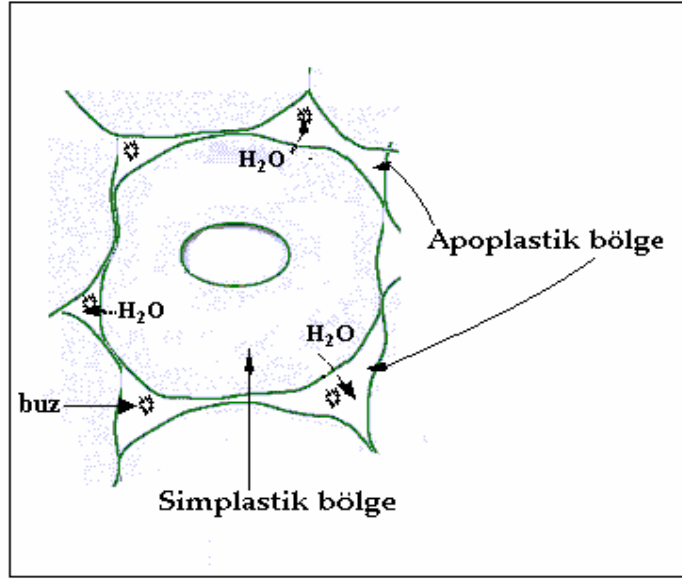
Donma, hücrel organizmalar için öldürücü bir etkidir. Özellikle intraselüler bölgenin dehidrasyonu ve buz kristallerinin neden olduğu fiziksel zarar, donma hasarı ve ölüme sebep olabilmektedir (Lewitt 1980; Hale and Orcut 1997; Yang *et al.* 1988). Bitkiler, donmaya karşı dirençleri ve donma sıcaklıkları açısından birbirinden farklıdır. **Donma toleransı** (yapraklarda gözlenen daha düşük donma hasarı ve yaprakların apoplastik proteinlerindeki daha yüksek buz nükleasyon aktiviteleri) ekstraselüler buz oluşumuna dayanma ve intraselüler buz oluşumunu önleme kapasitesine bağlıdır. Donmaya toleranslı bitkiler, sadece ekstraselüler buz oluşumunun başladığı sıcaklıklardan daha düşük sıcaklıklarda hasar gösterirler (Antikainen 1996). Bitkiler hücreyi korumak için öldürücü intraselüler ve interselüler buz oluşumuna karşı birçok bileşik üretirler. Bu yüzden özellikle kışlık bitkiler, apoplastik bölgelerinde şeker, aminoasit ve antifriz proteinleri de içeren antifriz bileşikleri biriktirirler (Griffith *et al.* 1997; Atıcı and Nalbantoğlu 1999 a, b; Ewart *et al.* 1999). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, bitki antifriz proteinlerinin (AFP) bitkilerin apoplastik bölgelerinde bulunduğu ve donma noktasını düşürerek bitkinin soğuğa toleranslı olmasını sağladıkları belirlenmiştir. Ayrıca antifriz proteinlerin buz kristallerine bağlanarak onların şekillerini değiştirdikleri ve buzun yeniden kristalleşmesini engelledikleri de bilinmektedir (Ewart *et al.* 1999; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşgın 2004).

Bitkiler, donma sıcaklığına maruz kaldıklarında neler olabileceğinin bilinmesi için suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri ile donma olayının iyice bilinmesi gerekmektedir.

0°C'deki saf su içerisinde, katıdan sıvıya veya sıvıdan katıya bir faz geçişi olur. Bütün çözeltilerde donma olayı başlamadan önce bir süper soğuma olayı görülür. Bu olay, çözeltinin saf suya göre daha geç donmasını sağlar. Çözeltilerde olduğu gibi, hücreler de farklı sıcaklıklarda donma ve erime gösterirler. Donma, süper soğuma gösteren bir çözeltide başladıktan sonra çözeltinin tamamı donuncaya kadar devam eder (Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşgın 2004).

Saf suda veya bir çözelti içerisinde donma olayı, buz nükleatörleri (buz kristalini verecek çekirdek) tarafından süratle teşvik edilerek başlatılır. Genellikle saf suda **buz nükleasyonu** 0°C ile -5°C arasında meydana gelir. Çözeltiler gibi bitki dokularının donma noktası da bu sıcaklık aralığından daha düşüktür. Bitki doku ve hücre sıvılarındaki donma noktası bitkiden bitkiye, dokudan dokuya ve hatta hücreden hücreye değişebilmektedir. Örneğin, hücre içerisindeki sıvılar (intraselular sıvı), hücrelerarası boşluklardaki sıvılar (interaselular sıvı) ve hücre dışındaki (ekstraselular sıvı) sıvılardan daha yoğun olduklarından dolayı osmotik potansiyelleri daha düşüktür. Bu nedenle hücre içerisindeki donma noktası hücre dışı sıvılarına göre daha düşüktür (Hale and Orcut 1987; Salisbury and Ross 1992).

Eğer çevre sıcaklığı suyun donma noktasının altına düşerse, bitkinin apoplastik bölgelerindeki (ekstraselular) çözeltiler aşırı düzeyde soğumaya başlar. İntaselular sıvılar ile ekstraselular sıvılar doğrudan temas etmediğinden, hücre içinden hücre dışına doğru bir buhar basıncı gradienti meydana gelir. Apoplastik bölgedeki çözeltiler hücre içine göre seyreltik olduğundan, buz nükleatörleri bu alanda buz kristallerinin oluşumunu çok daha erken başlatırlar. Hücre içindeki buz oluşumu, potansiyelin düşük tutulmasıyla bir süre önlenemez. Protoplazmanın dehidrasyon miktarı, hücre içerisindeki osmotik potansiyelin düşüşüne bağlı olarak artar. Bu esnada hücre içerisindeki su, hücre dışına (apoplastik bölgeye) pompalanır (Şekil 1.1).



Şekil 1. 1. Düşük sıcaklığa maruz kalmış bir yaprakta simplastik bölgedeki suyun apoplastik bölgelere gönderilmesi ile apoplastik bölgede buz oluşumu (Taşgın 2004).

Sonuçta hücre içerisindeki donma, bir dereceye kadar önlenmiş olur. Nitekim hücre içerisinde çok az da olsa bir donmanın olması ölümü kaçınılmaz kılar. Bu nedenle donma, fizyolojik olarak apoplastik bölgeye itilmiş olunur. Ancak, çoğu bitkiler apoplastik bölgede meydana gelen donmanın oluşturduğu hasarı her zaman tolera edemezler. Çünkü apoplastik bölge donduktan sonra bile buz kristalleri, hücre çeper ve zarlarında dönüşümü olmayan hasara yol açar (Hale and Orcut 1987; Griffith *et al.* 1992; Salisbury and Ross 1992; Taşgın 2004).

AFP'lerin bulunduğu çözeltilerde donma davranışı üzerine yapılan araştırmalar; bu moleküllerin buzu adsorpladıklarını göstermiştir (Duman and DeVries 1974; Tomimatsu *et al.* 1976; DeVries 1983; Griffith *et al.* 1992). AFP'leri su moleküllerini farklı bir şekilde bağlamak suretiyle donma noktasını düşürürler (DeVries 1983; 1986; Urritia *et al.* 1992). Böyle durumda, bir buz kristalinin gelişimi ve morfolojisi oval durumdan altıgenimsi duruma dönüşür. Gelişimin daha ileri aşamalarında kristal, pramidal bir yapı kazanır (DeVries 1983; Raymond *et al.* 1989; Griffith *et al.* 1992; Hon *et al.* 1992). Oval olarak gelişen buz kristali hem yatay hem de dikey yönde gelişerek hızlı bir büyüme göstermektedir. Ancak piramidal gelişmeyle oluşturulan bir

buz kristali zamanla sadece yatay gelişerek küçük iğnemsî bir yapıya dönüşür. Böylece bitkinin apoplastik bölgelerinde oval durumda gelişmesiyle hücre duvarı ve membranlarını parçalayacak olan kristal, donma hasarının en aza indirildiği piramidal bir yapıya dönüştürülür (Griffith *et al.* 1992; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşgın 2004).

Antifriz proteinleri ilk olarak Antartika’da yaşayan balıkların kan serumlarından izole edilmiştir. AFP’ler karbohidratlarla bağlanmazlar ve antifriz glikoproteinlerden (AFGP) yapısal olarak çok farklıdır. En önemli farklılık buz kristalinin farklı yüzeylerine bağlanmalarıdır. Mesela AFGP’ler buzun prizma yüzeyine bağlanırken AFP’ler farklı pramidal yüzeylere bağlanırlar. Balıklarda 5 tip, böceklerde 2 tip, bitkilerde ise 3 tip AFP belirlenmiştir (Ewart *et al.* 1999). Bitki antifriz proteinleri ilk olarak M.Griffith tarafından Kanada’da kışlık çavdardan izole edilmiştir. Bitkilerdeki bu antifriz proteinler de buz kristallerinin büyümesini engelleyerek bitkiye soğuk toleransı kazandırır. Bu 3 bitki proteini, bitki hastalıklarına sebep olan patojenlerden etkilenerek salınan kitinaz, glukonaz ve thomatin ile yapısal olarak benzerlik gösterirler (Ewart *et al.* 1999; Taşgın 2004).

Kışlık çavdar ve kışlık buğday interselüler yüzeylerde oluşan buz ile -20 °C’den daha düşük sıcaklıklarda donma direnci gösteren bir bitkidir. Bu bitkiler düşük sıcaklıklara uyum gösterince, buzların oluştuğu yaprak apoplastlarında protein salgılanır (Pearce 1988; Brush *et al.* 1994; Atıcı and Nalbantoğlu 1999). Bitki antifriz proteinleri bitkilerin genellikle apoplastik bölge denilen kısımlarında bulunurlar (Hon *et al.* 1995; Ewart *et al.* 1999).

Diğer çevresel streslerde olduğu gibi, soğuk stresi altındaki bitkilerin strese cevaplarından en ilki ve en önemlisi **reaktif oksijen türlerinin (ROT)** oluşumuna neden olan önemli bazı metabolik yolların aktive olmasıdır. ROT, hücre hasarı ve ölümlerinin tetikleyicisi ve çevre hücrelerdeki savunmaya bağlı genlerin indüksiyonu için yayılabilir bir sinyal olarak çalışır. Reaktif oksijen türleri (veya serbest radikaller) arasında singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), süperoksid anyonu ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), ve

hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) gibileri sayılabilir. **Serbest radikaller** bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok aktif moleküller olarak tanımlanabilir. Bitkiler, hücrelerini oksidatif hasardan koruyan antioksidan sistemler ile birlikte ROT'un seviyesini kontrol eden ve bunların normal formlarına dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimlere de sahiptir (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003a; Mutlu 2005).

Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$) moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formudur. Oksijenin bu formunun üzerinde ortaklaşmamış elektronu bulunmadığı için radikal özelliği yoktur. Fakat oksidan özelliği oldukça yüksektir. Kaynağı fotosentez reaksiyonları sırasında elektron transport sistemindeki klorofil pigmentleridir (Foyer *et al.* 1997; Güler 2008). Serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına sebep olabildiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının ürünü olarak da meydana gelebilir. Ayrıca biyolojik sistemlerde çeşitli yollarla kimyasal veya fotokimyasal olarak da üretilbildiği gibi lipid peroksidasyonu sırasında da oluşabilir (Çınar 2005). Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksit radikalini oluşturur ve $\cdot\text{OH}$ kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Hücre zarlarının glikolipid, fosfolipid, sterol ve gliserid yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, aldehitler, hidroksi yağ asitleri ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluştururlar (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003a, Mutlu 2005).

Oksijene bir elektron verilmesiyle hızlı bir şekilde oluşan **süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$)**, oldukça reaktiftir ve lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna sebep olur. Bu radikalın lipid peroksidasyonu, membran hasarı, hücresel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırıklarına sebep olduğu belirtilmiştir (Fridovich 1995). Süperoksit radikali ayrıca, hidrojen peroksitle reaksiyona girerek çok daha toksik bir molekül olan hidroksil radikalini üretebilir. Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinen bu reaksiyon demir ve bakır gibi metallerin katalizörlüğünde oldukça hızlı gerçekleşir.

Süperoksit radikali, yüksek katalitik etkiye sahip süperoksit dismutaz (SOD) enziminin etkisiyle dismutasyona girerek konsantrasyonu azaltılır (Halliwell 1984; Güler 2008).

Süperoksit grubuna göre daha az etkili olan **hidrojen peroksit (H_2O_2)**, oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur. Süperoksitin olduğu yerlerde (peroksizomlar, elektron taşıma zinciri, plazma membranı, ekstraselüler matriks) önemli miktarda H_2O_2 de üretilir (Slesak *et al.* 2007). Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz. H_2O_2 'nin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır. H_2O_2 özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılması gerekir (Halliwell 1984; Güler 2008). Bu görevi katalaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzimler H_2O ve O_2 gibi ürünlere dönüştürerek yerine getirir. Oksitatif streslere tolerans sağlamada bitkilerin bu enzimlerin hücresel seviyelerini düzenlenmesi oldukça önemlidir (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003a, Mutlu 2005).

Oksijen radikalleri içerisinde en aktif ve en toksik olanı **hidroksil radikalidir ($\cdot OH$)**. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun (x-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda olduğu gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilir (Stahl and Sies 2002). Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\cdot OH$, üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir ve su dahil rastladığı her molekülle tepkimeye girebilir. Bütün bu tepkimeler $\cdot OH$ 'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell 1984). Hidroksil radikalinin sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. $\cdot OH$ 'ın başlıca hedefi yağ asitleri olup zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama *et al.* 1998; Güler 2008).

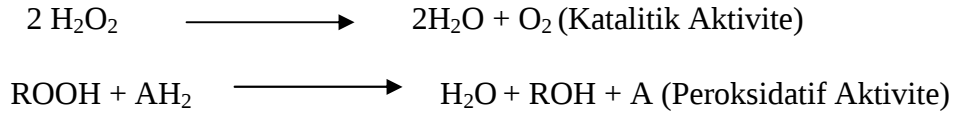
Organizmadaki serbest radikal oluşumunun artışına veya antioksidan savunma sisteminin yetersizliğine bağlı olarak oksidan-antioksidan dengesinin radikaller lehine bozulması sonucunda, hücre içerisinde biyomoleküller ile serbest radikaller kolaylıkla reaksiyona girerler ve zincirleme reaksiyonları başlatarak yeni serbest radikal oluşumuna neden olurlar (Augustin *et al.* 1997). Oluşan serbest radikaller, biyolojik sistemlerde çeşitli anormalliklere ve çok önemli biyokimyasal-fizyolojik hasarlara neden olduğu belirlenmiştir. Bu serbest radikaller; proteinler, lipidler, karbohidratlar ve nükleik asitlerin doğal yapılarının bozulmasına sebep olabilmektedirler (Şimşek 1999; Kuru 2007)

Serbest radikallerin uyardığı hücre yıkımında önemli bir mekanizma da doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olan **lipid peroksidasyonudur (LPO)**. Lipid peroksidasyonu membran bütünlüğünün yok olmasına, hücrenin elektrolitlere geçirgenliğinin artmasına neden olur. Özellikle Ca ve Na iyonlarının hücre içerisine kontrolsüz geçişi, hücrenin enerji oluşturan mekanizmalarını etkileyebilir. İntrasellüler Ca iyonlarındaki artış; protein ve lipidlerde daha fazla hasara neden olabilecek proteaz ve fosfolipazı aktive eder. Bu aynı zamanda DNA'da yapısal hasara ve hücre ölümüne neden olabilecek enzim inaktivasyonuna neden olabilir (Halliwell 1994). Birçok hücre hasardan sonra meydana gelen dokuların dejenerasyonu, serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu sonucu oluşur (Şimşek 1999). Lipitlerdeki doymamış yağ asitleri, otooksidasyona eğilimlidirler. Otooksidasyon iki çift bağ arasındaki metilen grubunun çevresinden kolayca etkilenecek hidrojen atomunun birini kaybetmesi ile oluşan serbest radikalden kaynaklanmaktadır. Hidrojen ayrılmasının ilk nedeni reaktif oksijen türleri hareketidir. ROT'lar direkt hasara neden olabildikleri gibi birbirlerini etkileyerek, en reaktif radikal olan hidroksil radikalini ($\cdot\text{OH}$) oluşturmakta ve doymamış yağ asitlerine etki etmektedirler (Wood and Smith 1991). Otooksidasyon sonucu veya daha farklı yollardan oluşan serbest radikallerin oranı, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranda olursa, organizmadaki biyomoleküller bu durumdan olumsuz olarak etkilenmektedirler. Bu etkiye en duyarlı olan moleküller lipidlerdir. Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır.

Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkuş 1995). Biyolojik sistemlerde LPO'yu başlatan serbest radikalın, süperoksit anyonu ile özellikle de hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidinin radikal özelliği kazanmasına neden olmaktadır. Böylece oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir. Molekül içi konjuge edilen bağlarının farklı pozisyonlara gelmesi ile değişikliğe uğrayabilen kararsız lipid radikalının moleküler oksijenle tepkimesi sonucu lipid peroksit radikali meydana gelir (Spiteller 2001; Kuru 2007).

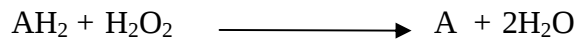
Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak reaktif olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehid (MDA) meydana gelir (Yılmaz *et al.* 2003). MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonunun derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple organizmada oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü, sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. MDA, tiyobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu çözeltinin absorbans değerlerinden LPO'nun derecesi saptanmaktadır (Yılmaz *et al.* 2003; Kuru 2007).

Bir antioksidan enzim olan **katalaz (CAT)** (E.C.1.11.1.6) bitki dokularında çok yüksek dağılım göstermektedir. Aerobik organizmaların hepsinde omurgalılarda, omurgasızlarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunmaktadır (Bergmeyer and Grabl 1983). CAT yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 'nin 2 elektronunu kullanarak su ve oksijene indirgenmesini katalizleyen demir porfirin içeren tetramerik ve yüksek molekül ağırlığına sahip bir enzimdir (McClung 1997; Chaudiere and Ferrari 1999). Aynı zamanda CAT, düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite gösterebilir (Chaudiere and Ferrari 1999). CAT'ın görev aldığı reaksiyonlar aşağıdaki gibidir.



Pek çok bitki hücresinde enzimin büyük bir kısmı, H_2O_2 'nin yüksek olduğu peroksizomlarda bulunur. CAT çok az miktarda mitokondri matriksinde de bulunur. CAT'ın bitki dokusunda H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Patkowski and Urbanek 2003). Solunum zincirinde, oksijenin eksik indirgenmesinden oluşan H_2O_2 'yi O_2 'ye indirger (Chaudiere and Ferrari 1999). CAT'ın temel fonksiyonu, moleküler O_2 mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen radikal karakterli H_2O_2 'nin ve ROOH gibi bir peroksitin radikalliğini gidererek özellikle membranlarda oluşabilecek geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir. Zira H_2O_2 , singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) ve hidroksil radikallerinin ($\text{OH}^\cdot$) potansiyel kaynağıdır (Scandalios 1993; Chaudiere and Ferrari 1999).

Antioksidan enzimlerden bir diğeri **peroksidaz (POD)** (E.C.1.11.1.7) enzimidir. POD, H_2O_2 'yi kullanarak fenoller ve hidrokinonlar gibi çok sayıda aromatik bileşenlerin dehidrojenasyonunu katalizleyen (Bergmeyer and Grabl 1983) ve *HEM* prostetik grubuna sahip bir proteindir (Banci 1997; Kim *et al.* 2000). Çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahip olan POD, bitkilerde büyük oranda bulunur. POD, elverişsiz çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve bitki hücresinin en önemli koruyucu enzimlerinden birisidir (Bakardjieva and Christov 1996). Molekül ağırlıkları 35-100 kDa arasında değişmektedir. POD'lar aşağıdaki reaksiyonu katalizlerler.



Bitkilerde bu reaksiyon sonucu;

1. Serbest fenollerin oksidatif polimerizasyonu ile hücre duvarında lignin ve suberin biyosentezi gerçekleşir.

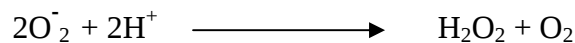
2. Hücre duvarına bağlı fenollerin oksidatif polimerizasyonu ile çapraz bağlanmalar olur ve hücre duvarı sertleşir. Sonuç olarak peroksidazlar hidrojen peroksidi kontrol altında tutarak hücre duvarının yapısına katılmasını sağlarlar.

POD'ların spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimleri bulunur. POD'lar organizmaya bağlı olmakla birlikte 3 sınıfa ayrılabilirler (Banci 1997).

1. Hücre içi (simplastik) peroksidazlar
2. Hücre dışı (apoplastik) peroksidazlar
3. Salgılanan bitki peroksidazları

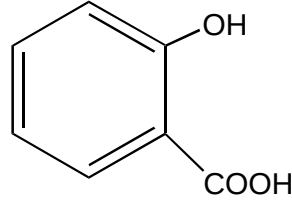
Düşük sıcaklık, SO₂, tuzluluk, parazit enfeksiyonu, patojenler, UV-ışık tesirleri gibi çeşitli stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenen POD aktivitesi, bu enzimin stres enzimi olarak anılmasına sebep olmuştur (Kerby and Somerville 1992; Bakardjieva Christov 1996; Chanda and Singh 1997; Lee and Lin 1996 a, b; Kim *et al.* 2000; Taşğın *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2009). Bitkisel POD; yapraklarda, yaralanan gövdelerde, kotiledon yapraklarda, çiçek saplarında bulunmuş ve bu doku hücrelerinde nükleus, mitokondri, ribozom, hücre membranları ve hücre dışında (apoplast) lokalize olmuştur (Bergmeyer and Grabl 1983; Banci 1997; Hamed *et al.* 1998; Kim *et al.* 2000; Taşğın *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2009). POD enziminin çok sayıda fizyolojik olayda rol oynadığı ve birçok metabolik olayın gerçekleşmesine yardımcı olduğu açıktır. Bu yüzden bu kadar çok işlev ile bağdaştırılan POD enzimi ile ilgili araştırmalar yoğun bir şekilde sürdürülmektedir.

Bitki hücrelerinde bulunan diğer önemli bir antioksidan **süperoksid dimutaz (SOD)** (E.C.1.15.1.1) enziminin, süperoksid radikalini (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve moleküler oksijene çevirebildiği anlaşılmıştır (Sairam and Srivastava 2000; Eyidoğan *et al.* 2003; Minibaeva and Gordon 2003).



SOD'un biri sitoplazmada, diğeri mitokondride olmak üzere iki izoenzimi vardır. Ökaryotlardaki mitokondriyal SOD, karakteristik Mn^{+2} muhtevası ve amino asit diziliş bakımından birçok bakterininkine benzer. Buna karşılık sitoplazmadaki ise tamamen farklı yapıya sahiptir ve Cu^{+2} ile Zn^{+2} iyonu ihtiva eder. Bu enzimler oldukça yüksek konsantrasyonda ve aktif bulunur. Çünkü mitokondride kullanılan oksijenin % 1 ile 5 arası süperoksidge dönüşmekte ve ancak yüksek bir SOD aktivitesi tarafından bertaraf edilebilmektedir. Birçok çevresel ve biyotik streslerde gerek apoplastik gerekse toplam hücrel SOD miktarının üretiminde artış olduğu belirlenmiştir (Hernandez *et al.* 2001; Minibaeva and Gordon 2003a; Eyidoğan *et al.* 2003; Mutlu *et al.* 2009).

Stres şartları altında artırılmış antioksidan kapasite, oksidatif hasarın etkisini azaltmak için her zaman yeterli olmayabilir. Bu yüzden stres toleransını sağlayan sinyal moleküllerle yapılan çalışmalar, bitkilerin olumsuz çevrelere nasıl uyum sağladıklarını anlamamıza büyük katkı sağlayacaktır. **Salisilik asit (SA)** veya diğeri adıyla orto-hidroksi benzoik asit, bitki fenolikleri grubundan bir bileşiktir. Son çalışmalar, SA'nın çevresel streslere karşı, bitki savunma cevabı oluşmasında kullanılan, hormon benzeri doğal bir sinyal molekül olduğunu göstermektedir. Bunun yanında, bazı araştırmacılar SA'nın doğal bir bitki hormonu olduğunu da kabul etmektedirler. Çünkü SA bitki dokularında çok düşük konsantrasyonlarda sentezlenir ve bitkinin diğeri dokularına taşınarak fizyolojik cevapların oluşumunu sağlar (Kocaçalışkan 2004). Serbest SA, 157-159 °C'de eriyen toz kristali şeklindedir. Suda az çözünürken, polar organik çözücülerde iyi çözünür. Sulu çözeltilerinin pH'sı 2.4 tür. SA bitkide aktif bir şekilde taşınabilir ve metabolizmaya katılır. Hem de dışsal uygulama noktasından bitkinin farklı dokularına kolaylıkla yayılabilir (Raskin 1992a,b). Bitki kaynaklı salisilatlar antik çağdan beri tıpta kullanılmaktadır. 1828 de Münih'te ilk kez salisilin, söğütten izole edilmiş ve sonra söğüt ağacının Latince ismi olan *Salix*'ten dolayı salisilik asit olarak isimlendirilmiştir (Mutlu 2005).



Salisilik asit

Modern analitik teknikler kullanılarak, pek çok önemli bitki türünün salisilatları sentezledikleri bulunmuştur. SA'nın en yüksek seviyesi patojen istilasına uğramış bitki doku ve nekrozlarında belirlenmiştir (Raskin 1992a,b; Durner *et al.* 1997; Mauch-Mani and Metraux 1998). SA'nın fizyolojik bir etkisi için ilk gösterge ise tütün hücre kültüründe çiçeklenme hareketini teşvik etmesi ve gonca oluşumunun keşfidir (Eberhard *et al.* 1989). SA'nın çiçeklenmedeki uyarıcı etkisi daha sonra başka bitki türlerinde gösterilmiş ve bu SA'nın çiçeklenmenin içsel bir düzenleyici olduğu önerisini güçlendirmiştir (Cleland and Ajami 1974). Bunun yanında, bazı bitkilerin rizosferinde üretilen SA'nın allelopatik kimyasal bir rol oynadığı ve salgılanan bitkinin çevresinde büyüyen birçok bitkinin büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur (Schettel and Balke 1983).

Birçok araştırmacı, SA'nın ultraviyole ışığı, kuraklık, soğuk ve tuz stresi gibi birçok çevresel streslerde de bitki cevabını düzenlediğini göstermiştir (Janda *et al.* 1999; Singh and Usha 2003; Taşgın *et al.* 2003 ve 2006; Ananieva *et al.* 2004; Sakhabutdinova *et al.* 2004; Mutlu *et al.* 2009). Buna ek olarak, soğuk şartlar altındaki bitkilere dışsal SA uygulaması, direk veya dolaylı olarak antioksidan enzim aktivitelerini değiştirebilmektedir (Taşgın *et al.* 2006). SA'nın antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi, H₂O₂ metabolizmasını düzenlemek ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Janda *et al.* 2003). SA, zayıf bir deterjan özelliği gösterdiği ve hücre yüzeyinin elektrik yükünü değiştirdiğinden, hücre içerisindeki bazı antioksidan enzimlerin hücre dışına sekresyonunda rol oynadığı yönünde görüşler de bulunmaktadır (Minibaeva and Gordon 2003a). Ancak, SA'nın yukarıda belirtilen pek çok fizyolojik ve biyokimyasal etkilerine rağmen, içsel SA'nın bu mekanizmadaki düzenleyici rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Taşgın *et al.* 2006).

Buğdaygillerden tek yıllık bir bitki olan **arpa** (*Hordeum vulgare*); $2n=14$ kromozomlu, kendine döllenebilen, ekvatorndan 70° kuzey ile 45° güney enlemine ve 4480m yüksekliğe kadar geniş bir yayılım alanına sahiptir. FAO'ya göre 2005 yılında dünyada tahıllar içinde üretimde buğday ve mısırdan sonra 56 milyon hektarlık ekim alanı ve 138 milyon tonluk üretimle 3. sırada yer alan önemli bir bitkidir. Türkiye'de ise buğdaydan sonra 9 milyon tonluk üretimle ikinci sıradadır. Türkiye'nin tüm illerinde az ya da çok yetiştirilen arpa üretiminin yarıya yakın kısmını İç Anadolu Bölgesi karşılar. Kısa sürede olgunlaştığından (80-90 gün) Erzurum-Kars plâtolarında 2000-2200 m'ye kadar yetişebilmektedir. Daha çok hayvan yemi olarak kullanılmakla beraber malt sanayisinin de hammaddesidir (Sencar *et al.* 1997). Yapılan arkeolojik kazılar arpanın ilk kültüre alınan bitki olduğunu ortaya koymuştur. Bu araştırmalarda arpanın yaklaşık on bin yıldır yetiştirildiğini ve kökeninin Mezopotomya olduğunu göstermektedir (Harlan and Zohary 1966). Bir uzun gün bitkisi olan arpa değişik gün uzunluklarına da uyum sağlayabilmektedir. Serin iklim tahılları içinde iklim isteği en fazla olanıdır. Sıcaklığı 0°C nin altına düşmeyen ve $18-20^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerine çıkmayan, nispi nemi %70 - 80 olan yerler arpa için çok uygundur. Kuraklığa ve soğuğa dayanıklı değildir. Bu nedenle Doğu Anadolu'nun yüksek yaylalarında kışlık ekim yapılamaz (Karahocagil ve Ege 2004). Açıkça, arpa üretimini artırmanın en etkili yollarından birisi, soğuk stresine toleransını artıracak araştırmalardan geçmektedir.

Soğuğa dirençli kışlık bitkilerde, SA apoplastik proteinleri etkileyerek bu bitkilerin soğuk stresine karşı korunmasında rol oynadığı belirlenmiştir (Taştın *et al.* 2006). Ancak, soğuğa dirençli olmayan bitkilerin soğuğa cevap mekanizmasında hem apoplastik proteinlerin hem de SA'nın apoplastik proteinler üzerindeki etkileri bilinmemektedir.

İlk kez bu çalışmada, düşük sıcaklıklara hassas bitkiler (2 çeşit arpa) soğuk stresine maruz kaldığında apoplastik ve simplastik bölgelerinde oluşan cevap ve bu cevabın oluşumunda apoplastik proteinlerin ve salisilik asidin etkileri ortaya konulmuştur. Bunun yanında, bitkilerin soğuk hasarından korunmasında, salisilik asidin en etkili olduğu konsantrasyonu ve etki süresi de belirlenmiştir. Bu çalışmayla, SA'nın

apoplastik ve simplastik bölge üzerindeki etkisinin belirlenmesi, soğuğa hassas bitkilerin soğuğa cevap mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Ayrıca, bu çalışmada SA'nın soğuk zararından korumada etkili olduğu konsantrasyonu ve etki süresinin belirlenmesi, SA'nın tarla şartlarında uygulanabilirliği üzerine katkı sağlayacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Son yıllardaki çalışmalarla birçok bitkinin donma stresine karşı korunmak için özel mekanizmalar geliştirdikleri ortaya konmuştur (Griffith 1997, Hoshino 1999, Ewart 1999, Yu and Griffith 2001). Soğuğa dirençli ve hassas değişik bitkiler arasındaki kalitatif ve kantitatif protein çeşitliliği bir çok çalışmada ortaya konmuştur (Cloutier 1983; Griffith 1997; Hoshino 1999; Ewart 1999; Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b; Yu and Griffith 2001; Taşğın *et al.* 2006). Kışlık bitkilerde donma toleransının artması düşük sıcaklığa belirgin bir uyum periyodundan sora gelişir. Bu periyot düşük sıcaklıkta sentezi artan proteinlerin birikimini sağlar. Bu proteinlerin bazıları, donmadan koruyucu kriyoproteinler, kinaz regülâtörleri, dehidrin içerenler ve intraselüler olanlardır (Jarillo 1994; Close 1997; Wisniewski 1999). Donma hasarından koruyucu proteinlerin işlevsel özellikleri, intraselüler proteinleri ve donma-erime süresince membranları korumaktır (Anchordaguy 1987). Bir donma stresinden koruyucu protein olan β -1,3 glukanaazın donma ve erimeye karşı tilakoidleri koruduğu bildirilmiştir (Hinch *et al.* 1997). Ayrıca, soğuğa karşı dayanıklılığın kazanılmasında artan antioksidan savunma sistemlerinin de bu mekanizma içerisinde önemli role sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Yang *et al.* 2001; Posmyk *et al.* 2005; Taşğın *et al.* 2006; Morsy *et al.* 2007).

Soğuk şartlara maruz bırakılan bitkilerde meydana gelen **donma hasarı** üzerine birçok araştırma mevcuttur. Soğuğa dayanıklı ve hassas dört farklı mandalina çeşidine ait meyveler, soğukta depolanmış ve bunların donma hasarına bakılmıştır. Mandalinanın *Clementine* ve *Clemenules* çeşitlerinde donma hasarı çok düşükken, *Fortuna* ve *Nova* çeşitlerinde donma hasarının oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (Sala 1998). Yine mandalina ile yapılan bir çalışmada, meyveleri yüksek sıcaklık şartlarına maruz bırakılmış ve bitkide donma hasarına bakılmıştır. Kontrol şartlarındaki bitkilerde donma hasarı düşükken, sıcaklık muamelelerine maruz kalan bitkilerde ise donma hasarının arttığı tespit edilmiştir (Sala *et al.* 2000). Mungbean bitkisi soğuk şartlarında (4 °C'de) bekletildiğinde, bekleme süresi uzadıkça hasarın arttığı gözlenmiştir (Chang *et al.* 2001). Kışlık çavdar, karalahana ve kışlık buğday ile yapılan çalışmalarda, bitkiler

düşük sıcaklıklarda yetiştirilmiş ve sıcaklık düştükçe donma hasarının azaldığı tespit edilmiştir (Marentez *et al.* 1993, Atıcı and Nalbantoğlu 1999a, Taşgın *et al.* 2003). Özellikle, kışlık buğday yapraklarındaki hasarda %50 azalmanın olduğu belirlenmiştir. Donma hasarındaki bu düşüşte apoplastik bölgenin rolünü belirlemek için, apoplastik bölge sıvısı yapraklardan uzaklaştırıldıktan sonra, yapraklarda donma hasarının %10 arttığı belirlenmiştir (Atıcı and Nalbantoğlu 1999a).

SA'nın sıcak ve soğuk stresindeki bitkilerde donma hasarına etkisini belirlemek için yapılan çalışmalarda, 10 μ mol SA konsantrasyonunun uygun olduğu belirlenmiştir (Dat *et al.* 1998, Taşgın *et al.* 2003). SA ve metil-SA (MeSA) muamelesi mısır yapraklarında (Janda *et al.* 1999) domateste (Ding *et al.* 2002) ve muz tohumlarında (Kang *et al.* 2003) donma hasarına karşı direnci artırmıştır. Ayrıca salatalık, fasulye ve pirinç bitkileri SA ile muamele edilmiş ve bu bitkilerin de soğuğa karşı direnç kazandığı belirlenmiştir (Kang *et al.* 2002, Bishop 2002). Domates ve fasulye bitkileri asetil-SA ile muamele edilmiş ve bitkilerin soğuğa karşı tolerans kazandığı tespit edilmiştir (Senaratna *et al.* 2000). Pirinç fidelerinde SA'nın hücre membranlarındaki elektrolit sızıntısını önleyerek donma toleransını sağladığı bulunmuştur (Kang and Saltveit 2002). Eksojen SA uygulamasıyla hem kontrol hem de düşük sıcaklık şartlarında yetiştirilen buğday yapraklarında donma hasarının düşmesine sebep olduğu belirlenmiştir (Taşgın *et al.* 2003). Tohumlarına SA emdirilmiş hibrit mısırla (*Zea mays*) yapılan bir çalışmada SA'nın membran geçişlerini azaltarak donma hasarını engellediği bulunmuştur (Farooq *et al.* 2008).

Su içinde çözünebilen maddelerin (mineraller, şekerler, proteinler) suyun donma noktasını (buz kristallerinin oluşma sıcaklığı) düşürmesi olarak kabul edilen **buz nükleasyon aktivitesi** üzerine birçok araştırma vardır. Kışlık ve yazlık çavdar ile buğday, kışlık arpa, karalahana, kışlık bezelye yapraklarının apoplastik bölgelerinde soğuk uyumu sonrasında bazı özel proteinlerin sentezlenmiş olduğu tespit edilmiştir (Griffith *et al.* 1992, Marentez *et al.* 1993, Hon *et al.* 1994, Antikainen and Griffith 1997, Taşgın *et al.* 2003). Bu bitkilerden, kışlık çavdar, kışlık buğday ve karalahana yapraklarından ekstrakte edilen apoplastik sıvıdaki proteinlerin buz nükleasyon aktivitesini artırdıkları belirlenmiştir (Marentez *et al.* 1993, Atıcı and Nalbantoğlu

1999a,b, Taşğın *et al.* 2003). Özellikle kışlık buğdayda aktivitenin önemli derecede artırıldığı tespit edilmiştir (Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b,)

Buğday yapraklarına eksojen SA uygulamasıyla buz nükleasyon aktivitesinde hem kontrol hem de düşük sıcaklık şartlarında büyük bir artışa sebep olmuştur (Taşğın *et al.* 2003). Bu literatür bilgileri, SA'nın apoplastik bölgedeki protein sentezinde direk veya dolaylı olarak önemli bir rol üstlendiğini düşündürmektedir.

Uzun yıllardan beri insan vücudunda biyokimyasal streslerin belirlenmesinde **hidrojen peroksit (H₂O₂)** bir biyolojik işaret olarak kullanılması (Halliwell *et al.* 2000) ve oksidatif stresler sırasında miktarının artması, bitkilerle ilgilenen bilim insanları için bitkilerde de bu molekülün stresin bir işareti olduğu fikrini uyandırmıştır (Cheeseman 2006). Mevcut bilgiler, bitkilerdeki önemli sinyal dizinlerinde H₂O₂'nin var olduğunu göstermektedir. Bu olaylara patojen saldırısını (Wojtaszek 1997; Orozco-Cárdenas *et al.* 2001; Kachroo *et al.* 2003), stoma hareketleri (Chen and Gallie 2004), kazanılmış sistemik direnci (Chen *et al.* 1993) ve programlanmış hücre ölümlerini (Levine *et al.* 1994) örnek verebiliriz. Bununla birlikte H₂O₂'nin hücrelerde hızlı bir şekilde metabolize edilmesi ve dokulardaki gerçek seviyesinin ne olduğu ile ilgili belirsizlikler, strese verilen cevap mekanizmalarını anlamayı zorlaştırmaktadır.

Bitkisel dokularda H₂O₂ konsantrasyonunun düşük olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Örneğin, bezelyelerle yapılan bir çalışmada dışarıdan 6–8 mM H₂O₂ uygulandığında, bitkide doku hasarlarına ve hücre ölümlerine sebep olduğu gibi SOD (Bhattacharya *et al.* 2004) ile Rubisco'nun (Badger *et al.* 1980) inhibisyonunu da sağladığı görülmüştür (Levine *et al.* 1994). Diğer taraftan canlıların çoğu gibi bitkilerde de H₂O₂'yi çarpıcı seviyede metabolize eden mekanizmalar mevcuttur. Örneğin, 10 mM H₂O₂ ile muamele edilen hücre bu miktarı 10 dakikadan daha az sürede metabolize edebilmektedir (Levine *et al.* 1994). Bitkisel dokularda H₂O₂'nin düşük olması ile ilgili başka çalışmalar da vardır. Bu çalışmalardan birinde tütün (Patykowski and Urbanek 2003) yapraklarında normal şartlarda gram dokuda 0.15 µmol, şeftali meyve dokusunda 0.35 µmol (Brennan and Frenkel 1977) ve mangrov bitkisinde 0.067 µmol (Parida and Das 2005) olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmaların aksine, yaprağın gram dokusundaki

H₂O₂ seviyesinin çok daha yüksek olduğunu belirten çalışmaları da görmekteyiz. Örneğin, Chaparzadeh *et al.* (2004), oda şartlarında gelişimini sürdüren kadife çiçeğinde (*Calendula officinalis*) gram dokuda 6 µmol gibi yüksek H₂O₂ olduğunu rapor etmiştir. Benzer başka bir çalışmada oda şartlarında yetiştirilen *Phragmites australis* bitkisinin yabani formlarının yapraklarında gram dokuda 5 ile 15 µmol H₂O₂ belirlenmiştir (Velikova and Loreto 2005). Bu çalışmalarda H₂O₂'nin seviyesiyle ilgili farklı değerlerin verilmesi biyolojik çeşitlilikten ziyade, deneylerde kullanılan metodoloji ve deneysel belirsizliklerden kaynaklanmaktadır (Cheeseman 2006). Örneğin, mısırla yapılan çalışmalardan birinde gram dokudaki H₂O₂ miktarı 20 µmol (Tewari *et al.* 2004) bulunurken, başka bir araştırmacı 0.1 µmol (Kim *et al.* 2003) olarak bulmuştur. Her iki araştırmacının çalışmalarına baktığımızda, farklı metotlarla H₂O₂ miktarını belirlediklerini görmekteyiz.

Diğer taraftan yaprak dokusundaki H₂O₂'nin çevresel streslere cevapta etkili olduğu ile ilgili birçok çalışma da rapor edilmiştir. Şeftali meyve dokusunda KCN ile katalaz enzimi inhibe edildiğinde H₂O₂ seviyesinin 0.35 ten 0.8 µmol'a çıktığı kaydedilmiştir (Brennan and Frenkel 1977). Serada mangrov bitkisine hidroponik ortamda tuz verildiğinde, H₂O₂ seviyesinin gram dokuda 0.067'den 0.089 µmol'a çıktığı belirlenmiştir (Parida and Das 2005). Sera şartlarında ozon stresine muamele edilen bir bitkide H₂O₂ seviyesinin gram dokuda 0,03 µmol'dan 0.06 µmol'a çıktığı ve özellikle de kloroplastlarda birikiminin olduğu tespit edilmiştir (Chen and Gallie, 2004; 2005). Tütünle yapılan bir çalışmada normal şartlarda yapraklarının gram dokusunda 0.15 µmol olan H₂O₂ seviyesi *Botrytis cinerea* patojeni ile muamele edilmesiyle 0.2 µmol'a yükseldiği gösterilmiştir (Patykowski and Urbanek 2003). Kadife çiçeği (*Calendula officinalis*) tuz stresine (100 mM) maruz bırakıldığında H₂O₂ seviyesinin normale göre %26 arttığı gösterilmiştir (Chaparzadeh *et al.* 2004). *Phragmites australis* bitkisi kısa süreli yüksek sıcaklık (38 °C) stresine maruz bırakıldığında H₂O₂ miktarında önemli bir artış belirlenmiştir (Velikova and Loreto 2005). Su stresine maruz bırakılan bezelye bitkisinde yapraklarda doku hasarıyla birlikte H₂O₂ miktarında da büyük bir artış rapor edilmiştir (Kocsy *et al.* 2005).

Düşük sıcaklıklarda hücre içi H_2O_2 miktarının nasıl etkilendiği ile ilgili çalışmalar da mevcuttur. Norveç ladin ağacı $-10^\circ C$ gibi çok düşük sıcaklıklara 45 gün gibi uzunca bir süre maruz bırakıldığında ROT üretimindeki artışla birlikte H_2O_2 miktarında da önemli derecede bir artış görülmüştür (Kaminska-Rozek and Pukacki 2005). Arpayla yapılan bir çalışmada ise soğuk stresi etkisi ile H_2O_2 üretiminin önemli miktarda azaldığı görülmüştür. Bu durumun sebebini tüm metabolizmanın yavaşlaması olabileceğini savunan bazı araştırmacılar mevcuttur (Saruyama and Tanida 1995). Mercimek bitkisine ise soğuk stresi uygulandığında, gövde dokusunda H_2O_2 içeriğinin önemli bir şekilde arttığı gözlenmiştir (Öktem *et al.* 2008).

SA'nın bitkilerdeki hücresel H_2O_2 miktarı üzerine bazı çalışmalar yapılmıştır. Tütünle yapılan bir çalışmada, SA uygulamasından 24 saat sonra içsel H_2O_2 miktarı gram dokuda 0.15'den 0.25 μmol 'a yükseldiği tespit edilmiştir (Patykowski and Urbanek 2003). Diğer bir çalışmada ise su stresi altındaki iki buğday çeşidinde yapraklara püskürtülen SA'nın H_2O_2 miktarını kontrol bitkisine göre düşürdüğü bulunmuştur (Agarwal *et al.* 2005).

Lipid peroksidasyonu, hücre zarı lipidlerinin serbest radikallerle (süperoksid anyonu, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali) etkileşmesi sonucu ortaya çıkar ve sonuçta hücresel zarların bozulmasına yol açar. Bu peroksidasyonun derecesi, hücresel düzeyde stresin sebep olduğu hasarın hem ölçütü hem de yansıması olduğu kabul edilmektedir (de Azevedo Neto *et al.* 2006). Stres şartlarında, doymamış yağ asitlerinin peroksidasyon ürünü olarak ortaya çıkan malondialdehit (MDA) miktarındaki artış, hücre zarlarının yapısal bütünlüğünün bozulduğunu gösteren iyi bir indikatördür (Posmyk *et al.* 2005). Yüksek sıcaklığa maruz bırakılmış arpa yapraklarının membran lipid peroksidasyonu düzeyinde artış belirlenmiştir (Kappen, 1981). Bazı ağır metallerin toksik dozlarının bitkilerde lipid peroksidasyonu uyardığı tespit edilmiştir (De Vos *et al.* 1989; 1991; Çakmak *et al.* 1991; Çınar 2005). Tuzluluğa dayanıklılığı farklı iki fasulye çeşidiyle yapılan bir çalışmada, tuz uygulamasıyla hassas varyetede daha fazla olmak üzere iki çeşitte de MDA seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Yasar *et al.* 2008). Bazı asma (*Vitis vinifera*) çeşitlerine uygulanan kuraklık stresinin lipid peroksidasyonda önemli derecede artışa sebep olmuştur (Yağmur 2008). Kuraklık stresiyle ilgili diğer bir

çalışmada iki kahve türü (*Coffea arabica* ve *C. liberica*) orta derecedeki kuraklık şiddetinde lipid peroksidasyonu görülmezken, şiddetli kuraklık stresinde, özellikle kuraklığa daha duyarlı olan *C. arabica* türünde, MDA birikiminin daha fazla olduğu gözlenmiştir (Cai *et al.* 2005). Su stresi altında büyütülen buğday fidelerinde lipid peroksidasyonunda büyük bir artışın olduğu kaydedilmiştir (Tatar and Gevrek 2008).

Düşük sıcaklık stresinden kaynaklanan oksidatif stresin hücre zarlarında lipid peroksidasyonuna neden olduğu ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Soğuk stresine maruz bırakılmış kışlık çavdar, tütün, *Arabidopsis thaliana*, ve patatesten lipid peroksidasyon ürünü olan MDA içeriğinin arttığı belirlenmiştir (Lynch and Steponkus 1987; Moon *et al.* 1995; Uemura *et al.* 1995; Lin *et al.* 2006). Nohutla yapılan bir çalışmada da soğuğa maruz kalan fidelelerde MDA miktarının, buna bağlı olarak da lipid peroksidasyon aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Turan 2007). Mercimek bitkisine soğuk stresi uygulandığında, kök ve gövde dokusunda MDA içeriğinde kayda değer bir artış kaydedilmiştir (Öktem *et al.* 2008).

Salisilik asidin (SA) lipid peroksidasyonu üzerine etkileri ile ilgili literatür bilgisi kısıtlıdır. *Taxus chinensis* bitkisi patojenle muamele edilmiş ve MDA seviyesinin arttığı belirlenmiş, patojenle birlikte SA uygulandığında ise MDA seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir (Yu *et al.* 2001). Bir yıllık üzüm fideleriyle yapılan bir çalışmada yapraklara püskürtülen SA'nın MDA seviyesini düşürdüğü belirlenmiştir (Wang *et al.* 2003). Su stresi altındaki iki buğday çeşidiyle yapılan bir çalışmada yapraklara püskürtülen SA'nın LPO aktivitesini düşürdüğü bulunmuştur (Agarwal *et al.* 2005). Fasulye ile yapılan çalışmada tek başına verilen SA lipid peroksidasyonunu etkilemezken, tuz verilmesiyle artan LPO miktarını SA uygulamasının önemli derecede düşürdüğü bulunmuştur (Palma *et al.* 2009).

Bitkilerde antioksidan enzim sisteminin önemli bir elamanı olan **katalaz (CAT)** enziminin aktivitesine etki eden faktörler (tuz, patojen, soğuk, sıcaklık, kuraklık ve su stresi) ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Üç farklı yulaf çeşidine bir fungal patojeni muamele edildikten 24 saat sonra, birinde CAT aktivitesi yükselirken, 2.

örnekte aktivitenin azaldığı belirlenmiştir (Vanacher *et al.* 1998a). Tuz stresi altında büyütülen buğday, pirinç ve salatalık ile yapılan çalışmalarda, her üç bitkide de CAT aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir (Keleş and Öncel 2002; Shim *et al.* 2003). Ancak, tuz stresi altında yapılan diğer bir çalışmada, Sinameki (*Cassia angustifolia*) ve soya fasulyesi bitkilerinde CAT aktivitesi önemli derecede yüksek olduğu gözlenmiştir (Agarwal and Pandey 2004; Ghorbanli *et al.* 2004). Tuz stresine toleransları farklı iki çeşit dut bitkisiyle yapılan bir çalışmada ise, CAT aktivitesinin tuza dayanıklı varyetede daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Sudhakar *et al.* 2001). Kuraklık, yüksek sıcaklık ve su stresine maruz bırakılmış buğday bitkisinde CAT aktivitesinde çok büyük bir düşüş tespit edilmiştir (Keleş *et al.* 2002). Kuraklık stresi uygulanan mercimek bitkisinde kök dokusunda CAT aktivitesinde artış gözlenmiştir (Öktem *et al.* 2008).

Buğday, arpa, çavdar ve yulaf bitkileri soğuk şartlarda büyütüldüğünde ise CAT aktivitesinin önemli derecede düştüğü belirlenmiştir (Janda *et al.* 2002, 2003). Buğdayla yapılan bir diğer çalışmada soğuk muamelesiyle CAT aktivitesinde önemli bir artış tespit edilmiştir (Keleş *et al.* 2002). Soğuğa dayanıklı ve hassas dört farklı mandalina kültürü soğukta depolanmış, bu mandalinaların kabuklarında ve meyvelerinde CAT aktivitesine bakılmış ve hassas türlerde depolama süresince CAT aktivitesi düşerken toleranslı türlerde aktivitenin yükseldiği belirlenmiştir (Sala 1998; Sala *et al.* 2000). Soğuk şartlarda yetiştirilen salatalık ve pirinç filizlerinde CAT aktivitesindeki artışın donma toleransı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Saruyama *et al.* 1995; Kang *et al.* 2001, 2002). Ayrıca soğuk stresi birçok bitkide, özellikle soğuğa duyarlı genotiplerde, CAT aktivitesinde belirgin bir düşüşe neden olmaktadır (Lukatkin, 2002). CAT aktivitesindeki değişimler alp çiminde aylık olarak takip edilmiş ve havaların soğuduğu sonbahar mevsiminde aktivitenin arttığı tespit edilmiştir (Zhou and Zhao 2004). Tropikal bir bitki olan soya fasulyesi (*Glycine max*) kademeli olarak düşük sıcaklıklara maruz bırakıldığında bitkinin kök ve gövdesinde CAT aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Yadeghari *et al.* 2008).

SA uygulanmış bezelye, tütün ve mantarda SA'nın CAT aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Aebi 1974; Willekens *et al.* 1997; Martima *et al.* 1995; Srivastava *et al.* 2001). Yine, mısır fidelerine 1 mM SA uygulandığında, yapraklarda CAT aktivitesinin

inhibe edildiği belirlenmiştir (Padu 1999; Horvath *et al.* 2002). Sadece SA'nın değil aynı zamanda onun türevi olan asetil-SA'nın da mısır bitkisinde CAT aktivitesinde düşüşe neden olduğu gözlenmiştir (Westhuizen *et al.* 1998). Muz bitkisinde 0.5mM ve 1mM SA uygulaması, CAT aktivitesinin ilk günlerde düşüşüne, ilerleyen günlerde tekrar yükselmesine neden olmuştur (Srivastava *et al.* 2000). Arpa ile yapılan çalışmada ise SA'nın CAT aktivitesini normale göre yükselttiği görülmüştür (Souza *et al.* 2001). SA'nın birkaç bitki türünde CAT aktivitesinin temel bir bölgesini bloklamak suretiyle H₂O₂'nin birikimine neden olduğu ve bu nedenle enzimi inhibe ettiği kabul edilmektedir (Raskin, 1992a,b). Soğuk şartlarda (2.5 °C) SA uygulanmış salatalık ve mısır bitkisinde yaprak, kök ve kotiledonlarda CAT aktivitesinin kontrol değerleri ile aynı olduğu bulunmuştur (Kang *et al.* 2002). Muz bitkisi soğukta yetiştirilip SA uygulandığında, soğuk ve SA kontrole göre CAT aktivitesini düşürürken, SA soğukta CAT aktivitesini artırmıştır (Kang *et al.* 2003). Kışlık buğday yapraklarına eksojen SA uygulaması CAT aktivitesinde hem kontrol hem de düşük sıcaklık şartlarında düşüşe sebep olmuştur (Taşğın *et al.* 2006).

CAT bitki yapraklarının apoplastında da belirlenmiştir (Edwards *et al.* 1991; Wingsle *et al.* 1991; Vanacker *et al.* 1998b, Taşğın *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2009). Örneğin, kışlık arpa yapraklarında apoplastik CAT aktivitesi hücredeki seviyesine göre %18 olduğu belirtilmiştir (Baet *et al.* 2000). İki domates çeşidi patojenle muamele edildiğinde, apoplastik CAT aktivitesinin yükseldiği tespit edilmiştir (Vanacker *et al.* 1998a; Patykowski *et al.* 2003). Eksojen SA uygulaması kışlık buğdayda apoplastik CAT aktivitesini hem kontrol hem de düşük sıcaklık şartlarında düşürmüştür (Taşğın *et al.* 2006). Son olarak tuz toleransları farklı iki buğday çeşidinde apoplastik CAT aktivitesi her iki varyetede tuz uygulamaları ile artarken, tuz+SA uygulamaları ile düşmüştür (Mutlu *et al.* 2009). Bu araştırmalara göre salisilik asidin oksidatif stresler sırasında üretilmesi ve oksidatif strese girmiş bitkilerde CAT aktivitesini genelde düşürmesi mümkün görülmektedir.

Bitkilerde antioksidan enzim sisteminin diğer bir elamanı olan **peroksidaz (POD)** aktivitesine etki eden faktörlerle (tuz, patojen, soğuk, sıcaklık, kuraklık, ozon, besin ve su stresi) ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Fasulye bitkisi, asit yağmuru, asit

yağmuru + spermidin veya asit yağmuru + spermin muamelesinde, ilk saatlerde POD aktivitesi yüksekken, ilerleyen saatlerde aktivitenin düştüğü görülmüştür (Velikova *et al.* 2000). Ladin ağacı yapraklarının apoplastında POD aktivitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Otter *et al.* 1997), ancak kuraklık stresi ve ozon muamelesi uygulandığında, hücresel ve apoplastik POD aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir (Kronfuss *et al.* 1996). Yüksek ve düşük nitrat uygulamalarında, genç ve olgun buğday bitkilerinin hücresel ve apoplastik POD aktivitesi karşılaştırıldığında, her iki durumda da, hücresel POD aktivitesinin apoplastik POD aktivitesinden yüksek olduğu bulunmuştur (Padu 1999). Yulaf bitkisi, fungal bir patojen ile enfekte olduğunda hücresel ve apoplastik POD aktivitelerinin düştüğü (Vanacker *et al.* 1998a), buna karşılık patojen ile enfeksiyonlu buğday ve arpada apoplastik POD aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Bishop 2002). Başka bir çalışmada, domates bitkileri patojenle muamele edildiğinde, apoplastik POD aktivitesinin yükseldiği belirlenmiştir (Patykowski *et al.* 2003). Kışlık arpa yapraklarında ise apoplastik POD aktivitesinin hücresel aktiviteye göre oranının %394 gibi yüksek bir değerde olduğu ileri sürülmüştür (Baet *et al.* 2000). Hindiba (*Cichorium intybus*) bitkisiyle yapılan bir çalışmada ışık-karanlık periyodunda apoplastik POD aktivitesi, ışıktaki uyarılırken, karanlıkta düştüğü görülmüştür (Boeuf *et al.* 1999; 2001). Buğday, çeltik, sinameki (*Cassia angustifolia*) bitkisi ve soya fasulyesinde POD aktivitesi tuz stresi ile önemli derecede artmıştır (Lin and Kao 2000; Sakhabutdinova *et al.* 2004; Agarwal and Pandey 2004; Ghorbanli *et al.* 2004). Tuz stresine toleransları farklı iki çeşit dut bitkisiyle yapılan bir çalışmada ise apoplastik POD aktivitesinin tuza dayanıklı varyetede daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Sudhakar *et al.* 2001). Son olarak tuz toleransları farklı iki buğday çeşidinde apoplastik POD aktivitesi tuz uygulamaları ile dayanıklı çeşitte artarken, hassas çeşitte düştüğü belirlenmiştir (Mutlu *et al.* 2009).

Yapılan bir çalışmayla soğuk şartlarda POD'un serbest radikalleri tutma özelliğine sahip olduğu ortaya konmuştur (Burris 1960). Papatya bitkisiyle yapılan bir çalışmada 15 °C'de depolanan bitkilerde POD aktivitesi düşükken, 5 °C'de aktivitenin arttığı tespit edilmiştir (Setha *et al.* 2000). Ladin ağacında aylara göre POD aktivitesi takip edilmiş ve sıcaklığın düştüğü Kasım ayında hem apoplastta hem de simplastta aktivitenin yükseldiği tespit edilmiştir (Polle *et al.* 1994). Soğukta ve kontrol şartlarda depolanan

elmalarda depolama sonunda POD aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir (Leja *et al.* 2003). Buğday, arpa, çavdar ve yulaf bitkileri soğukta büyütüldüklerinde POD aktivitesinin arttığı bulunmuştur (Janda *et al.* 2003). Soğuğa dayanıklı ve hassas dört farklı mandalina kültürü soğukta depolanmış, bu mandalinaların kabuklarında ve meyvelerinde POD aktivitesine bakılmış ve hassas türlerde depolama süresince POD aktivitesi düşerken, toleranslı türlerde aktivitenin yükseldiği belirlenmiştir (Sala 1998). Soğuk şartlarda yetiştirilen salatalık ve pirinç filizlerinde POD aktivitesindeki artışın donma toleransı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Saruyama *et al.* 1995; Kang *et al.* 2001; 2002). Norveç ladin ağacı -10 °C'ye 45 gün maruz bakıldığında POD aktivitesinde de önemli derecede bir düşüş gözlenmiştir (Kaminska-Rozek and Pukacki 2005). Kışlık buğdayla yapılan bir çalışmada soğuk uygulaması apoplastik POD aktivitesini genelde artırmıştır (Taşgın *et al.* 2006). Soya fasulyesi (*Glycine max*) ile yapılan bir çalışmada kademeli olarak düşük sıcaklıklara maruz bırakıldığında bitkinin kök ve gövdesinde POD aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Yadeghari *et al.* 2008). Mercimek bitkisine soğuk stresi uygulandığında kök dokusunda POD aktivitesinde önemli bir artış kaydedilmiştir (Öktem *et al.* 2008).

Mısır ve havyar bitkisinde yapılan çalışmalarda, SA uygulaması POD'un aktivitesini artırmıştır (Dat *et al.* 1998; Padu 1999; Horvath *et al.* 2002; Yee *et al.* 2002). Ancak, *Cuscuta reflexa* ve bezelye bitkisinde ise SA'nın POD aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir (Aebi 1974; Srivastava *et al.* 2001). Muz meyvesi olgunlaşma süresince SA uygulanmış ve POD aktivitesi ilk günlerde düşmesine rağmen ilerleyen günlerde tekrar yükselmeye başladığı gözlenmiştir (Srivastava *et al.* 2000). Soğuk şartlarda (2.5 °C) SA uygulanmış salatalık ve mısır bitkisinde yaprak, kök ve kotiledonlarda POD aktivitesinin kontrol değerleri ile aynı olduğu bulunmuştur (Kang *et al.* 2002). Muz bitkisi soğukta yetiştirilip SA uygulandığında, soğuk ve SA kontrole göre POD aktivitesini artırmıştır (Kang *et al.* 2003). Kışlık buğdayla yapılan bir çalışmada soğuk stresi+SA uygulamasının apoplastik POD'u artırdığı belirlenmiştir (Taşgın *et al.* 2006). Farklı iki buğday çeşidiyle yapılan bir çalışmada ise tuzlu koşullar altında SA uygulaması, apoplastik POD aktivitesini dayanıklı çeşitte artırırken, hassas çeşitte değiştirmedeği gözlenmiştir (Mutlu *et al.* 2009).

Bitkilerde antioksidan enzim sistemi içerisinde önemli bir görevi olan **süperoksit dismutaz (SOD)** enzimi aktivitesine etki eden faktörlerle (tuz, patojen, soğuk, sıcaklık, kuraklık, ozon, besin ve su stresi) ilgili de birçok çalışma bulunmaktadır. Oksidatif stres altındaki buğday genotiplerinde SOD aktivitesinde bir değişiklik gözlenmezken (Sairam and Srivastava 2000), yüksek sıcaklık stresi veya tuz stresi altındaki buğday genotiplerinde önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir (Sairam *et al.* 2000; Eyidoğan *et al.* 2003; Sakhabutdinova *et al.* 2004). Tuz stresi altındaki çeltik bitkilerinde de SOD aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Lin and Kao 2000). Buna ilave olarak, sinameki (*Cassia angustifolia*) ve soya fasulyesi bitkisi ile yapılan çalışmalarda SOD aktivitesi tuz stresi ile artmıştır (Agarwal and Pandey 2004; Ghorbanli *et al.* 2004). Diğer benzer iki çalışmada, tuz stresine dayanıklı ve hassas olan iki çeşit pamuk (Meloni *et al.* 2003) ve şeker pancarı (Bor *et al.* 2003) bitkileriyle yapılan çalışmalarda, hücrel SOD aktivitesinin tuza dayanıklı varyetelerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Su taşkını stresine maruz kalan arpa bitkilerinde ise kloroplastik SOD aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir (Yordanova *et al.* 2004).

Soğuk etkisiyle SOD enziminin aktivitesi üzerine yapılmış çalışmalar da mevcuttur. Kışlık çavdarla yapılan bir çalışmada 5 haftalık soğuğa uyum süresi sonunda yapraklardaki SOD aktivitesinin kontrollere göre %408.4 oranında arttığı bulunmuştur (Streb *et al.*, 1999). Mutant pamuk bitkisiyle yapılan bir çalışmada SOD aktivitesinin, düşük sıcaklık uygulaması sonucu kontrole göre yaklaşık 3 kat arttığı belirlenmiştir (Kornyeyev *et al.* 2001). Kışlık buğday yapraklarında 4 haftalık soğuğa uyum boyunca MnSOD genlerinin ifadesinin artış gösterdiği belirlenmiştir (Beak and Skinner 2003). Alp çiminde aylık olarak SOD aktivitesindeki değişimler takip edilmiş ve havaların soğuduğu sonbahar mevsiminde aktivitenin arttığı tespit edilmiştir (Zhou and Zhao 2004). Norveç ladin ağacı -10° C gibi çok düşük sıcaklıklara 45 gün gibi uzunca bir süre maruz bakıldığında ROT miktarındaki artışa paralel olarak SOD aktivitesinde de önemli derecede bir artış görülmüştür (Kaminska-Rozek and Pukacki 2005). Soğuğa duyarlı olduğu bilinen salatalık ve pirinç bitkilerinde de uygulanan düşük sıcaklığın yapraklardaki toplam SOD aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Lee and Lee 2000; Guo *et al.*, 2006). Sibiryada doğal ortamında takip edilen çamlarda (*Pinus sylvestris*) rizosfer sıcaklığının düşmesine paralel olarak diğer antioksidan enzimlerle birlikte SOD enzim

kapasitesinin düştüğü ve buna mukabil dokuda oksitatif stres belirtilerinin görülmeye başladığı belirtilmiştir (Milyutina *et al.* 2008).

SA'nın SOD üzerine etkisini inceleyen çalışmalarda, SOD aktivitesinin SA uygulamasından önemli ölçüde etkilendiğini ortaya koymuştur. Örneğin, tuz stresi altındaki buğdaylarda hücrel SOD aktivitesinin eksogen (dışarıdan) SA uygulaması ile arttığı belirlenmiştir (Sakhabutdinova *et al.* 2004). Buna karşılık, su stresi altındaki buğdaylarda SOD aktivitesi yükselirken, SA uygulaması ile düştüğü belirlenmiştir (Singh and Usha 2003). Muz fideleriyle yapılan diğer bir çalışmada ise SOD aktivitesi düşük sıcaklık ve SA uygulamasıyla artmıştır (Kang *et al.* 2003). Tuz stresi altındaki domateslerde, tuzlu koşullar içsel (endogen) SA miktarını artırmıştır. Ancak, belirli bir süre tuza aklime edilmiş domateslerde içsel SA miktarı daha düşük bulunmuştur. Aynı bitkilerde, hem tuz hem SA uygulaması SOD aktivitesini artırmış fakat, yine tuza adapte edilmiş bitkilerde SOD aktivitesi daha düşük bulunmuştur (Molina *et al.* 2002).

Literatürde apoplastik SOD aktivitesi üzerine soğuk ve SA'nın birlikte etkilerini açıklayan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, tuz stresine toleransları farklı iki çeşit bezelye (Hernandez *et al.* 2001) ve iki çeşit dutta (Sudhakar *et al.* 2001) apoplastik SOD aktivitesinin, tuza dayanıklı varyetelerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Son olarak, tuz toleransları farklı iki buğday varyetesiyle yapılan bir çalışmada SA, dayanıklı varyetede SOD aktivitesini düşürürken, hassasta belirgin bir düzen sergilememiştir (Mutlu *et al.* 2009).

Bitkilerde soğuğa aklimasyon sırasında üretilen antifriz proteinlerle (AFP) ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Kışlık ve yazlık çavdar, kışlık ve yazlık buğday, kışlık ve yazlık kanola, arpa, bezelye, lahana, mısır, ıspanak, havuç, *Ammopiptanthus mongolicus*, *Solanum dulcamara*, *Lolium perenne* ve tütün gibi bitkilerin soğuğa dirençli olanlarında antifriz özelliğinde birçok polipeptidin varlığı gösterilmiştir (Griffith *et al.* 1992, 1997; Marentez *et al.* 1993; Hon *et al.* 1994; Antikainen and Griffith 1997; Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b; Mayer *et al.* 1999; Fletcher *et al.* 1999; Huang-Duman 2002; Pudney *et al.* 2003; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşgın *et al.* 2006).

Antifriz aktivitesi kanıtlanan bitki proteinleri, *S. dulcamara*, 67 kDa (Duman *et al.* 1994), kışlık çavdar 11-37 kDa (Hon *et al.* 1994, 1995), çiçek 66 kDa (Huang and Duman 1995), şeftali 60 kDa (Wisnieweski *et al.* 1999), havuç 36 kDa (Worrall *et al.* 1998, Smallwood *et al.* 1999), kışlık buğday 12-39 kDa (Chun *et al.* 1998; Atıcı and Nalbantoğlu 1999b), *Arachis hypogaea* 33 kDa (Dave and Mitra 1998), *Picea abies* 70 kDa (Sabala *et al.* 1996), *Rhodiola algida* 29-85 kDa (Lu *et al.* 1998; 2000) ve *L. perenne* 29 kDa (Pudney *et al.* 2000) gibi bitkilerden izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Kışlık çavdardaki AFP'ler Griffith ve çalışma arkadaşları tarafından ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır (Griffith *et al.* 1992, 1997; Griffith and McIntyre 1993; Hon *et al.* 1994, 1995; Antikainen 1996; Griffith and Antikainen 1996; Antikainen and Griffith 1997; Yu and Griffith 1999, 2001). Soğuğa akliye edilmiş kışlık çavdar yapraklarından elde edilen apoplastik ekstraktların SDS-PAGE'si sonunda 7 tane farklı molekül ağırlığına sahip polipeptid gözlenmiştir. Bunlar 16-37 kDa arasında değişen ve antifriz aktivite gösteren apoplastik polipeptidlerdir (Hon *et al.* 1994). Kışlık çavdar ile ilgili başka bir çalışmada da apoplastik AFP'leri karakterize edilmiştir (Yu and Griffith 1999). Bunlar doğal elektroforezle 9 banda ayrılmıştır. AFP komplekslerinin, tek bir polipeptitten daha etkili bir şekilde buz büyümesini inhibe ettikleri gözlenmiştir (Yu and Griffith 1999). Kışlık buğday yaprağına ait apoplastik proteinler SDS-PAGE'de yürütüldüğünde, soğuk şartlarında polipeptidlerin band şiddetinin arttığı gözlenmiştir (Atıcı and Nalbantoğlu 1999b; Taşgın *et al.* 2006).

Son yıllarda kışlık çavdar yapraklarında antifriz aktivitenin düzenlenmesi yaprakların etilen, SA, ABA ve kuraklığa maruz bırakılmasıyla incelenmiştir (Yu and Griffith 2001, Yu *et al.* 2001). SA ve ABA ile muamele edildiğinde çavdar yapraklarında antifriz aktivite göstermeyen apoplastik proteinler birikmiştir (Yu and Griffith 2001, Yu *et al.* 2001). Kışlık buğdayda yapılan bir çalışmada yaprakların apoplastik bölgelerinde düşük sıcaklıkta SA muamelesinin mevcut protein miktarlarında ve bant sayısında artışa neden olduğu ve ekstra polipeptidlerin oluşmasını sağladığı gösterilmiştir (Taşgın *et al.* 2006).

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

İklim dolabı	: Sanyo, Japonya ve Jeno Tech, Kore
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini-1240
pH metre	: WTW unilab pH metre
Hassas terazi	: Shimadzu AY220
Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-30 °C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80 °C)	: Harris, İngiltere
Karıştırıcı	: Fisons Whirlmixer
Otomatik pipetler	: Nichipet EX ve Socorex
Çalkalayıcı	: Gallenkamp
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1.
Vakum pompası	: Edwards, İngiltere
Elektroforez	: Owl Separation Systems P10DS

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış biçimleri aşağıda sunulmuştur. Çalışmalarımızda kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Fuluka şirketlerinden temin edilmiştir.

1. Arnon ve Hogland besi çözeltisi: 1.02 g KNO_3 , 0.492 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.23 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.49 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.86 g H_3BO_3 , 1.81 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.08 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.22 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.6 mg FeSO_4 , 0.6 mg tartarik asit saf su içerisinde çözülerek hacmi 1 litreye tamamlanmıştır.
2. 0.01 mM Salisilik asit çözeltisi: 0.001381 g salisilik asit 900 mL saf suda çözölmüş, 1 N NaOH ile pH: 5.5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
3. 0.1 mM Salisilik asit çözeltisi: 0.01381 g salisilik asit 900 mL saf suda çözölmüş, 1 N NaOH ile pH: 5.5'e kadar titre edilir ve son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
4. 0.5 mM Salisilik asit çözeltisi: 0.06905 g salisilik asit 900 mL saf suda çözölmüş, 1 N NaOH ile pH: 5.5'e kadar titre edilir ve son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
5. 1 mM Salisilik asit çözeltisi: 0.1381 g salisilik asit 900 mL saf suda çözölmüş, 1 N NaOH ile pH: 5.5'e kadar titre edilir ve son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
6. 20 mM Askorbik asit + 20 mM CaCl_2 çözeltisi (Total apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu için kullanılan çözelti): 7.4 g askorbik asit ve 5.28 g CaCl_2 bir miktar saf suda çözölmüş ve hacim saf su ile 2 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
7. 0.1 M KH_2PO_4 (pH: 7.0), %1 PVP, 1mM EDTA (Simplastik antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu): 2.72 g KH_2PO_4 180 ml saf suda çözölmüş, 1 N NaOH ile pH 7.0'ye kadar titre edildikten sonra saf su ile 200 ml'ye tamamlanmış ve 0.5 g PVP ve 0.04 g EDTA ilave edilerek hazırlanmıştır.
8. 103.5 mM KH_2PO_4 , pH: 7.5 (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 1.4 g KH_2PO_4 , 80 mL saf suda çözölmüş, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

9. 40 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 408 μ L %30'luk H_2O_2 hacmi saf su ile 100mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
10. 5 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan): 41 μ L %30'luk H_2O_2 hacmi saf su ile 100mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
11. 0.1 M Na_2HPO_4 , pH: 5.5 (Peroksidazın aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3.55 g Na_2HPO_4 alınarak 200 mL saf suda çözölmüş ve pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.
12. Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi: 54 μ L quaiKol ve 15 μ L H_2O_2 'dan ($d=1.13$ g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 mL 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözölerek hazırlanmıştır.
13. 50 mM K_2HPO_4 (pH: 7.8) (Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 2.9 g K_2HPO_4 200 mL saf suda çözölmüş ve son hacmi 250 mL'ye tamamlanmıştır.
14. 13 mM metionin çözeltisi: 0.485 g metionin, 250 mL, 50 mM K_2HPO_4 (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözölerek hazırlanmıştır.
15. 75 μ M NBT (Nitroblue Tetrazolium Klorür): 0.015 g NBT, 250 mL, 50 mM K_2HPO_4 (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözölerek hazırlanmıştır.
16. 0.1 mM EDTA (Etilen Daimin Tetra Asetik asit): 0.075 g EDTA, 250 mL, 50 mM K_2HPO_4 (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözölerek hazırlanmıştır.
17. 2 μ M riboflavin: 0.038 g riboflavin, 1 L saf suda çözölmüş, bu çözeltiden 2 μ M oluşturmak için, bundan 60 μ L alınmış ve 3 mL'lik reaksiyon karışımına pipetlenmiştir.
18. 1 M Tris-HCl (pH:6.8) (Elektroforezde jel hazırlamak için kullanılan tampon): 12.1 g Tris bir miktar saf suda çözöldükten sonra pH'sı 6.8'e ayarlanmış ve toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
19. 1 M Tris-HCl (pH: 8.8) (Elektroforezde jel hazırlamak için kullanılan tampon): 12.1 g Tris bir miktar saf suda çözöldükten sonra pH'sı 8.8'e ayarlanmış ve toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

20. %10'luk SDS (Elektroforezde jel hazırlamak için kullanılan çözelti): 1 g SDS üzerine 9 ml saf su ilave edilerek çok hafif ısıtmak suretiyle, şeffaflaşınca kadar karıştırılmıştır.
21. %30'luk akrilamid çözeltisi (Elektroforez ayırma jelinin hazırlanmasında kullanılan): 30 g akrilamid ve 0.8 g bis-akrilamid saf su ile iyice çözüldükten toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmış, kullanım dışında renkli şişede 4°C'de saklanmıştır.
22. %10'luk akrilamid çözeltisi (Elektroforez yığma jelinin hazırlanmasında kullanılan): 10 g akrilamid ve 2.5 g bis-akrilamid saf su ile iyice çözüldükten sonra üzerine 87.5 ml saf su ilave edilmiş, kullanım dışında renkli şişede 4°C'de saklanmıştır.
23. SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu: 1.5 g Tris ile 7.2 g glisin yaklaşık 50 mL saf suda iyice çözülmüş ve üzerine 5 mL % 10'luk SDS ilave edilerek hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.
24. %0.1'lik brom timol mavisi: 0.1 g indikatör boya, 16 ml 0.1 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra su ile hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.
25. SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu: 0.65 mL 1 M Tris-HCl pH: 6.8, 3 mL %10'luk SDS, 1mL %100'lük gliserin ve 1 mL %0.1'lik brom timol mavisinden karıştırılarak toplam hacimleri 10 mL'ye tamamlanarak hazırlanmış ve bu tampona kullanmadan hemen önce 50 µL β-merkaptoetanol ilave edilmiştir.
26. Fixing çözeltisi (Jeldeki proteinleri, boyama öncesi sabitleştirmek için kullanılan): 40 ml saf su üzerine 10 g TCA ilave edilerek iyice çözüldükten sonra, 50 ml izopropil alkolün yavaş yavaş ilavesiyle 100 ml'ye tamamlanmıştır.
27. Boyama çözeltisi (Elektroforez sonrası jeldeki proteinlerin boyanmasında kullanılan): 10 g TCA 58 mL saf suda iyice çözüldükten sonra üzerine 15 g amonyum sülfat ilave edilerek bununda çözünmesi sağlanmış ve daha sonra bu karışımın üzerine 15 ml izopropil alkol konulduktan sonra şeffaflaşınca kadar magnetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra ayrı bir beherde 6 ml fosforik asit üzerine 0.6 g Coomassie G-250 azar azar eklenerek iyice çözülmüş üzerine daha önce hazırlanan çözelti yavaş yavaş ilave edilerek karıştırılmış ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

28. Yıkama çözeltisi (Boyama sonrası jeldeki fazla boyayı uzaklaştırmak için kullanılan): 100 ml asetik asit üzerine 500 mL metanol 400 saf su ilave edilerek toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.
29. %5 lik TCA(trikloroasetik asit)(Lipid peroksidasyon aktivitesi homojenat çözeltisi) : 100 mL saf su içerisine 5 g TCA ilave edilir. TCA tam olarak çözünene kadar karıştırılarak hazırlanır.
30. %0.5 lik TBA(tiobarbutirik asit) (Lipid peroksidasyon aktivitesi reaksiyon çözeltisi): 100 mLsaf su içine 20 gram TCA çözülür ve içerisine % 0.5 g TBA ilave edilir ve iyice karıştırılarak hazırlanır.
31. %5'lik $Ti(SO_4)_2$ (titanyum disülfat çözeltisi) (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 1 gram $Ti(SO_4)_2$ 20 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.
32. %19'luk NH_4OH (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 4.16 mL NH_3 20 mL saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır.
33. 2 M'lık H_2SO_4 (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 40 mL %98'lik H_2SO_4 alınmış 160 mL saf su içerisine ilave edildikten sonra 200 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi

Araştırmamızda bölgemizde ekimi yapılan ve soğuğa direnç dereceleri farklı olan 2 çeşit arpadan soğuğa **hassas** (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) ve **dayanıklı** (*H. vulgare* cv. Tokak) kullanılmıştır. Tohumlar Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Bu bitkilerde SA'nın soğuğa karşı koruyucu rolünün apoplastik ve simplastik bölgede araştırıldığı deneyler laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmiştir. Bitkilere ait tohumlar, ekimden önce etanol (%96) ile kısa süreli hızlıca yıkanmış ve %5'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dk yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra 5 kez saf su ile yıkanarak, oda şartlarında saf su içerisinde 2 saat şişmeye

bırakılmıştır. Her saksıya saf su ile şişirilmiş tohumlar eşit miktarda ekilmiştir. Bitkiler iklim dolabında kontrol şartlarında (20/18 °C sıcaklık ve 12/12 saat ışık-karanlık periyodunda 20.000 lüks, %70 nem) 31 gün süreyle büyütülmüştür. Her saksı, kesileceği güne kadar, günlük eşit miktarda saf su ve haftada bir kez de Hoagland besi çözeltisiyle sulanmıştır. Yedinci gün bitkilerin bir kısmına 0, 0.01, 0.1, 0.5 ve 1 mM SA uygulanmıştır. Farklı konsantrasyonların çalışılması ile SA'nın soğuğa karşı korumada en etkili dozu (konsantrasyon) belirlenmiştir. Bu uygulamadan sonra, kontroldeki SA'lı ve SA'sız bitkiler kesim tarihlerinden (10., 17., 24. ve 31. günler) 3 gün önce soğuk şartlara (7/4) °C sıcaklık ve 12/12 saat ışık-karanlık periyodunda 20.000 lüks, %70 nem) transfer edilmiştir. Bu sıcaklıklar her iki arpa çeşidinin yaşayabildiği en düşük sıcaklık olup ön denemelerle belirlenmiştir. **Kontrol, düşük sıcaklık, SA'lı ve SA'sız** bitki yaprakları 10., 17., 24., ve 31. günlerde kesilerek bitki;

- a) yapraklarında **donma hasarı**,
- b) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin **buz nükleasyon aktiviteleri**,
- c) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerden **antioksidan enzim aktiviteleri**,
- d) yapraklarından elde edilen simplastik proteinlerden **antioksidan enzim aktiviteleri**,
- e) yapraklarında **lipid peroksidasyon aktivitesi (LPO)**,
- f) yapraklarında **hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarı**,
- g) **Sodyum dodesilsülfat jel elektroforezi ile (SDS- PAGE)** yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin çeşitliliği belirlenmiştir.

Yukarıdaki deneylerde ilk önce donma hasarı deneyi ile en etkili SA konsantrasyonları belirlenmiş ve diğer uygulamalarda bu SA konsantrasyonlarıyla çalışmamız yürütülmüştür. Tüm bu deneylerin sonuçları beraberce değerlendirildiğinde, hem SA'nın hem de apoplastik ve simplastik proteinlerin, soğuğa dirençsiz bitkilerin soğuk stresine cevap mekanizmalarında üstlendikleri roller ortaya konulmuştur. Bunlara ilave olarak, SA'nın en etkili olduğu konsantrasyonu ve bu etkinin süresi de belirlenmiştir. Sonuçlarımız, hem bu konudaki temel bilimlerde önemli bir boşluğu doldurmuş hem de tarla denemeleri için önemli bir veri kaynağı olmuştur.

3.3.2. % Donma hasarının belirlenmesi

Kontrol, soğuk ve SA (0, 0.01, 0.1, 0.5 ve 1 mM) muameleli bitki yapraklarında elektrolit sızıntısı ölçülerek, SA'nın yapraklarda donma hasarını engellemedeki rolü tespit edilmiştir. Bu deney aşağıdaki şekilde yapılmıştır: 20 deney tüpünün her birine 0.1 g taze yaprak örneği konulmuş ve bu tüpler, -20°C 'ye kadar ayarlanabilen bir su banyosuna (donmayı önlemek için su ile karışık alkol içerir) topluca yerleştirilmişlerdir. Daha sonra bütün tüpler, -1 den -20°C 'ye kadar, her bir derecede 10 dk tutulmuş ve her bir dereceden sonra banyodan bir tüp alınmıştır. Banyodan alınan her bir tüpün içine 4 ml saf su konulmuş ve bu tüpler 4°C 'de 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra tüplerin içerisindeki saf suya geçen iyon miktarı, bir elektrik kondüktivimetre ile ölçülmüş ve değerler **% Donma Hasarına** çevrilmiştir (Griffith *et al.* 1992; Taşğın *et al.* 2003).

3. 3. 3. Buz nükleasyon aktivitesinin belirlenmesi

Kontrol, soğuk ve SA (0, 0.1 ve 1 mM) muameleli arpa yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesine (donma noktasını geciktirme derecesi) etkisi ölçülerek, apoplastik proteinlerin ve SA'nın donma toleransındaki rolü belirlenmiştir. Bu deney şu şekilde yapılmıştır: Apoplastik proteinler Eppendroff tüplerde 1 ml saf su içinde çözüldükten sonra, topluca sıcaklığı -20°C 'ye kadar ayarlanabilen bir su banyosuna (donmayı önlemek için, su ile karışık alkol içerir) konulmuştur. Sıcaklık -1°C 'den başlayarak 15'er dakika aralıklarla 1'er derece düşürülmüştür. Her bir tüpün içindeki protein çözeltisinin donma noktası belirlenmiştir. Saf suyun donma derecesi kontrol olarak kabul edilmiştir. Saf suyun donma noktası ile protein çözeltisinin donma noktaları arasındaki fark, buz nükleasyon aktivitesi olarak kabul edilmiştir (Griffith *et al.* 1992; Taşğın *et al.* 2003).

3. 3. 4. Apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu

Apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu için arpa yapraklarından bir bisturiyle yaklaşık 1 cm uzunlukta dikkatlice kesilerek oluşturulan yaprak kesitleri (7 g), kesilen bölgelerinden gelebilecek hücresel protein kontaminasyonunu önlenmek için en az 6 kez bol su ile iyice yıkanmıştır (Hon *et al.* 1994; Atıcı and Nalbatoğlu 1999a,b). Hazırlanan 7 g yaprak kesiti, içerisinde 20 mM askorbik asit ve 20 mM CaCl₂ çözeltisi bulunan vakumlanabilir bir desikatöre yerleştirilmiş ve desikatör bir vakum pompası ile 20 dakika vakumlanmıştır. Vakumlanan yapraklar 20 mL'lik enjektörlere dikkatlice yerleştirildikten sonra, enjektörler birer santrifüj tüpüne konulmuş ve 2000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjlemenin bitiminde, tüplerin dip kısmında biriken apoplastik ekstrakt, apoplastik proteinlerin elde edilmesi için kullanılmıştır (Atıcı and Nalbatoğlu 1999a,b; Mutlu 2005). Enjektörde kalan ve apoplastik sıvısı uzaklaştırılan yapraklar ise, simplastik antioksidan enzim aktivitelerini belirlemek için -28 °C'de saklanmıştır.

Apoplastik proteinlerin izolasyonu için, apoplastik ekstraktlara hacimlerinin 1.5 katı soğuk (-28 °C) aseton ilave edilmiş ve karışım -28 °C'de 1 gece bekletilmiştir. İkinci gün, örnekler 3500 x g'de 20 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra apoplastik protein peleti elde edilmiştir. Pelet, önce %96'lık sonra %70'lik etanol ile birer kez dikkatlice yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Tamamen kurumuş pelet, apoplastik enzim aktivitelerinin belirleneceği zamana kadar, -28°C'de saklanmıştır (Griffith *et al.* 1992; Hon *et al.* 1994; Atıcı and Nalbatoğlu 1999a,b; Taşgın *et al.* 2003).

Enzim aktivitesi ölçümü yapılacağı zaman, apoplastik protein peletleri, 1 mL 0.2 M (pH: 7.5) sodyum fosfat tamponu içinde iyice çözölmüş ve apoplastik antioksidan enzim aktiviteleri ölçümü için hazır hale getirilmiştir.

3.3.5. Simplastik proteinlerin ekstraksiyonu

Simplastik proteinlerin ekstraksiyonu için, apoplastik sıvısı uzaklaştırılmış yapraklardan 1 g alınıp soğuk bir havan içine konulmuş ve üzerine sıvı azot ilave edilerek toz haline gelinceye kadar öğütülmüştür. Sonra üzerine 5 mL soğuk homojenat tamponu (%1 PVP ve 1 mM EDTA ihtiva eden 0.1 M KH_2PO_4 pH: 7.0) ilave edilmiş ve karışım bir santrifüj tüpüne aktararak 15000 $\times g$ ve +4 °C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen süpernatant simplastik antioksidan enzimlerin aktivite ölçümleri için kaynak olarak kullanılmıştır (Angelini *et al.* 1990; Angelini and Federico 1989; Mutlu 2005) .

3.3.6. Apoplastik ve simplastik antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Yukarıda belirtildiği gibi elde edilen apoplastik proteinler fosfat tamponunda (pH: 6.5) çözülerek spektrofotometrik yöntemlerle enzimlerin aktiviteleri belirlenmiştir. Her bir antioksidan enzim için kullanılan kimyasallar ve yöntemler farklıdır.

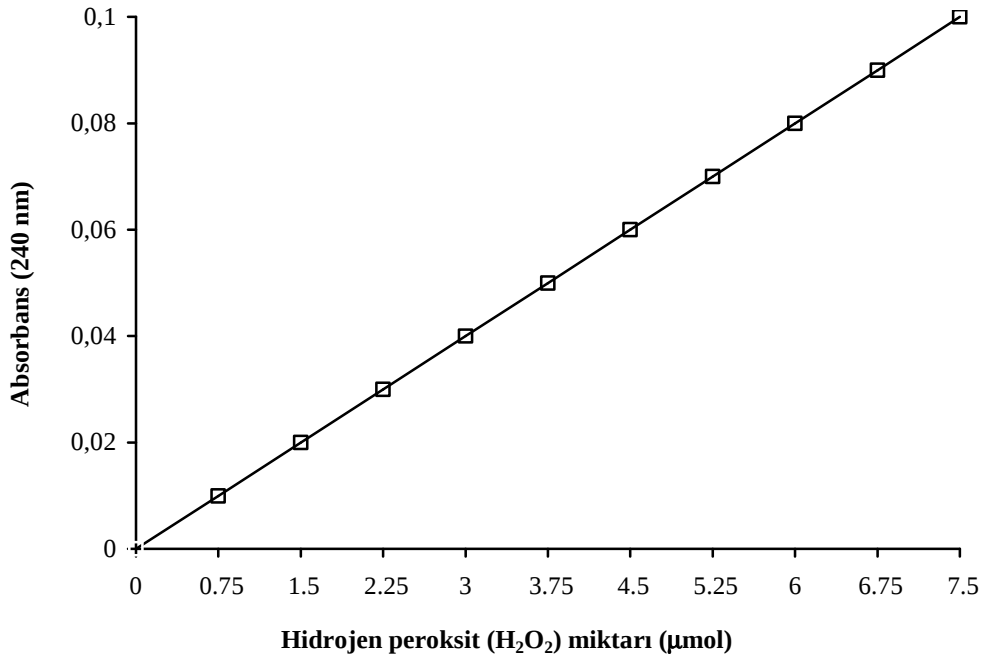
3.3.6.a. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için kullanılan yöntem, Havir ve Mchale'nin (1987) Luck'e (1965) dayandırarak uyguladığı yöntemdir. Bu metotla aktivite ölçümü, CAT aktivite ölçüm ortamındaki H_2O_2 'nin O_2 ve H_2O 'ya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbands azalmasının 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır (Havir *et al.* 1987).

Reaksiyonda azalan H_2O_2 miktarını belirlemede kullanılan olan H_2O_2 standart grafiği önceden hazırlanmıştır. Bunun için, 5 mM H_2O_2 çözeltisinden 3 mL'lik spektrofotometre tüpüne sırasıyla; 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 mL konulmuştur. Tüpün hacmi saf su ile 1.5 mL'ye tamamlanmış ve her tüpe 1.47 mL, 103.5 mM KH_2PO_4 ve 30 μL su ilave edilmiştir. Küvet spektrofotometreye

yerleştirildikten sonra 240 nm’de absorbans köre karşı okunmuştur. Absorbans değerlerine karşılık gelen μM H_2O_2 değerleri kullanarak standart grafik elde edilmiştir.

Aktivite ölçümü için 3 mL’lik spektrofotometre küvetine, 103 mM KH_2PO_4 tamponundan 1.475 mL ve 40 mM’lık H_2O_2 substrat çözeltisinden 1.5 mL konulduktan sonra, 25 μL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 240 nm’de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okunmuştur. Ölçümlerde absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanmıştır. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla μmol cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürülmüştür. 25 °C’de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 μmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulmuştur (Gong *et al.* 2001; Mutlu 2005).



Şekil 3.1. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik. Yaprak örneklerinden elde edilen simplastik ve apoplastik çözeltideki katalaz aktivitelerinin belirlenebilmesi için 5 mM H_2O_2 çözeltisi kullanılmıştır.

3.3.6.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POD) aktivite tayini, guaikol ve H_2O_2 'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır (Angelini *et al.* 1989).

Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 100 mL 0.1 M, NaH_2PO_4 (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol içeren substrat çözeltisinden 3 mL konulduktan sonra, üzerine 10 µL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. 470 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedilmiş ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanmıştır. 25 °C'de 1 dakikada, absorbansı 0.01 artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulmuştur (Ye *et al.* 2002; Mutlu 2005).

3.3.6.c. Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanır (Agarwal and Pandey 2004; Yordanova *et al.* 2004).

Reaksiyon karışımı (3 mL); 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 75 µM NBT, 2 µM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 3 mL spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2.84 ml alınmış ve üzerine 100 µL enzim ekstraktı pipetlenmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 100 µM'lık riboflavin çözeltisinden 60 µL pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatılmıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk. tutulmuş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. 15 dk. içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okunmuştur. Kör; aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin % 50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1

enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve değerler EU/g yaprak olarak sunulmuştur (Mutlu 2005).

3.3.7. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Bu araştırmada yapraklardan elde edilen apoplastik proteinlerdeki değişim, Leemmlı (1970) tarafından anlatıldığı şekilde elektroforezle kontrol edilmiştir.

Apoplastik proteinler 100 µL numune tamponu içinde çözüldükten sonra elektroforeze hazırlanmıştır. Elektroforez için %4–14 kesikli sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeli hazırlanmıştır.

Ayrırma jelini hazırlamak için, bir behere %30'luk akrilamid-%0.8'lik bisakrilamid çözeltisinden 25 mL alınmış ve üzerine sırasıyla 1 M'lık Tris-HCl (pH:8.8)'den 22.5 mL, %10'luk SDS'den 0.9 mL, 0.6 mL %5'lik TEMED ve 9 mL saf su konularak karıştırılmıştır. Bu karışımın üzerine en son olarak 15 mg (1.2 mL) amonyum persülfat hızlıca pipetlenmiştir.

Yığılma jelini hazırlamak için, bir behere %30'luk akrilamid-%0.8'lik bisakrilamid çözeltisinden 2 mL alınmış ve üzerine sırasıyla 0.5 M'lık Tris-HCl (pH:6.8)'den 2.48 mL, %10'luk SDS'den 0.2 mL, %5'lik 5 µL TEMED ve 15.6 mL saf su konularak karıştırılmıştır. Bu karışımın üzerine günlük hazırlanmış %1.5'luk amonyum persülfattan 0.4 mL ilave edilmiştir.

Elektroforez işlemi şu şekilde yapılmıştır. Elektroforez cam tabakaları önce saf su ve sonra alkol ile yıkanmıştır. Plakaları birleştiren aralık koruyucu mikalara, sızmayı önlemek için vazelin sürülüp iki cam plaka arasına lastik şeritler konularak camlar birleştirilmiştir. Daha sonra plastik elektroforez torbalarına konulan cam plakalar kısıkaçlar ile tutturularak jel hazırlama cihazına monte edilmiştir. Ayrırma jeli hazırlandıktan hemen sonra ince bir pipet yardımıyla pipetlenmiş ve bunun üzerine jelin üstünün pürüzsüz olması için hemen izopropil alkolden bir miktar dökülmüştür.

Ayrırma jeli katılaşıncaya kadar yaklaşık iki saat beklenmiştir. Katılaşma sonrası jelin üzerindeki izopropil dökülerek tekrar jelin üzeri saf su ile doldurulup, serin bir yerde 1 gece bekletilmiştir. İkinci gün yığma jeli hazırlanmış ve ayırma jelinin üzerine dökülüp tarak yerleştirilerek yaklaşık 2-3 saat sonra tarak jelden dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Hazırlanan plakaların kuyuları önce saf su ile sonra yürütme tamponu ile yıkanıp, elektroforez tankına yerleştirilmiştir (Taşğın 2004).

Protein numuneleri, toplam hacim 100 μ L olacak şekilde tüplerde hazırlanıp 3 dakika kaynar suda inkübe edilmiş ve oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Nümuneler bir mikroenjektörle jelin kuyularına tatbik edilmiştir. Molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerde 100 μ L tamponda çözülerek numunelerle birlikte jele yüklenmiştir. Tank kapağı kapatılarak elektroforez tankının alt ve üst kısmına yeterince yürütme tamponu konulmuş ve elektrik bağlantıları yapılmıştır. Daha sonra numuneler ayırma jelinin hizasına kadar 120 voltta yürütülmüştür. Ayrırma jelinden sonra 200 voltta yaklaşık 4-5 saat yürütmeye devam edilmiştir. Yürütme işlemi bittiğinde akım kesilerek jel, camlar arasından dikkatlice çıkarılmış ve sabitleme çözeltisinde hafif tempoda 45 dakika çalkalanmıştır. Yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere özel kabına konulmuştur. Daha sonra, jel boyama çözeltisine alınmış ve iki saat tekrar çalkalanmış, daha sonra boyama çözeltisinden alınarak protein bantları iyice görülünceye kadar yıkama çözeltisinde yıkanmıştır. Belirli zaman periyotlarında değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalanmıştır. Yıkama çözeltisi aktif karbondan geçirilerek tekrar kullanılmıştır. Jel, yıkama çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekilmiştir (Taşğın 2004).

3.3.8. Lipid peroksidasyon aktivitesinin belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu için 0.5 g yaprak alınarak 5 mL %5 lik TCA içinde homojenize edildikten sonra elde edilen homojenat 10.000 x g 'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmından 4 mL alınarak üzerine 1 mL %0.5 lik TBA çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika inkübe edilmiş ve reaksiyon tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durdurulmuştur. Örnekler tekrar 10000 x g 'de 10

10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı alınarak absorbansı 532 nm de okunmuş ve daha sonra 600 nm deki non-spesifik absorpsiyon için absorbans değeri belirlenmiştir.

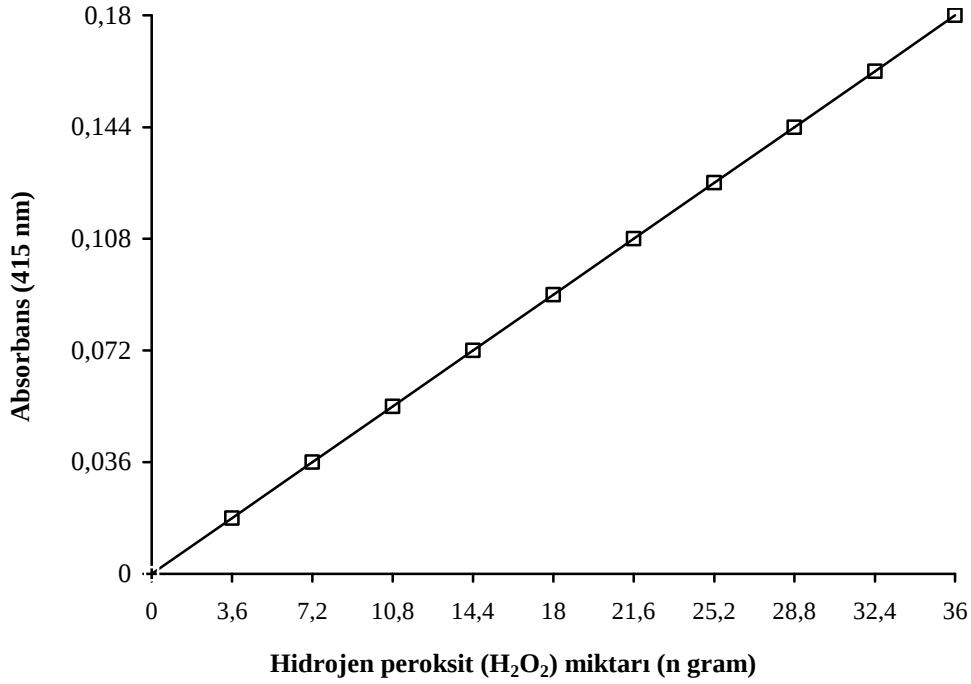
Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm’de ölçülen absorbans değerinden 600 nm’de belirlenen değeri çıkarılmış ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/ml): $[(A_{532} - A_{600})/155000] \times 10^6$ formülüyle hesaplanmıştır. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde verilmiştir (Ananieva *et al.* 2002).

3.3.9. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi

Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi için; 0.5 gram arpa yaprağı alınarak 10 mL soğuk aseton içinde homojenize edildikten sonra homojenat 10.000 x g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen süpernatantın 1.5 mL’si 0.15 mL % 5’lik Ti(SO₄)₂ (titanyum disülfat) ve 0.3 mL %19’luk NH₄OH (amonyum hidroksit) ile karıştırılmıştır. Çökelek oluşuktan sonra karışım 10.000 x g’de 10 dakika daha santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet 3 mL 2 M’lık H₂SO₄ (sülfürik asit) içinde çözölmüş ve 415 nm’de absorbansı ölçölerek kaydedilmiştir. Bu ortalama absorbans değeri, daha önceden hazırlanmış standart grafik yardımıyla nanogram cinsinden H₂O₂ miktarına dönüştürölmüştür. Sonuçlar g yaprak başına düşen H₂O₂ miktarı (ng /g yaprak) olarak sunulmuştur.

H₂O₂ miktarını belirlemede kullanılan H₂O₂ standardı için, %35’lik H₂O₂ çözeltisinden hazırlanan 3mM’lık stok çözeltiden eppendorf tüplerine sırasıyla; 3.6, 7.2, 10.8, 14.4, 18, 21.6, 25.2, 28.8, 32.4 ve 36 nanogram olacak şekilde konulmuştur. Tüpün hacmi aseton ile 1.5 mL’ye tamamlanmış ve her tüpe 0.15 mL %5’lik Ti(SO₄)₂ ve 0.3mL %19’luk NH₄OH ilave edilmiştir. Çökelek oluşuktan sonra karışım 10.000 x g’de 5 dakika daha santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet 3 mL 2 M’lık H₂SO₄ içinde çözölmüş ve küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 415 nm’de absorbans köre karşı okunmuştur. Absorbans

değerlerine karşılık gelen nanogram H_2O_2 değerleri kullanarak standart grafik elde edilmiştir.



Şekil 3. 2. Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik.

3.4. İstatistik Analiz

Tez içerisinde sunulan sonuçlar, her bir uygulamadan üç örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 3 tekrerrür yapıldıktan sonra elde edilen 9 değerlerin ortalamasıdır. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 15.0 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış ve istatistik anlamlar, 0.05 hata seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamamızda ekim gününe göre bitki yapraklarına 7. gün 0.0, 0.01, 0.1, 0.5 ve 1 mM SA uygulanmış ve bitkiler kesim günlerinden (10., 17., 24., ve 31) 3 gün önce soğuğa (4/7 °C) transfer edilmişlerdir. Bitki yapraklarından önce **donma hasarı** deneyleri yapılmıştır. Bu deneyden elde edilen sonuçlar, SA konsantrasyonlarından 0.1 ve 1 mM uygulamaların donma hasarını düşürmede daha etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu yüzden donma hasarı dışındaki diğer deneylerde (buz nükleasyon aktivitesi, apoplastik ve simplastik antioksidan enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyonu, H₂O₂ miktarı ve apoplastik proteinlerin SDS elektroforezi) SA'nın bu iki (0.1 ve 1 mM) konsantrasyonunun kullanılması tercih edilmiştir. Bu bölümde, çalışılan iki arpa (*Hordeum vulgare*) varyetesine ait sonuçlar önce soğuğa dayanıklı (Tokak) ve sonra hassas (Akhisar) varyetede sunulmuştur.

Bulgular, çizelgelerde ayrıntılı olarak verilmiş, ayrıca çizelgelerden daha farklı yaklaşımların ve değerlendirmelerin yapılabilmesi için şekillerle de sunulmuştur. Sonuçlar değerlendirilirken, ilk olarak kontrol (20/18 °C) grubu ile soğuk uygulaması (4/7 °C) karşılaştırılmış ve sonra soğuk şartlardan önce uygulanan SA'nın etkileri üzerinde durulmuştur.

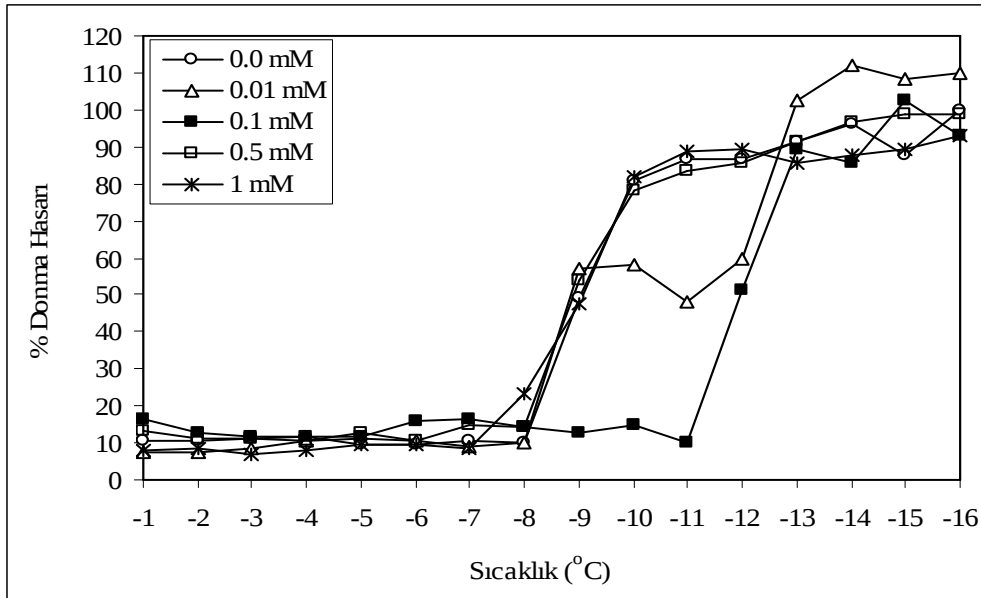
4. 1. % Donma Hasarı Sonuçları

4. 1. 1. Soğuğa dayanıklı arpa varyetesi Tokak'tan elde edilen sonuçlar

Soğuğa dayanıklı arpa varyetesi Tokak'tan elde edilen % **donma hasarı** değerlerinde, SA uygulamalarının donma hasarını azaltma ve geciktirmede etkili olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1-4.4 ve Şekil 4.1–4.4). Sonuçların ayrıntıları aşağıda sunulmuştur. **10 günlük** bitki yapraklarından elde edilen sonuçlara bakıldığında; 0.01 ve 0.1 mM SA, donma hasarını azaltmış ve donma noktasını geciktirmişlerdir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1). Örneğin, 0, 0.01, 0.5 ve 1 mM SA uygulanmış yapraklarda -9 °C'de hasar %50'nin üzerine çıkarken, 0.1 mM SA'da ise -12 °C'de bu değere ulaşılmıştır. Ayrıca, hasar -11 °C'de SA'sız yapraklarda %85 olurken, 0.01 ve 0.1 mM SA ile sırasıyla %50 ve %10 olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1). **17. günlük** bitki yapraklarında, 0.1 mM SA'nın donma hasarını azalttığı ve donma noktasını geciktirdiği belirlenmiştir. Diğer SA uygulamaları ise hasarı azaltmada başarılı olamamışlardır (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2). Örneğin, hasar -9 °C'de SA'sız yapraklarda %95 olurken, 0.1 ve 0.5 mM SA ile %50 olduğu görülmektedir. **24. günde** kesilen yapraklarda da 0.5 ve 1 mM SA donma hasarını azalttığı ve donma noktasını geciktirdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3). Örneğin, hasar -8 °C'de SA'sız yapraklarda %85 olurken, 0.5 mM SA ile %10 ve 1 mM SA ile %60 olduğu görülmektedir. **31 günlükken** kesilen yapraklarda SA uygulamalarının donma hasarı üzerinde olumlu etkisi görülmemiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4). Sonuç olarak, arpanın soğuğa dayanıklı Tokak çeşidinde düşük SA konsantrasyonların kısa süreli (10. ve 17. gün) ve yüksek SA konsantrasyonların uzun süreli (24. gün) donma hasarını azalttığı ve donma noktasını geciktirerek koruma sağladığı belirlenmiştir. Buradan elde edilen sonuçlara göre, sonraki çalışmalarımızda SA konsantrasyonları olarak 0.1 ve 1 mM SA konsantrasyonlarının kullanılması uygun görülmüştür.

Çizelge 4.1. 20/18 °C’de büyütülen arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra **10. günde** kesilen yapraklardaki % donma hasarı değerleri.

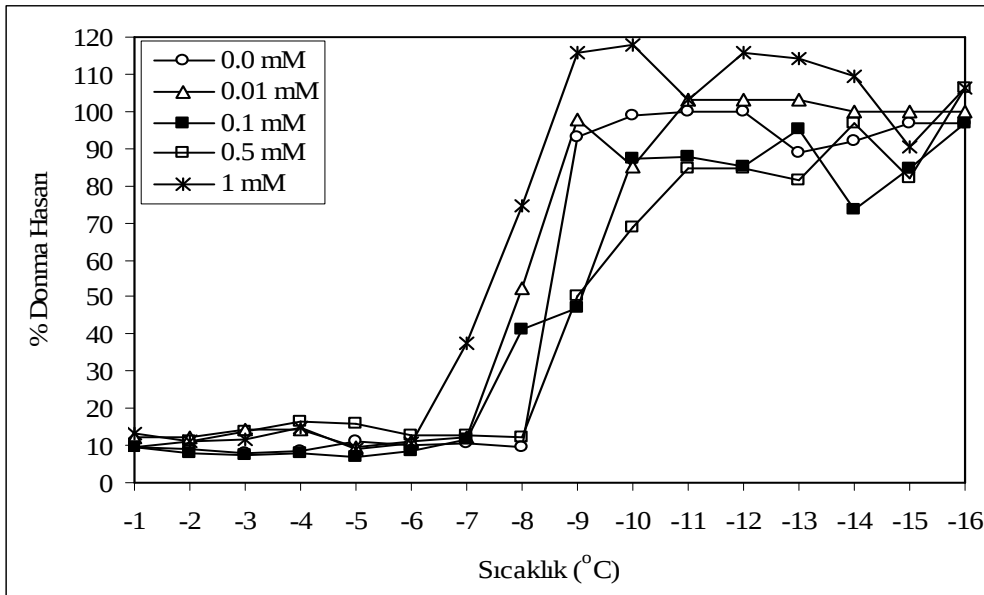
Sıcaklık (°C)	İyon İletkenliği (µS/cm)					%Donma Hasarı				
	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA
-1	28	20	44	36	21	10	7	16	13	8
-2	29	20	34	30	22	11	7	13	11	8
-3	30	23	31	30	18	11	9	12	11	7
-4	31	28	31	28	21	12	10	12	10	8
-5	25	30	31	34	25	9	11	12	13	9
-6	26	28	42	29	26	10	10	16	11	10
-7	28	24	44	39	22	10	9	16	15	8
-8	27	27	38	38	63	10	10	14	14	23
-9	132	153	34	145	128	49	57	13	54	48
-10	217	156	39	210	220	81	58	15	78	82
-11	233	129	27	224	238	87	48	10	84	89
-12	233	160	138	230	240	87	60	51	86	90
-13	245	275	240	245	230	91	103	90	91	86
-14	258	300	230	260	235	96	112	86	97	88
-15	235	290	275	265	240	88	108	103	99	90
-16	268	295	250	265	250	100	110	93	99	93



Şekil 4.1. Arpa (Tokak) yapraklardaki **10. güne** ait % donma hasarı değerleri

Çizelge 4.2. 20/18 °C’de büyütülen arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra **17. günde** kesilen yapraklardaki % donma hasarı değerleri.

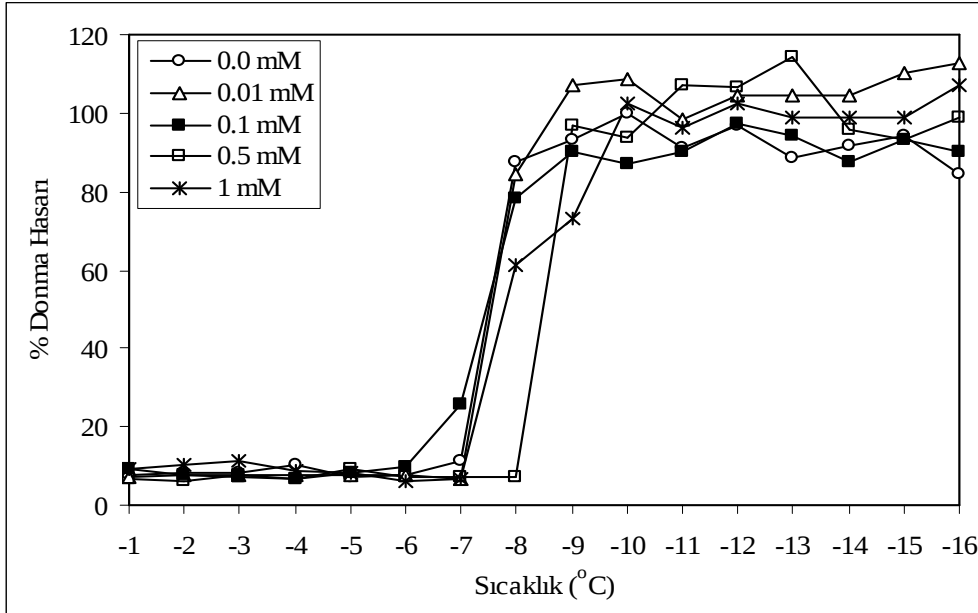
Sıcaklık (°C)	İyon İletkenliği (µS/cm)					%Donma Hasarı				
	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA
-1	30	39	30	31	42	9	12	9	10	13
-2	29	39	25	36	36	9	12	8	11	11
-3	26	46	24	44	38	8	14	8	14	12
-4	27	46	25	53	48	8	14	8	17	15
-5	35	31	22	50	28	11	10	7	16	9
-6	32	36	27	40	33	10	11	8	13	10
-7	34	39	38	41	120	11	12	12	13	38
-8	31	167	132	39	238	10	52	41	12	74
-9	297	313	150	160	370	93	98	47	50	116
-10	317	273	279	220	378	99	85	87	69	118
-11	320	330	280	270	330	100	103	88	84	103
-12	320	330	273	270	370	100	103	85	84	116
-13	285	330	305	260	365	89	103	95	81	114
-14	295	320	235	310	350	92	100	73	97	109
-15	310	320	270	263	290	97	100	84	82	91
-16	310	320	310	340	340	97	100	97	106	106



Şekil 4.2. Arpa (Tokak) yapraklardaki **17. güne** ait % donma hasarı değerleri

Çizelge 4.3. 20/18 °C’de büyütülen arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra **24. günde** kesilen yapraklardaki % donma hasarı değerleri.

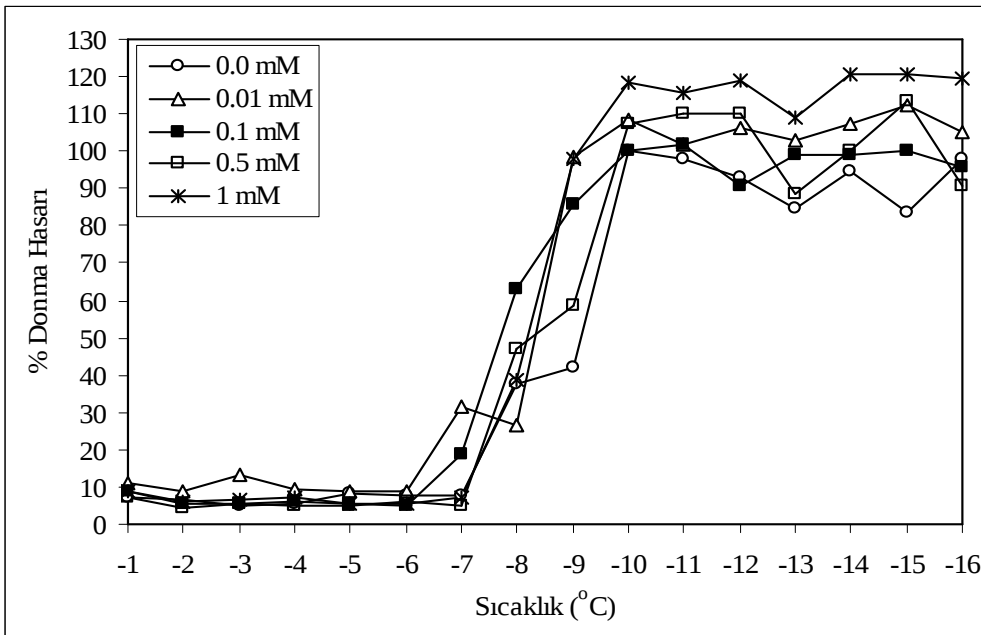
Sıcaklık (°C)	İyon İletkenliği (µS/cm)					%Donma Hasarı				
	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA
-1	28	25	32	24	32	8	7	9	7	9
-2	30	28	27	22	36	8	8	8	6	10
-3	30	27	25	27	41	8	8	7	8	12
-4	37	27	24	23	31	10	8	7	6	9
-5	25	27	30	32	30	7	8	8	9	8
-6	27	27	34	26	22	8	8	10	7	6
-7	40	23	91	26	24	11	6	26	7	7
-8	310	300	278	26	217	87	85	78	7	61
-9	330	380	320	343	260	93	107	90	97	73
-10	355	385	308	332	363	100	109	87	94	102
-11	323	348	320	380	342	91	98	90	107	96
-12	343	370	345	378	363	97	104	97	107	102
-13	315	370	335	405	350	89	104	94	114	99
-14	325	370	310	340	350	92	104	87	96	99
-15	335	390	330	330	350	94	110	93	93	99
-16	300	400	320	350	380	85	113	90	99	107



Şekil 4.3. Arpa (Tokak) yapraklardaki **24. güne** ait % donma hasarı değerleri

Çizelge 4.4. 20/18 °C’de büyütülen arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra **31. günde** kesilen yapraklardaki % donma hasarı değerleri.

Sıcaklık (°C)	İyon İletkenliği (µS/cm)					%Donma Hasarı				
	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA
-1	31	46	37	29	36	7	11	9	7	9
-2	28	38	23	19	26	7	9	5	5	6
-3	21	55	24	23	28	5	13	6	5	7
-4	24	40	26	20	30	6	10	6	5	7
-5	35	38	22	21	22	8	9	5	5	5
-6	32	36	21	25	23	8	9	5	6	5
-7	32	133	79	21	29	8	32	19	5	7
-8	158	112	263	196	161	38	27	63	47	38
-9	177	413	358	245	410	42	99	86	59	98
-10	418	453	420	450	495	100	108	100	108	118
-11	410	425	425	460	483	98	102	102	110	115
-12	388	445	380	460	497	93	106	91	110	119
-13	355	430	415	370	455	85	103	99	88	109
-14	395	450	415	420	505	94	108	99	100	121
-15	350	470	420	475	505	84	112	100	114	121
-16	410	440	400	380	500	98	105	96	91	120



Şekil 4.4. Arpa (Tokak) yapraklardaki **31. güne** ait % donma hasarı değerleri

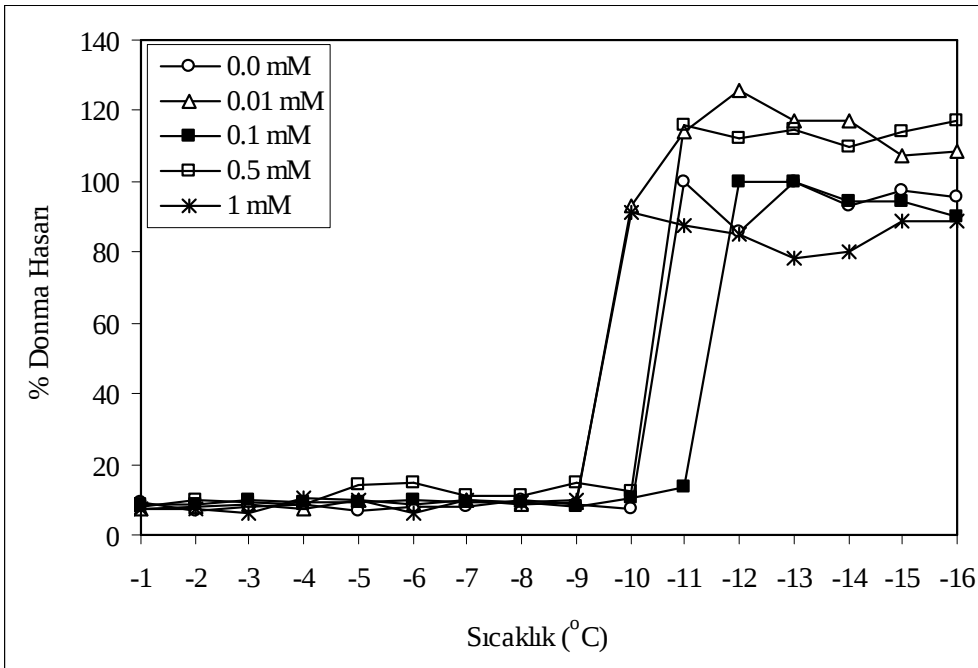
4.1. 2. Soğuğa hassas arpa varyetesi Akhisar'dan elde edilen sonuçlar

Soğuğa hassas arpa varyetesi Akhisar'dan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5-4.8 ve Şekil 4.5-4.8'te sunulmuştur. **10 günlük bitki** yapraklarından elde edilen sonuçlara bakıldığında, 1 mM SA donma hasarını azaltmış ve 0.1 mM SA ise donma noktasını geciktirmiştir (Şekil 4.5). Örneğin; SA'sız yapraklarda -11 °C'de hasar %100'ün üzerine çıkarken, 0.1 mM SA'da ise aynı sıcaklıkta hasarın %14 olduğu görülmektedir. Ayrıca 1 mM SA'da -16 °C de bile hasar kontroldekinden daha düşük olmuştur (Çizelge 4.5). **17. günde** kesilen yapraklarından elde edilen sonuçlara göre, 0.1 ve 1 mM SA'nın donma hasarını azalttığı ve donma noktasını geciktirdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6). Örneğin, Çizelge 4.6'da da görüldüğü gibi, hasar -9 °C'de SA'sız yapraklarda %50'nin üzerinde olurken, 0.1 ve 0.5 mM SA'da ise %7 olduğu görülmektedir. Bunun yanında -11 ile -16 °C arasında ortalama hasar değerleri, kontrolde %93 olurken, 0.1 ve 1 mM SA uygulamalarında %80 civarında kalmıştır. **24. günde** kesilen yapraklarda da 0.01, 0.1 ve 1 mM SA donma hasarını azalttığı ve donma noktasını geciktirdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7). Örneğin; Çizelge 4.7'e bakıldığında, hasar -9 °C'de SA'sız yapraklarda %65 olurken, 0.01, 0.1 ve 1 mM SA da ise %6 civarında olduğu görülmektedir. **31 günlükken** kesilen yapraklarda ise 1 mM SA donma hasarını azaltarak olumlu etki sağladığı görülmektedir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8). Bunun yanında -11 ile -16 °C arasında ortalama hasar değerleri, kontrolde %96 olurken, 1 mM SA uygulamalarında %85 civarında kalmıştır.

Sonuç olarak, arpanın soğuğa hassas Akhisar çeşidinde düşük SA konsantrasyonların 10, 17 ve 24. günlerde koruma sağlarken 1 mM SA'nın ise tüm günlerde donma hasarını azaltmada en etkili konsantrasyon olduğu ve SA uygulandıktan sonra 21. günden 24. güne kadar soğuğa maruz kalan bitkilerde (toplam 31 gün) hala etkili olduğu da bulunmuştur. Bu yüzden, bundan sonraki çalışmalarımızda donma hasarında etkili olan SA konsantrasyonları (0.1 ve 1 mM) ile çalışılmıştır.

Çizelge 4.5. 20/18 °C ‘de büyütülen arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra **10. günde** kesilen yapraklardan elde edilen % donma hasarı değerleri.

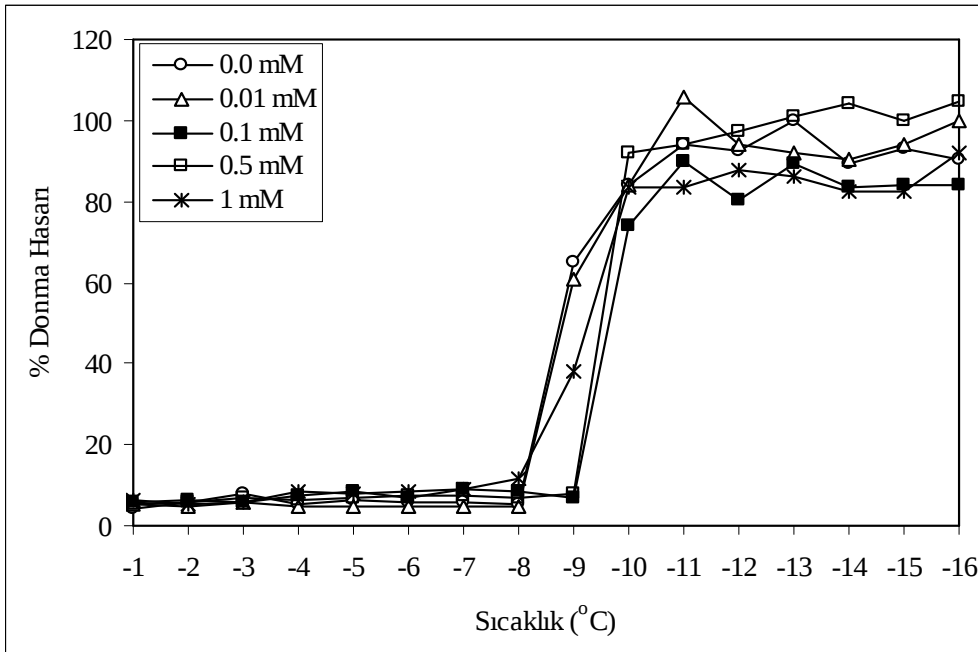
Sıcaklık (°C)	İyon İletkenliği (µS/cm)					%Donma Hasarı				
	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA
-1	33	26	30	29	25	9	7	9	8	7
-2	23	28	30	35	25	7	8	9	10	7
-3	28	31	34	33	21	8	9	10	9	6
-4	30	26	32	30	36	9	7	9	9	10
-5	24	35	32	50	35	7	10	9	14	10
-6	28	30	34	52	21	8	9	10	15	6
-7	27	35	32	39	35	8	10	9	11	10
-8	35	31	33	39	32	10	9	9	11	9
-9	31	32	29	51	35	9	9	8	15	10
-10	25	325	37	43	320	7	93	11	12	91
-11	350	400	48	405	307	100	114	14	116	88
-12	300	440	350	393	297	86	126	100	112	85
-13	350	410	350	402	275	100	117	100	115	79
-14	325	410	330	385	280	93	117	94	110	80
-15	340	375	330	400	310	97	107	94	114	89
-16	335	380	315	410	310	96	109	90	117	89



Şekil 4.5. Arpa (Akhisar) yapraklardaki **10. güne** ait % donma hasarı değerleri

Çizelge 4.6. 20/18 °C ‘de büyütülen arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra **17. günde** kesilen yapraklardan elde edilen % donma hasarı değerleri.

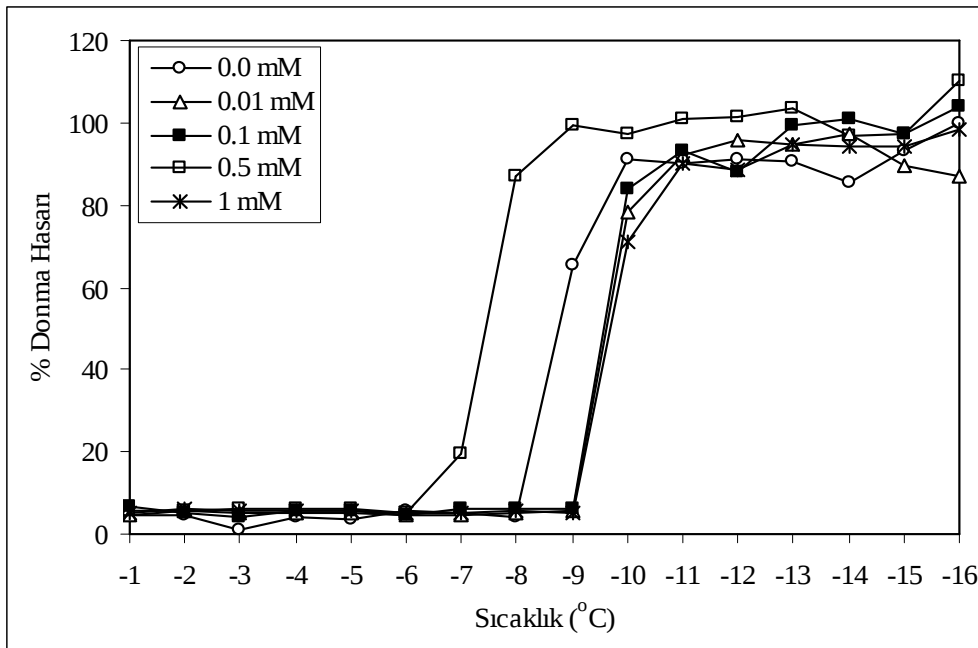
Sıcaklık (°C)	İyon İletkenliği (µS/cm)					%Donma Hasarı				
	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA
-1	21	28	30	26	32	4	5	6	5	6
-2	30	25	32	30	26	6	5	6	6	5
-3	40	29	30	35	31	8	6	6	7	6
-4	26	25	39	32	42	5	5	8	6	8
-5	33	23	43	36	40	6	5	8	7	8
-6	30	25	35	37	42	6	5	7	7	8
-7	31	25	45	39	45	6	5	9	8	9
-8	28	25	42	35	60	5	5	8	7	12
-9	333	310	36	40	195	65	61	7	8	38
-10	430	430	378	470	425	84	84	74	92	83
-11	480	540	458	480	427	94	106	90	94	84
-12	473	480	410	497	447	93	94	80	97	88
-13	510	470	455	515	440	100	92	89	101	86
-14	455	460	425	530	420	89	90	83	104	82
-15	475	480	430	510	420	93	94	84	100	82
-16	460	510	430	535	470	90	100	84	105	92



Şekil 4.6. Arpa (Akhisar) yapraklardaki **17. güne** ait % donma hasarı değerleri

Çizelge 4.7. 20/18 °C ‘de büyütülen arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra **24. günde** kesilen yapraklardan elde edilen % donma hasarı değerleri.

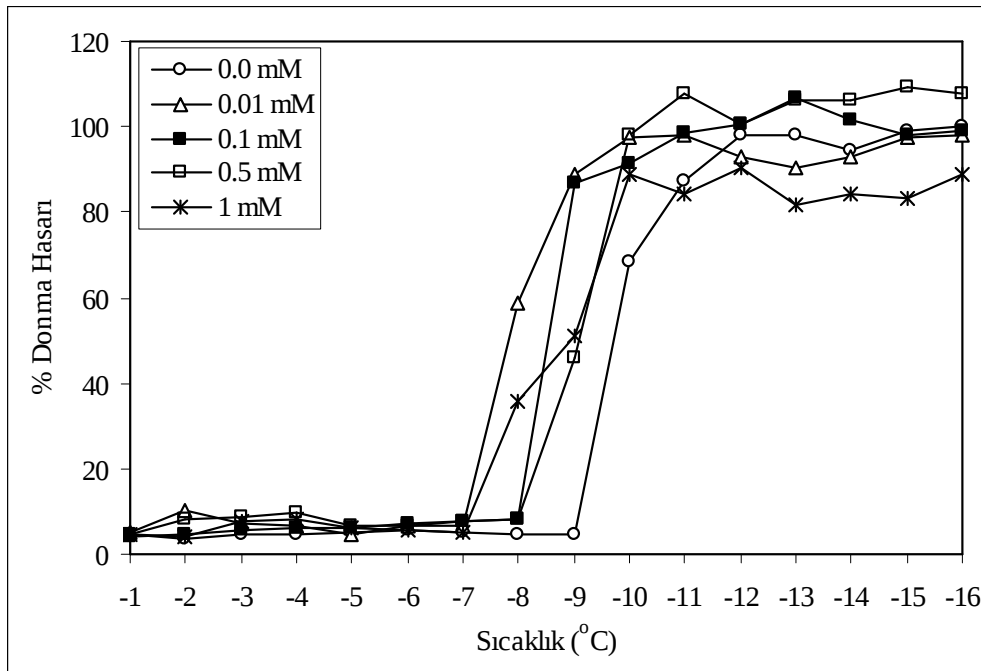
Sıcaklık (°C)	İyon İletkenliği (µS/cm)					%Donma Hasarı				
	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA
-1	26	28	38	33	30	4	5	6	6	5
-2	27	32	29	33	35	5	5	5	6	6
-3	7	31	25	37	34	1	5	4	6	6
-4	25	30	32	35	34	4	5	5	6	6
-5	21	29	32	35	33	4	5	5	6	6
-6	33	26	28	29	31	6	4	5	5	5
-7	31	27	35	114	29	5	5	6	19	5
-8	25	30	35	515	32	4	5	6	87	5
-9	385	33	36	585	30	65	6	6	99	5
-10	538	463	495	573	420	91	78	84	97	71
-11	532	543	550	595	533	90	92	93	101	90
-12	537	565	520	600	523	91	96	88	102	89
-13	535	560	585	610	560	91	95	99	103	95
-14	505	575	595	570	555	86	97	101	97	94
-15	550	530	575	575	555	93	90	97	97	94
-16	590	515	615	650	580	100	87	104	110	98



Şekil 4.7. Arpa (Akhisar) yapraklardaki **24. güne** ait % donma hasarı değerleri

Çizelge 4.8. 20/18 °C ‘de büyütülen arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) fidelerine 7. gün salisilik asit (SA) uygulanmış ve kesimden 3 gün önce soğuğa (7/4 °C) transfer edildikten sonra **31. günde** kesilen yapraklardan elde edilen % donma hasarı değerleri.

Sıcaklık (°C)	İyon İletkenliği (µS/cm)					%Donma Hasarı				
	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA	0.0 mM SA	0.01 mM SA	0.1 mM SA	0.5 mM SA	1 mM SA
-1	31	34	26	29	30	5	5	4	5	5
-2	24	66	30	54	27	4	10	5	8	4
-3	28	45	37	55	49	4	7	6	9	8
-4	30	43	38	61	52	5	7	6	10	8
-5	33	29	38	44	39	5	5	6	7	6
-6	36	42	46	43	37	6	7	7	7	6
-7	34	41	48	48	32	5	6	7	7	5
-8	30	377	52	53	230	5	59	8	8	36
-9	31	570	557	293	326	5	89	87	46	51
-10	440	625	585	627	568	69	98	91	98	89
-11	560	628	633	690	540	87	98	99	108	84
-12	628	595	645	645	580	98	93	101	101	90
-13	630	580	685	680	525	98	90	107	106	82
-14	605	595	650	680	540	94	93	101	106	84
-15	635	625	630	700	535	99	98	98	109	83
-16	640	630	635	690	570	100	98	99	108	89



Şekil 4.8. Arpa (Akhisar) yapraklardaki **31. güne** ait % donma hasarı değerleri

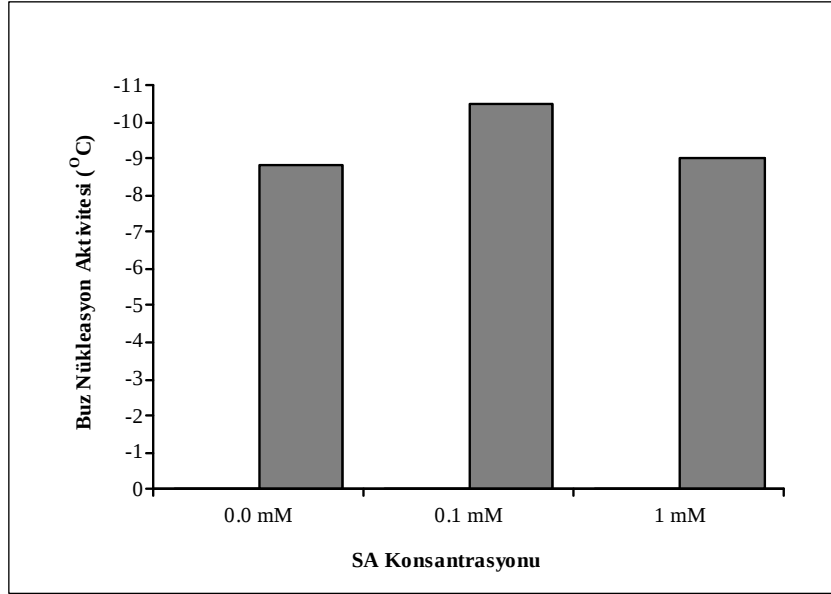
4.2. Buz Nükleasyon Aktivitesi Sonuçları

4.2.1. Soğuğa dayanıklı arpa varyetesi Tokak'tan elde edilen sonuçlar

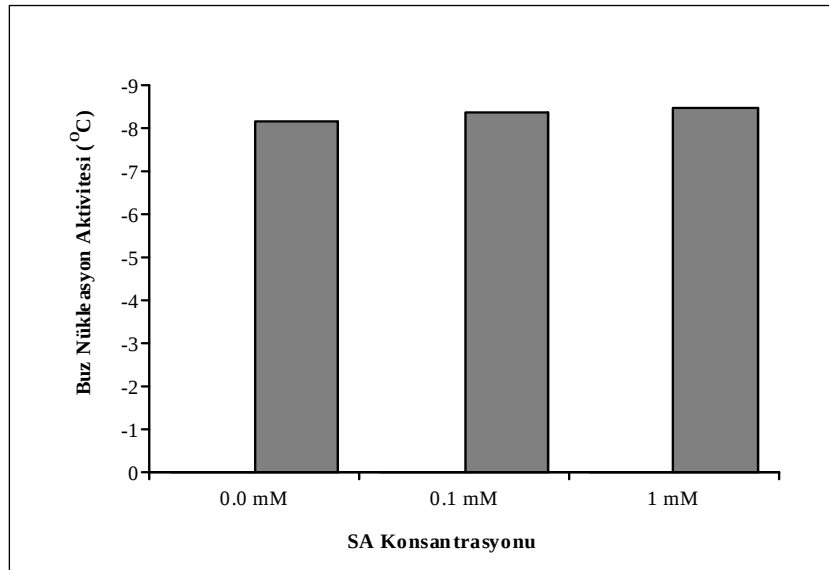
Soğuğa dayanıklı arpa varyetesi Tokak'tan elde edilen **apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi** (donma noktasının geciktirilmesi) sonuçları Çizelge 4.9 ve Şekil 4.9–4.12 'de sunulmuştur. Aktivite, 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir. **10 günlük** bitki yapraklarında soğuk+SA (0.1 ve 1 mM), soğukla kıyaslandığında, aktivitede önemli ($P<0.05$) bir artışa sebep olmuştur, yani donma noktası önemli derecede geciktirilmiştir. Buz nükleasyon aktivitesindeki artış, 0.1 mM SA'da soğuğa göre, %20'leri bulmuştur. Ancak, **17 günlük** bitki yapraklarında SA'lar aktivitede önemli bir artışa sebep olmamıştır ($P>0.05$). **24 günlük** bitki yapraklarında soğukla kıyaslandığında, soğuk+SA aktivitede önemli bir artışa sebep olmuştur. Artış 0.1 mM SA'da soğuğa göre %13 olmuştur. **31 günlük** bitki yapraklarında aktivite artışı 0.1 mM SA'da soğuğa göre %21 olmuştur. Bu sonuçlardan 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları, özellikle 10, 24 ve 31 günlük bitkilerde, buz nükleasyon aktivitesini artırmış ve 0.1 mM SA'nın 1 mM'dan daha etkili olduğu belirlenmiştir. SA'nın donma zararında koruyucu rolünün 31 güne kadar devam ettiği görülmüştür. Bunlara ilave olarak, tek başına soğuk uygulaması, kontrol bitkilerine göre 10 ve 17 günlük bitkilerde buz nükleasyon aktivitesini artırmıştır ($P<0.05$).

Çizelge 4.9. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (**Tokak çeşidi**) yapraklarından elde edilen **buz nükleasyon aktivitesi** ($^{\circ}\text{C}$) değerlerinin ortalaması. Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

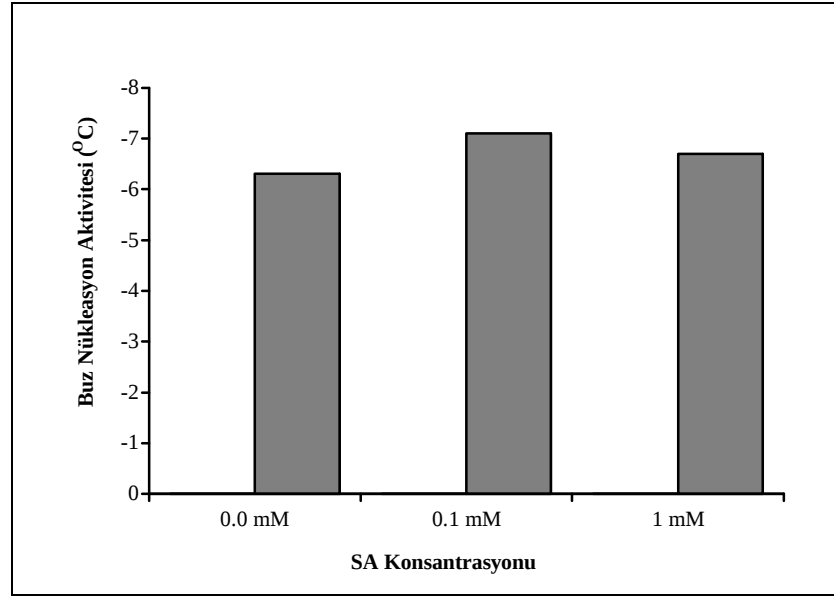
Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	-7 c	-7.3 b	-6.4 b	-7.1 b
Soğuk	-8.8 b	-8.2 a	-6.3 b	-6.5 c
Soğuk + 0.1 mM SA	-10.5 a	-8.4 a	-7.1 a	-7.9 a
Soğuk + 1 mM SA	-9 b	-8.5 a	-6.7 ab	-7.4 ab



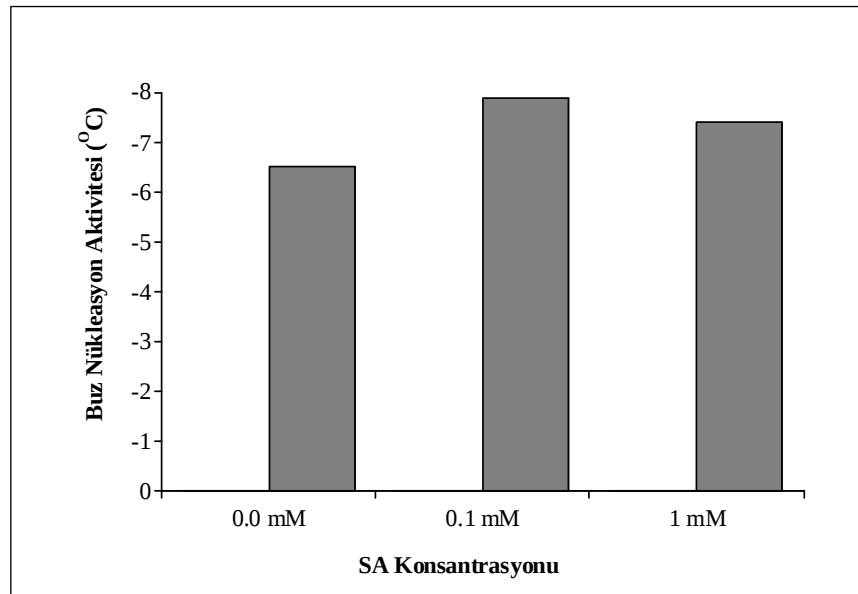
Şekil 4.9. 10 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi değerleri



Şekil 4.10. 17 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi değerleri.



Şekil 4.11. 24 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi değerleri



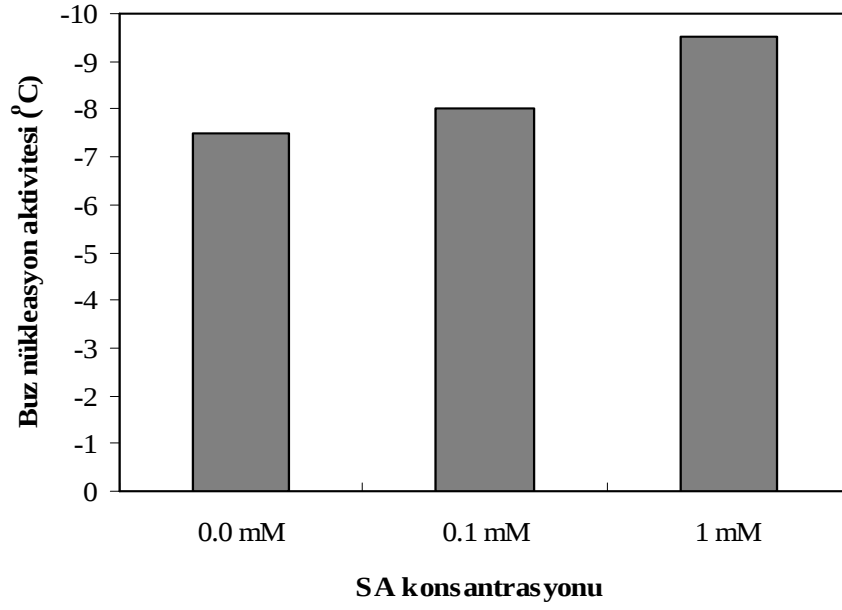
Şekil 4.12. 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi değerleri

4.2.2. Soğuga hassas arpa varyetesi Akhisar'dan elde edilen sonuçlar

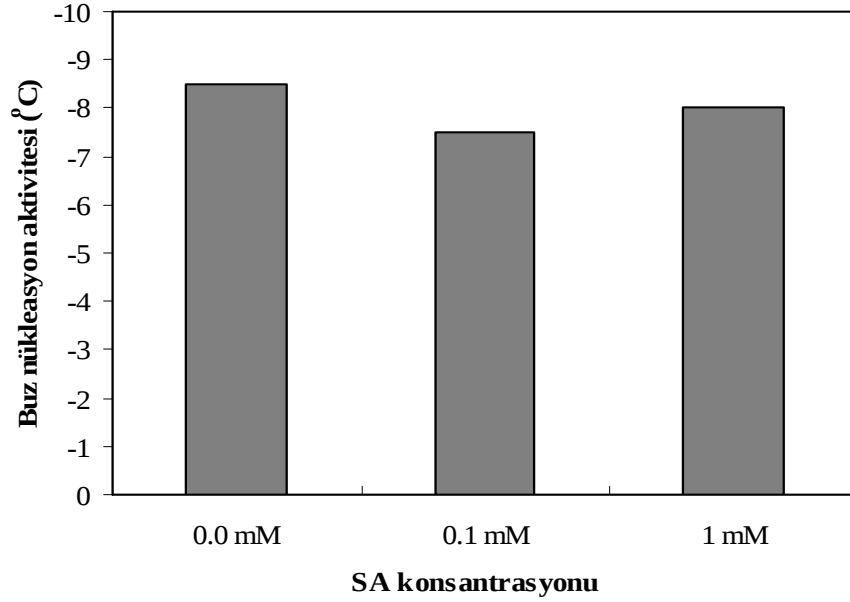
Soğuga hassas arpa varyetesi Akhisar'dan elde edilen **apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivite** sonuçları Çizelge 4.10 ve Şekil 4.13–Şekil 4.16 'da sunulmuştur. Aktivite, özellikle **10 günlük** bitki yapraklarında soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir. 10 günlük bitki yapraklarında soğuk+1 mM SA, soğukla kıyaslandığında, aktivitede önemli bir artışa sebep olmuştur ($P<0.05$). Artış, soğuga göre, 0.1 mM SA'da %7 ($P>0.05$) olurken, 1 mM SA'da ise %26 olmuştur ($P<0.05$). 17, **24 ve 31 günlük** bitki yapraklarında soğuk+SA uygulamaları, soğukla kıyaslandığında, aktivitede önemli derecede ($P>0.05$) bir artışa sebep olmamıştır. Bu sonuçlardan 1 mM SA uygulaması, özellikle 10 günlük bitkilerde, buz nükleasyon aktivitesini artırmada etkili olmuştur. Buna ilave olarak, tek başına soğuk uygulaması, kontrol bitkilerine göre, 10, 17 ve 24 günlük bitkilerde buz nükleasyon aktivitesini artırmıştır ($P<0.05$).

Çizelge 4.10. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (**Akhisar çeşidi**) yapraklarından elde edilen **buz nükleasyon aktivitesi** ($^{\circ}\text{C}$) değerlerinin ortalaması. Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

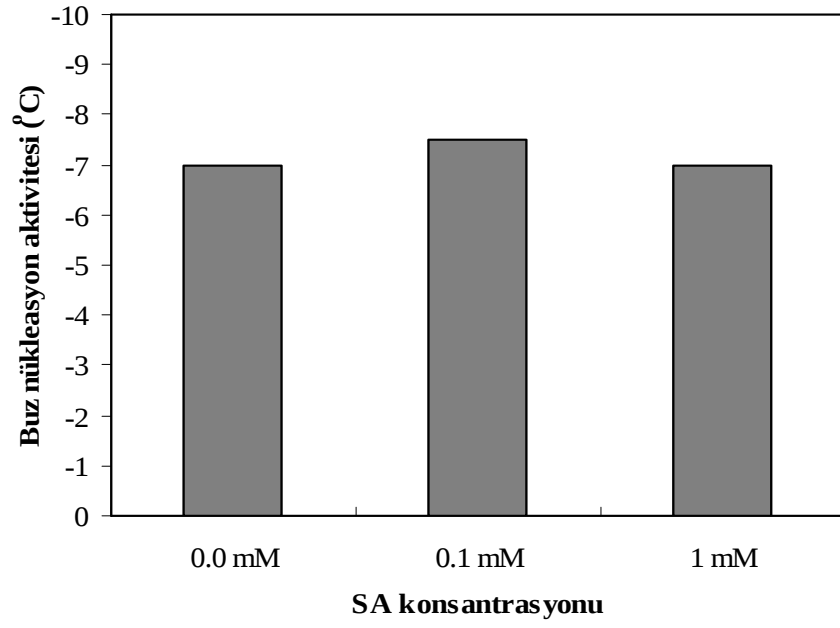
Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	-7 c	-7.5 b	-6 b	-8.5 a
Soğuk	-7.5 bc	-8.5 a	-7 a	-8.5 a
Soğuk + 0.1 mM SA	-8 b	-7.5 b	-7.5 a	-7 b
Soğuk + 1 mM SA	-9.5 a	-8 ab	-7 a	-7 b



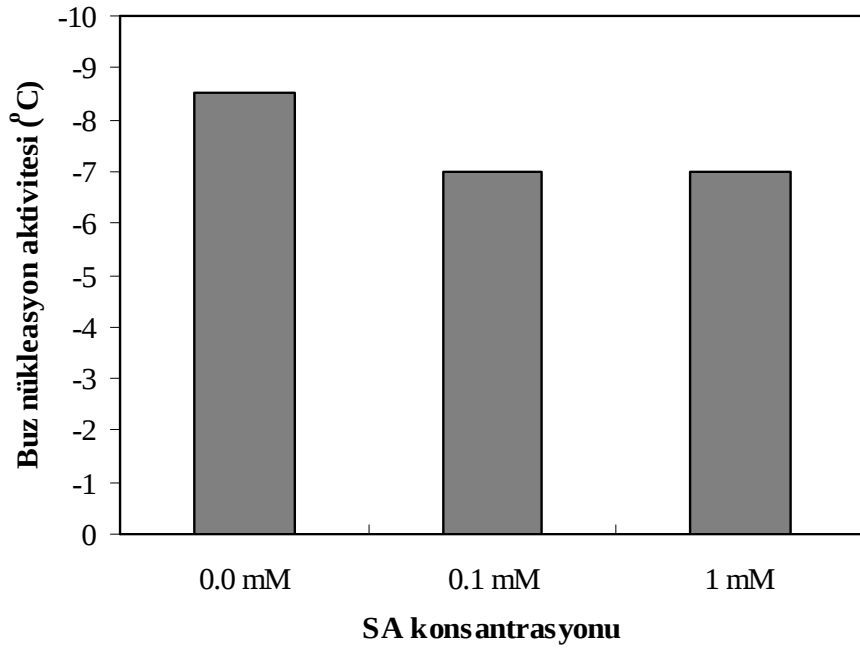
Şekil 4.13. 10 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi değerleri.



Şekil 4.14. 17 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi değerleri.



Şekil 4.15. 24 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi değerleri.



Şekil 4.16. 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi değerleri.

4.3. Apoplastik Enzim Aktivitesi Sonuçları

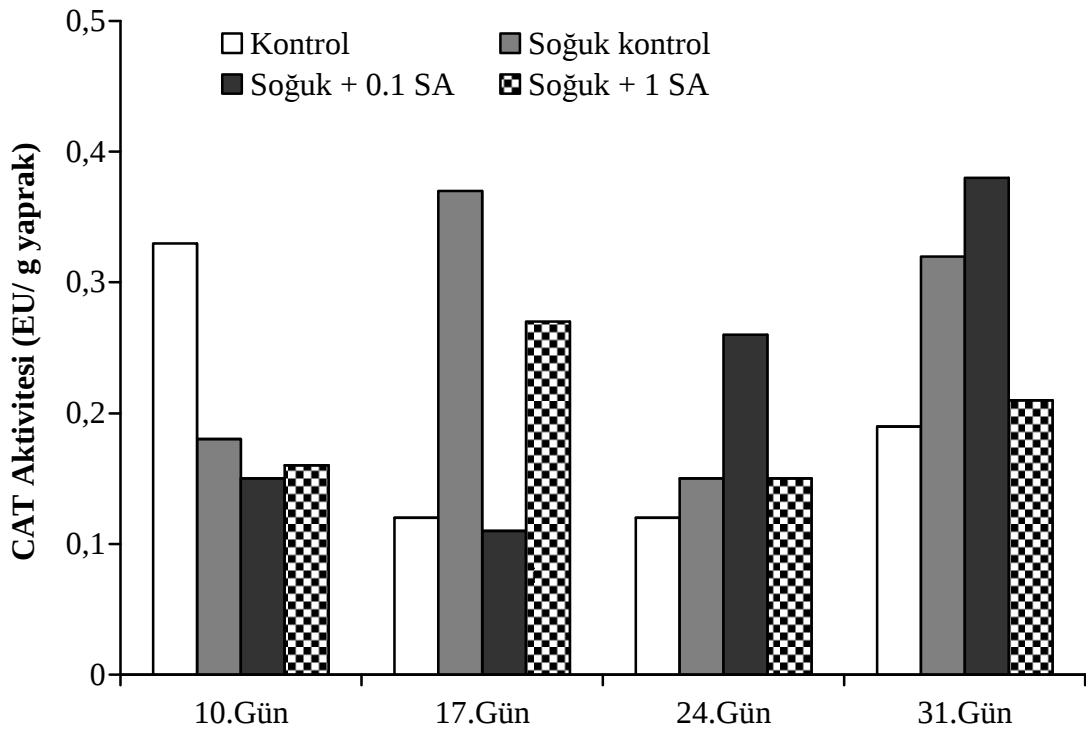
4.3.1. Soğuğa dayanıklı arpa varyetesi Tokak'tan elde edilen sonuçlar

4.3.1.a. Katalaz aktivitesi sonuçları

Apoplastik **katalaz (CAT)** aktivitesi, 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.17). **10 günlük** bitki yapraklarında tek başına soğuk uygulaması CAT aktivitesinde, kontrole göre, önemli derecede ($P<0.05$) düşüşe sebep olmuştur (Çizelge 4. 11). Örneğin, kontrol şartlarındaki bitkilere göre soğuk ($7/4^{\circ}\text{C}$), CAT aktivitesini %56 düşürmüştür. 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları da, soğukla karşılaştırıldığında, CAT aktivitesinin sırasıyla %17 ve %12 oranlarında düşmesine sebep olmuştur ($P<0.05$). Ancak, **17 günlük** bitki yapraklarında, tek başına soğuk uygulaması CAT aktivitesini artırırken, soğuk+SA muameleleri CAT aktivitesini, soğuğa göre, önemli derecede düşürmüştür ($P<0.05$). Soğuk uygulamasında aktivite artışı, kontrole göre, %208 olmuştur. Fakat 0.1 ve 1 mM SA'lar CAT aktivitesini, soğuğa göre, sırasıyla %71 ve %28 oranında düşmesine neden olmuşlardır ($P<0.05$). **24 günlük** bitki yapraklarında soğuk, kontrole göre, CAT aktivitesini %25 oranında artırmıştır. 0.1 mM SA, aktiviteyi soğuğa göre, %73 artırırken, 1 mM SA ise aktivite üzerine önemli derecede ($P>0.05$) bir etkiye sebep olmamıştır. **31 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması, kontrole göre, CAT aktivitesini artırmıştır. Bu artışlar kontrol ile kıyaslandığında tek başına soğuk ile %68 olmuştur. Tek başına soğuk uygulamasına göre, 0.1 mM SA ile aktivitede %18 oranında bir artış olurken, ilginç bir şekilde 1 mM SA'da aktivite %35 gibi büyük bir oranda düşmüştür ($P<0.05$). Bunlara ilave olarak, çalışılan tüm günlere topluca bakıldığında tek başına soğuk uygulaması 17, 24 ve 31. günlerde CAT aktivitesini artırmıştır. 0.1 mM SA 24 ve 31. günlüklerde aktiviteyi artırmış, 10 ve 17. günlerde düşürmüştür. 1 mM SA ise tüm günlerde aktiviteyi düşürdüğü gözle çarpılmaktadır. Bu sonuç, soğuğa dayanıklı arpada (Tokak) soğukla birlikte genelde artan CAT aktivitesinin, düşük konsantrasyondaki (0.1 mM) SA ile 24. günden sonra da arttığını ve bu etkinin uzun süre devam ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.11. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen **apoplastik katalaz (CAT)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	0.33 a	0.12 c	0.12 c	0.19 c
Soğuk	0.18 b	0.37 a	0.15 b	0.32 b
Soğuk + 0.1 mM SA	0.15 c	0.11 c	0.26 a	0.38 a
Soğuk + 1 mM SA	0.16 c	0.27 b	0.15 b	0.21 c



Şekil 4.17. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen **apoplastik katalaz (CAT)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).

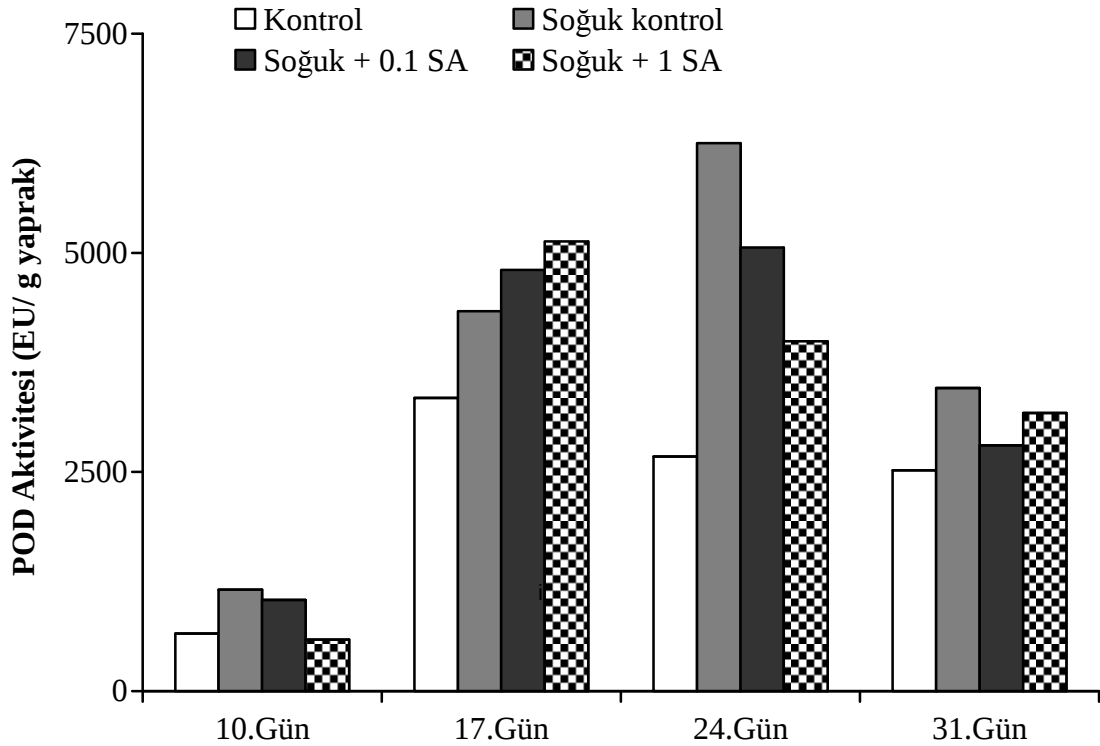
4.3.1.b. Peroksidaz aktivitesi sonuçları

Apoplastik **peroksidaz (POD)** aktivitesi de 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.18). **10 günlük** bitki yapraklarında tek başına soğuk uygulaması kontrol bitkilerine göre POD aktivitesini %76 gibi büyük bir oranda artırmıştır ($P<0.05$). Ancak, 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları aktiviteyi sırasıyla %10 ve % 50 oranında ($P<0.01$) düşürmüştür. **17 günlük** bitki yapraklarında, tek başına soğuk, kontrole göre, aktiviteyi %25 artırmıştır. Diğer taraftan, 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları da aktiviteyi önemli ölçüde artırmış ve bu artışlar sırasıyla %10 ve %18 olmuştur. **24 günlük** bitki yapraklarında tek başına soğuk uygulaması kontrol bitkilerine göre POD aktivitesini %133 gibi büyük bir oranda artırmıştır ($P<0.05$). Ancak, 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları aktiviteyi sırasıyla %19 ve %37 oranında ($P<0.05$) düşürmüştür. **31 günlük** bitki yapraklarında da tek başına soğuk uygulaması kontrol bitkilerine göre POD aktivitesini %37 oranda artırmıştır ($P<0.05$). Ancak, burada da 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları aktiviteyi sırasıyla %20 ve %9 oranında ($P<0.05$) düşürmüştür.

Bunlara ilave olarak, çalışılan tüm günlere topluca bakıldığında tek başına soğuk uygulaması 10, 17, 24 ve 31. günlerde POD aktivitesini artırmıştır. Aktivite 0.1 ve 1 mM SA uygulamalarında 10, 24 ve 31. günlerde düşmüş, 17. günde ise bir artış göze çarpmaktadır. Bu sonuçlar, soğuğa dayanıklı arpada soğukla birlikte genelde artan POD aktivitesinin SA ile düşürüldüğü ve bu etkinin uzun süre devam ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.12. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik **peroksidaz (POD)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	657 c	3446 d	2674 d	2516 d
Soğuk	1158 a	4332 c	6249 a	3460 a
Soğuk + 0.1 mM SA	1043 b	4804 b	5062 b	2802 c
Soğuk + 1 mM SA	586 d	5133 a	3989 c	3174 b



Şekil 4.18. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen **apoplastik peroksidaz (POD)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).

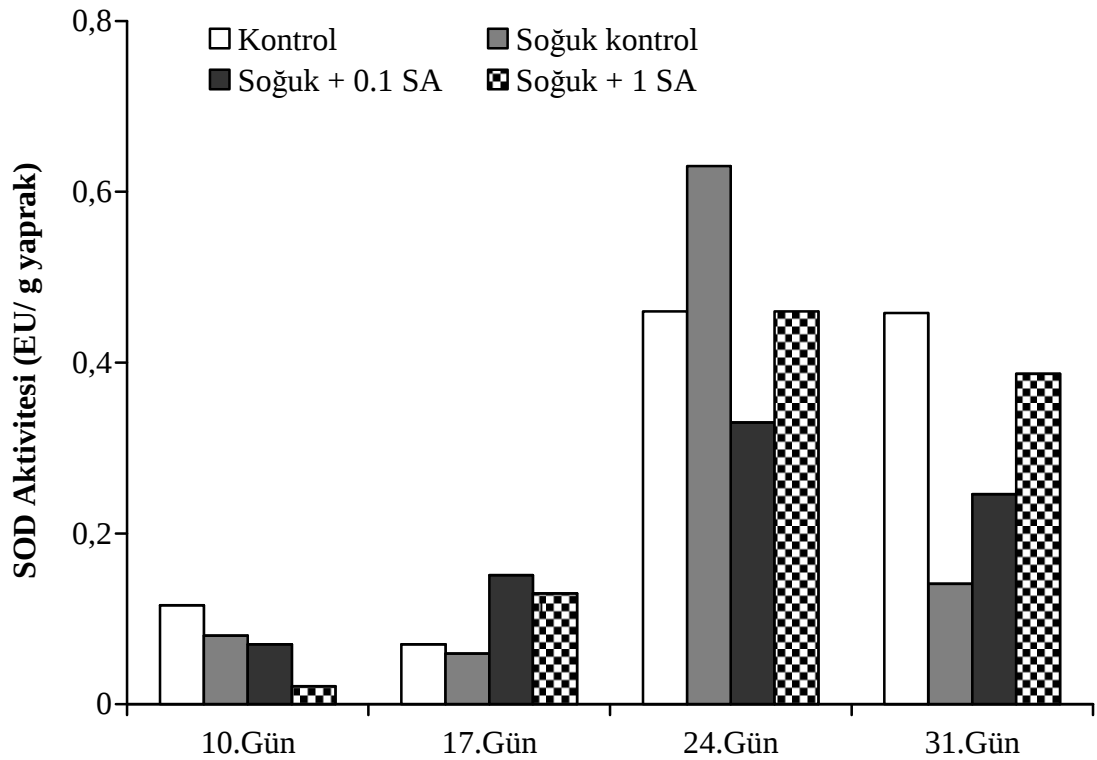
4.3.1.c. Süperoksit dismutaz aktivitesi sonuçları

Apoplastik **süperoksit dismutaz (SOD)** aktivitesi de, 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından elde edilen sonuçlar Çizelge 4.13 ve Şekil 4.19’da sunulmuştur. Tek başına soğuk uygulaması, **10 günlük** bitki yapraklarında kontrole göre SOD aktivitesini %32 oranında düşürmüştür (Çizelge 4.13). Soğukla kıyaslandığında, 0.1 ve 1 mM SA aktiviteyi sırasıyla %12 ve %74 oranında düşürmüşlerdir ($P<0.05$). **17 günlük** bitki yapraklarında tek başına soğukla SOD aktivitesi düşerken, soğuk+SA uygulamalarında ise önemli derecede ($P<0.05$) artmıştır. Örneğin, kontrole göre soğukta %16’lık bir düşüş olmuştur. Soğukla kıyaslandığında, 0.1 ve 1 mM SA aktiviteyi sırasıyla %155 ve %120 oranında artırmıştır. **24 günlük** bitki yapraklarında aktivitede soğukla birlikte artış belirlemiş, ancak 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları soğuğa göre aktiviteyi düşürmüşlerdir. Bu durum ayrıntılı incelendiğinde kontrole göre soğukta %36’lık bir artış şeklinde olmuştur. Soğukla kıyaslandığında 0.1 ve 1 mM SA, aktivitede sırasıyla %48 ve %27’lik bir düşüşe neden olmuşlardır ($P<0.01$). **31 günlük** bitki yapraklarında tek başına soğukla SOD aktivitesi düşerken, soğuk+SA uygulamalarında ise önemli derecede ($P<0.05$) artmıştır. Örneğin, kontrole göre soğukta %70’lik bir düşüş olmuştur. Soğukla kıyaslandığında, 0.1 ve 1 mM SA aktiviteyi sırasıyla %74 ve %174 oranında artırmıştır.

Diğer taraftan tek başına soğuk uygulaması kontrol ile karşılaştırıldığında, soğuk uygulanan bitki yapraklarında SOD aktivitesi 10, 17 ve 31 günlerde düşmüştür. Soğuk+SA’lar soğuk ile karşılaştırıldığında, 0.1 mM ve 1 mM SA aktiviteyi 10 ve 24 günlerde düşürmüş ancak 17 ve 31 günlük bitkilerde artırmıştır. Bu sonuç, soğuğa dayanıklı arpada (Tokak) soğukla birlikte genelde düşen SOD aktivitesinin uygulanan SA ile bazı günlerde artırılrsa da genelde düşürüldüğü ve bu etkinin uzun süre devam ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.13. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	0.116 a	0.070 c	0.46 b	0.458 a
Soğuk	0.080 b	0.059 d	0.63 a	0.141 d
Soğuk + 0.1 mM SA	0.070 c	0.151 a	0.33 c	0.246 c
Soğuk + 1 mM SA	0.021 d	0.130 b	0.46 b	0.387 b



Şekil 4.19. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).

4.3.2. Soğuga hassas arpa varyetesi Akhisar'dan elde edilen sonuçlar

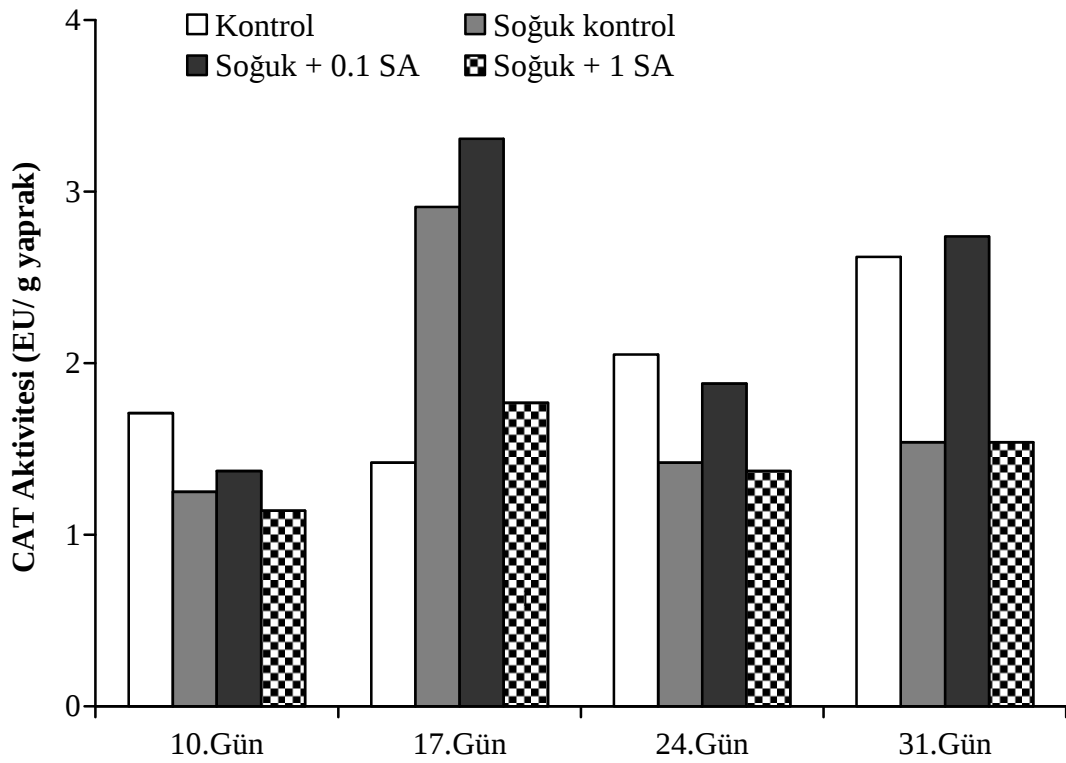
4.3.2.a. Katalaz aktivitesi sonuçları

Apoplastik **katalaz (CAT)** aktivitesi, 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.20). Çizelge 4.14'e dikkat edilirse, **10 günlük** bitki yapraklarında soğuk, CAT aktivitesinde kontrole göre %27 gibi önemli bir düşüşe sebep olmuştur ($P<0.05$). Soğukla kıyaslandığında, 0.1 mM SA aktiviteyi %10 artırırken 1 mM SA ise %9 oranında düşürmüştür ($P<0.05$). **17 günlük** bitki yaprakları incelendiğinde soğuk CAT aktivitesinde kontrole göre önemli derecede bir artışa sebep olmuştur. Bu artış kontrole göre soğukta %104 olmuştur. Soğukla karşılaştırıldığında, 0.1 mM SA aktiviteyi %14 artırırken, 1 mM SA ise %40 oranında bir düşüşe sebep olmuştur ($P<0.05$). **24 günlük** bitki yapraklarında soğuk CAT aktivitesinde kontrole göre önemli derecede düşüşe sebep olmuştur. Bu düşüş kontrole göre soğukta %30 olmuştur. Soğukla kıyaslandığında, 0.1 mM SA aktiviteyi %32 artırırken, 1 mM SA ise önemli derecede ($P>0.05$) bir etkiye sebep olmamıştır. **31 günlük** bitki yapraklarında da soğuk CAT aktivitesini düşürmüştür. Kendi içinde değerlendirildiğinde kontrole göre soğukta %42'lik bir düşüş olmuştur. Soğukla kıyaslandığında, 0.1mM SA aktivitede %78'lik bir artış sağlarken, 1 mM SA ise önemli derecede ($P>0.05$) bir etkiye neden olmamıştır.

Ayrıca, 10, 24 ve 31. günlerde tek başına soğuk uygulaması CAT aktivitesini düşürürken, 0.1 mM SA uygulamaları artırmıştır. 1 mM SA ise genelde aktivite üzerinde istatistiki öneme sahip değişikliklere sebep olmamıştır ($P>0.05$). Bu sonuç, soğuga hassas arpada (Akhisar) soğukla birlikte genelde düşen CAT aktivitesinin düşük konsantrasyonda (0.1 mM) uygulanan SA ile artırılabilirdiğini ve bu etkinin uzun süre devam ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.14. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik **katalaz (CAT)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	1.71 a	1.42 d	2.05 a	2.62 a
Soğuk	1.25 c	2.91 b	1.42 b	1.54 b
Soğuk + 0.1 mM SA	1.37 b	3.31 a	1.88 a	2.74 a
Soğuk + 1 mM SA	1.14 d	1.77 c	1.37 b	1.54 b



Şekil 4.20. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen **apoplastik katalaz (CAT)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).

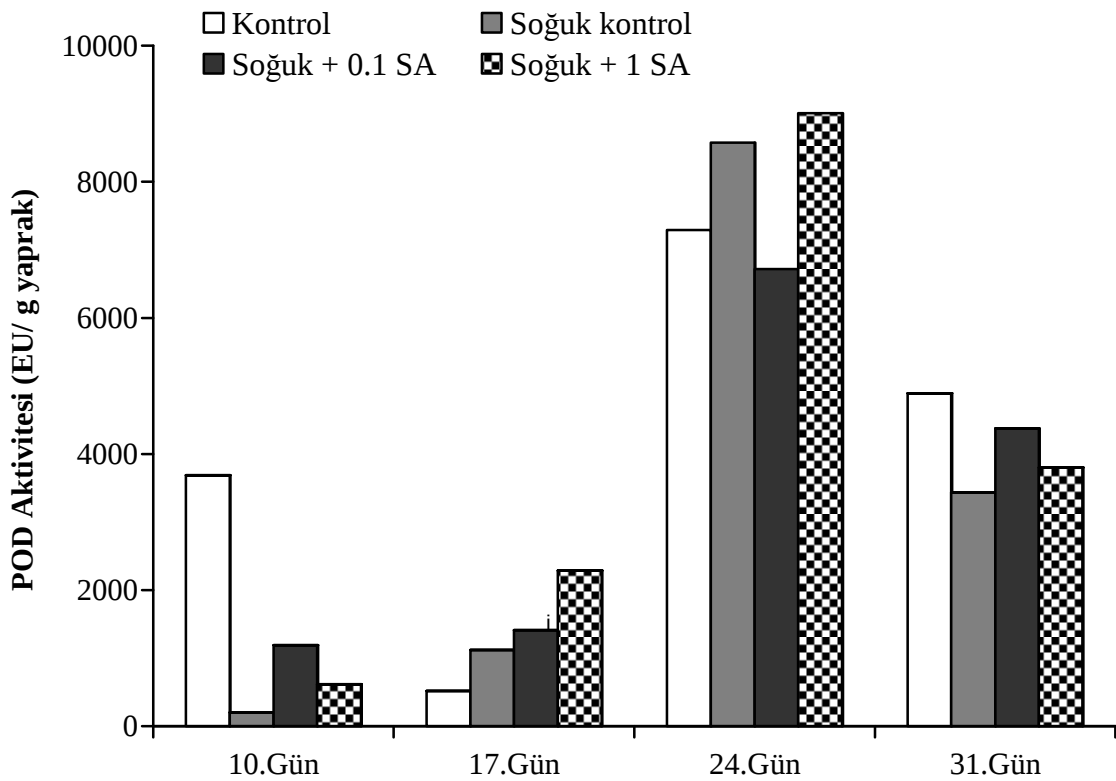
4.3.2.b. Peroksidaz aktivitesi sonuçları

Apoplastik **peroksidaz (POD)** aktivitesi de, 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.21). Çizelge 4.15'e dikkat edilirse, **10 günlük** bitki yapraklarında soğuk POD aktivitesinde kontrole göre önemli derecede düşüşe sebep olmuştur. Bu durum incelendiğinde, kontrole göre soğukta %95'lik bir düşüş göze çarpmaktadır. Soğukla kıyaslandığında, 0.1 ve 1 mM SA aktivitede sırasıyla %490 ve %207'lik ($P<0.05$) bir artışa sebep olmuştur. **17 günlük** bitki yapraklarında soğuk POD aktivitesinde kontrole göre önemli derecede bir artışa sebep olmuştur. Bu artış kontrole göre soğukta %116 olmuştur. Soğukla karşılaştırıldığında, 0.1 ve 1 mM SA uygulamalarının her ikisi de soğuğa göre aktiviteyi önemli derecede artırmışlardır ($P<0.05$). Aktivite artışları 0.1 ve 1 mM SA'larda sırasıyla, %26 ve %105 olmuştur. **24 günlük** bitki yapraklarında soğuk POD aktivitesinde kontrole göre önemli derecede artışa sebep olmuştur. Bu artış kontrole göre soğukta %17 olmuştur. Soğukla kıyaslandığında, 0.1 mM SA aktiviteyi %22 azaltırken, 1 mM SA ise %5'lik önemli sayılabilecek ($P<0.05$) bir artışa sebep olmuştur. **31 günlük** bitki yapraklarında da 10 günlükteki gibi, soğuk POD aktivitesini düşürürken, soğuk+SA'lar, soğuk uygulamalarına göre, artışa sebep olmuştur. 31 günlük kendi içinde değerlendirildiğinde, kontrole göre soğukta %30'luk bir düşüş olmuştur. Soğukla karşılaştırıldığında, 0.1 mM SA aktivitede %27'lik bir artış sağlarken 1 mM SA'de ise bu artış %11 de olmuştur.

Ayrıca, 10 ve 31 günlerde soğukla POD aktivitesinde düşüş, 17 ve 24 günlük bitkilerde ise aksine bir artış görülmektedir. Soğukla kıyaslandığında ise genel itibariyle 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları aktiviteyi önemli derecede artmıştır. Bu sonuç, soğuğa hassas arpada (Akhisar) soğukla birlikte genelde düşen POD aktivitesinin her iki konsantrasyonda da uygulanan SA ile yükseltildiğini ve bu etkinin uzun süre devam ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.15. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik **peroksidaz (POD)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	3689 a	514 d	7293 b	4890 a
Soğuk	200 d	1115 c	8580 a	3432 d
Soğuk + 0.1 mM SA	1186 b	1415 b	6721 c	4375 b
Soğuk + 1 mM SA	614 c	2288 a	9009 a	3803 c



Şekil 4.21. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen **apoplastik peroksidaz (POD)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).

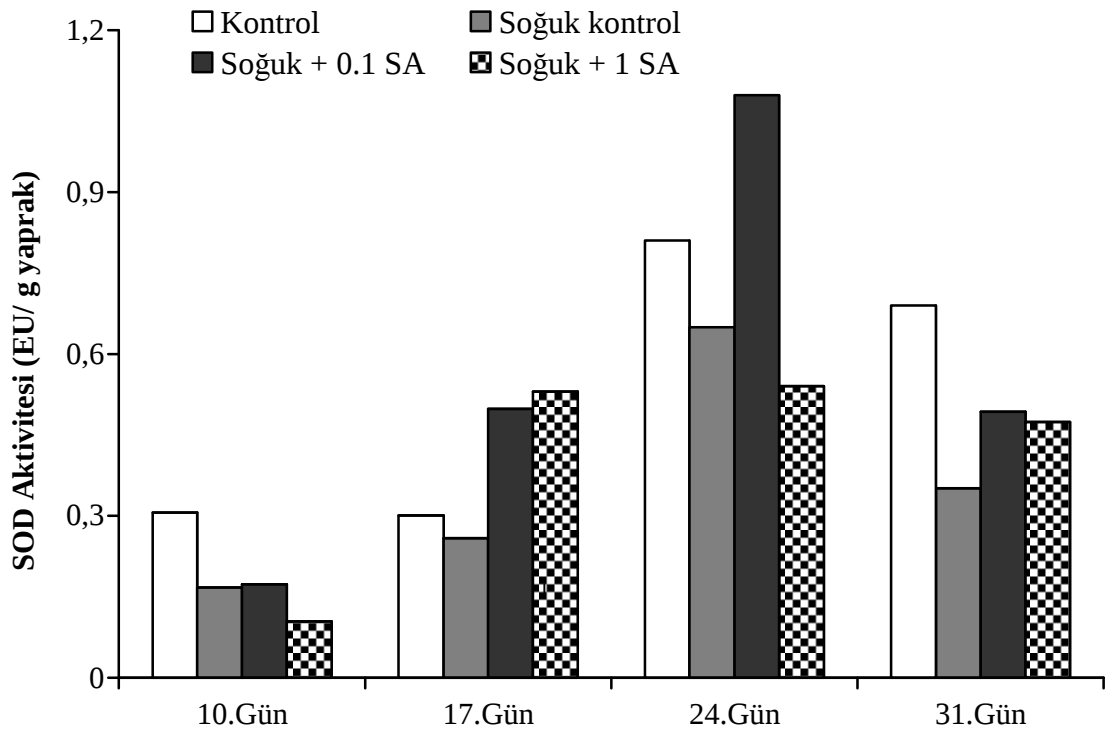
4.3.2.c. Süperoksit dismutaz aktivitesi sonuçları

Apoplastik **süperoksit dismutaz (SOD)** aktivitesi de, 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.22). **10 günlük** bitki yapraklarında soğuk SOD aktivitesinde kontrole göre önemli derecede düşüşe sebep olmuştur. Bu düşüş incelendiğinde, kontrole göre soğukta düşüşün %56 olduğu görülmektedir. Soğukla kıyaslandığında, 0.1 mM SA aktivitede %3'lük önemsizleşecek ($P>0.05$) bir artışa neden olurken, 1 mM SA ise %38'lik ($P<0.01$) bir düşüşe sebep olmuştur. **17 günlük** bitki yaprakları incelendiğinde soğuk uygulamasıyla SOD aktivitesinde kontrole göre önemli derecede ($P<0.05$) bir düşüş olmuştur. Kontrole göre soğuktaki bu düşüş %15 oranında olmuştur. Soğukla karşılaştırıldığında 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları aktiviteyi sırasıyla %92 ve %104 oranlarında artırmıştır. **24 günlük** bitki yapraklarında soğuk, SOD aktivitesini %20 oranında düşürmüştür ($P<0.05$). Diğer taraftan soğuk uygulamasına göre, 0.1 mM SA SOD aktivitesinde önemli derecede artış (%66) sağlarken, 1 mM SA'da ise bir düşüş (%17) görülmektedir. **31 günlük** bitki yapraklarında da soğuk uygulamasıyla SOD aktivitesinde kontrole göre önemli derecede ($P<0.05$) bir düşüş olmuştur. Kontrole göre soğuktaki bu düşüş %50 oranında olmuştur. Ancak, soğukla karşılaştırıldığında 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları aktiviteyi sırasıyla %40 ve %35 oranlarında artırmıştır.

Bunun yanında, Şekil 4.21'a dikkat edilirse, 10 ile 24 günlük değerler kendi arasında 17 ile 31 günlük değerler de kendi arasında bir paralellik göstermektedir. Soğuk uygulaması kontrole göre SOD aktivitesini 10, 17, 24 ve 31 günlük bitkilerde düşürmüştür. Soğuk+SA'lar soğuk ile karşılaştırıldığında, 0.1 mM SA aktiviteyi bütün günlerde artırırken, 1 mM SA 10 ve 24 günlüklerde düşürmüş ve 17 ve 31 günlük bitkilerde ise artırmıştır. Bu sonuç, soğuğa hassas arpada (Akhisar) soğukla birlikte önemli oranlarda düşen SOD aktivitesinin uygulanan SA ile yükseltildiğini ve bu etkinin 0.1 mM SA'da bariz olarak görülmekte olduğunu ve uzun süre de devam ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.16. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik **süperoksit dismutaz (SOD)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	0.306 a	0.301 b	0.810 b	0.690 a
Soğuk	0.167 b	0.259 c	0.650 c	0.351 c
Soğuk + 0.1 mM SA	0.173 b	0.498 a	1.080 a	0.493 b
Soğuk + 1 mM SA	0.104 c	0.530 a	0.540 d	0.474 b



Şekil 4.22. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen **apoplastik süperoksit dismutaz (SOD)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).

4.4. Simplastik Enzim Aktivitesi Sonuçları

4.4.1. Soğuğa dayanıklı arpa varyetesi Tokak'tan elde edilen sonuçlar

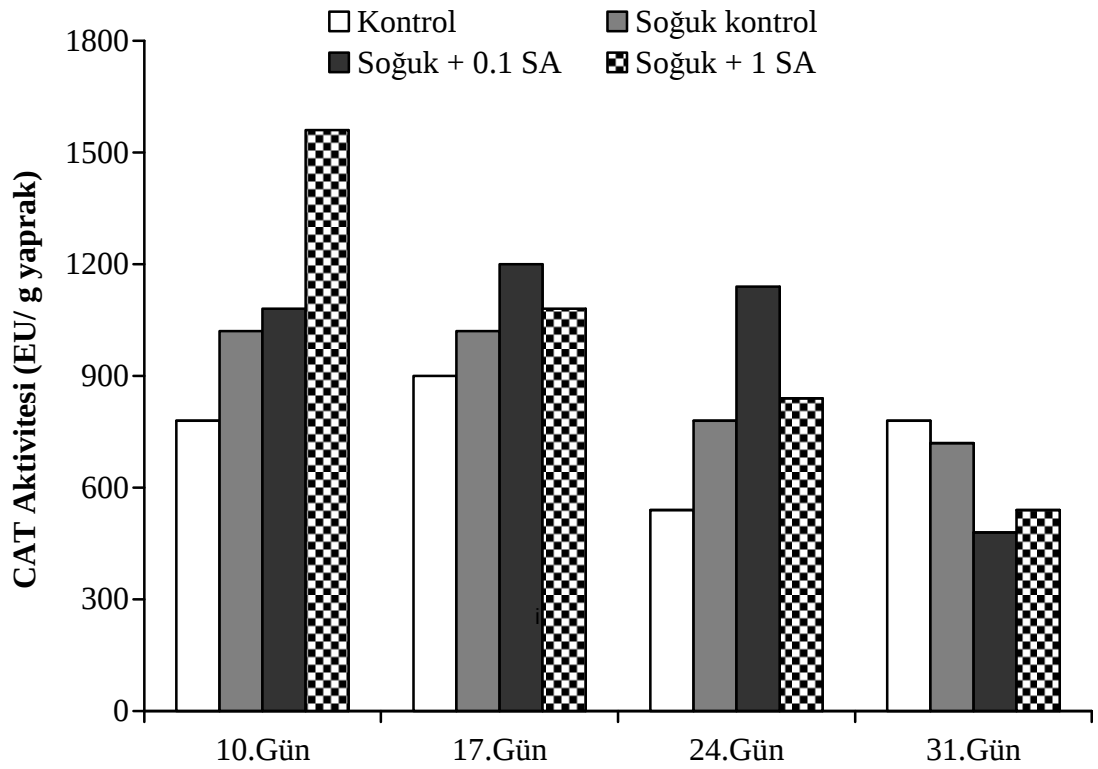
4.4.1.a. Katalaz aktivitesi sonuçları

Simplastik **katalaz (CAT)** aktivitesi, 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.17 ve Şekil 4.23). **10 günlük** bitki yapraklarında soğuk CAT aktivitesinde kontrole göre önemli derecede artışa sebep olmuştur. Bu artış soğuk uygulamasıyla %30 oranında olmuştur. Soğukla karşılaştırıldığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması da sırasıyla %5 ve %52' lik bir artışa sebep olmuştur ($P<0.05$). **17 günlük** bitki yaprakları incelendiğinde soğuk uygulaması CAT aktivitesinde kontrole göre önemli derecede bir artışa sebep olmuştur. Bu artış kontrole göre %13 olmuştur. Soğukla karşılaştırıldığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması CAT aktivitesini sırasıyla %17 ve %5 oranında artırmıştır ($P<0.05$). **24 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması CAT aktivitesinde kontrole göre önemli bir artışa sebep olmuştur. Bu artış soğuk uygulamasıyla %44 olmuştur. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulamalarında CAT aktivitesinde sırasıyla %46 ve %7'lik bir artışa sebep olmuştur ($P<0.05$). **31 günlük** bitki yapraklarında soğuk CAT aktivitesini düşürmüştür. Soğuk uygulaması kontrole göre % 8'lik bir düşüşe sebep olmuştur. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulamasıyla CAT aktivitesinde sırasıyla %34 ve %25'lik bir düşüş olmuştur ($P<0.05$).

Bunlara ilave olarak, tüm günlere topluca bakıldığında 10, 17 ve 24. günlerde soğukla CAT aktivitesinde artış olmuştur (Çizelge 4.17). Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 mM ve 1 mM SA'da 10, 17 ve 24. günlerde aktivite artışına sebep olurken 31. günlüklerde aktivite düşmüştür. Bu sonuç, soğuğa dayanıklı bu arpada (Tokak) soğukla birlikte genelde artan CAT aktivitesinin 0.1 ve 1 mM SA uygulamasıyla da arttığını ve bu etkinin uzun süre devam ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.17. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen **simplastik katalaz (CAT)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak. Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	780	900	540	780
Soğuk	1020	1020	780	720
Soğuk + 0.1 mM SA	1080	1200	1140	480
Soğuk + 1 mM SA	1560	1080	840	540



Şekil 4.23. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen **simplastik katalaz (CAT)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).

4.4.1.b. Peroksidaz aktivitesi sonuçları

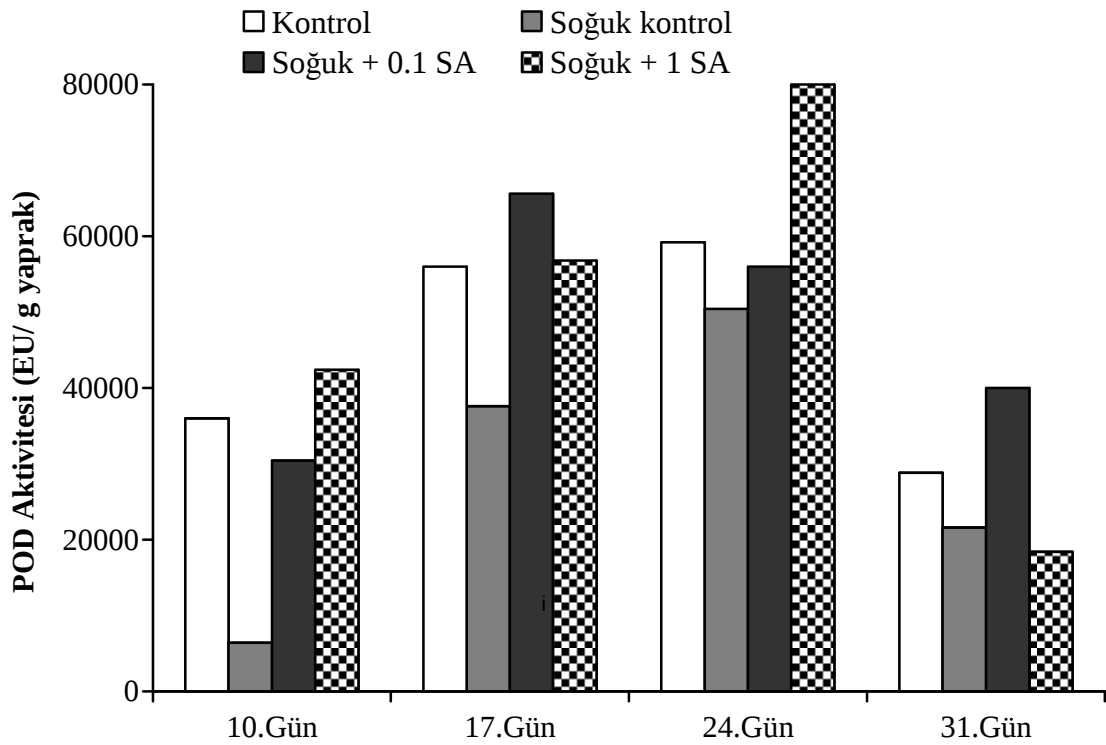
Simplastik **peroksidaz (POD)** aktivitesi de, 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.18 ve Şekil 4.24). **10 günlük** bitki yapraklarında kontrole göre tek başına soğuk uygulaması POD aktivitesini düşürmüştür. Örneğin, kontrole göre soğuk uygulamasıyla %83'lük bir düşüş meydana gelmiştir. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması POD aktivitesinde sırasıyla %204 ve %512'lik çok önemli derecede artışa sebep olmuştur ($P<0.05$). **17 günlük** bitki yaprakları incelendiğinde, soğuk uygulaması POD aktivitesini kontrole göre düşürmüştür. Örneğin kontrole göre soğuk uygulaması aktiviteyi %33 düşürmüştür. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması aktiviteyi sırasıyla %74 ve %51 oranında artırmıştır ($P<0.05$). **24 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması POD aktivitesini kontrole göre düşürmüştür. Bu düşüş soğuk uygulamasıyla %15 olmuştur. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması aktivitede sırasıyla %11 ve %58'lik önemli bir artışa sebep olmuştur ($P<0.05$). **31 günlük** bitki yapraklarında da 10, 17 ve 24 günlüklerdeki gibi soğuk POD aktivitesini soğuk uygulaması düşürmüştür. Yapraklara soğuk uygulaması kontrole göre %25'lik bir düşüşe neden olmuştur. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması da aktivitede sırasıyla %85 ve %15'lik bir düşüşe sebep olmuştur.

Bununla birlikte tüm günlere bakılırsa 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk uygulamasıyla POD aktivitesinde önemli bir düşüş görülmektedir. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 mM SA ve 1 mM SA uygulamalarında 10, 17, 24 ve 31. günlerde önemli derecede bir artış göze çarpmaktadır (Çizelge 4.18). Bu sonuç, soğuğa dayanıklı arpada (Tokak) soğukla birlikte düşen POD aktivitesinin her iki konsantrasyonda da uygulanan SA ile artırıldığı ve bu etkinin uzun süre devam ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.18. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen **simplastik peroksidaz (POD)** aktivitesi değerleri (EU/g

yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	36000	56000	59200	28800
Soğuk	6400	37600	50400	21600
Soğuk + 0.1 mM SA	30400	65600	56000	40000
Soğuk + 1 mM SA	42400	56800	80000	18400



Şekil 4.24. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen **simplastik peroksidaz (POD)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).

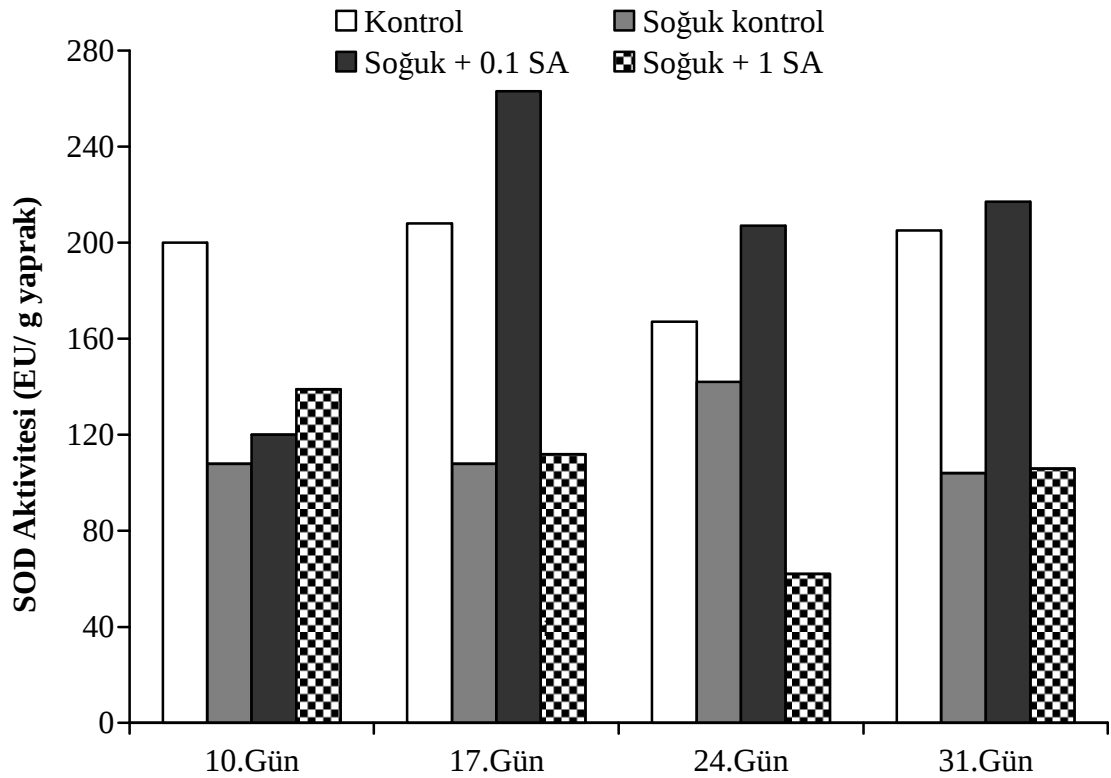
4.4.1.c. Süperoksit dismutaz aktivitesi sonuçları

Simplastik **süperoksit dismutaz (SOD)** aktivitesi de, 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.19 ve Şekil 4.25). **10 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması SOD aktivitesinde kontrole göre önemli derecede düşüşe sebep olmuştur. Örneğin, kontrole göre tek başına soğuk uygulaması %46'lık bir düşüşe neden olmuştur. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması SOD aktivitesinde sırasıyla %11 ve %28'lik önemli derecede bir artışa sebep olmuştur ($P<0.05$). **17 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulamasıyla SOD aktivitesi kontrole göre önemli derecede düşmüştür. Örneğin, kontrol bitkilerine göre soğuk uygulamasıyla %49'luk bir düşüş olmuştur. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 mM SA uygulaması aktiviteyi %143 artırırken, 1 mM SA'da ise herhangi etki görülmemiştir ($P>0.05$). **24 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması SOD aktivitesinde düşüşe sebep olmuştur. Örneğin kontrole göre soğukla %15'lik bir düşüş olmuştur. Soğukla kıyaslandığında 0.1 ve 1 mM SA uygulaması da aktivitede sırasıyla %45 ve %57'lik önemli bir düşüşe sebep olmuştur ($P<0.05$). **31 günlük** bitki yapraklarında tek başına soğuk uygulaması SOD aktivitesinde düşüşe sebep olmuştur. Soğuk uygulamasıyla kontrole göre bu düşüş %50 olmuştur. Soğukla karşılaştırıldığında ise 0.1 mM SA uygulaması aktivitede %74'lük bir artış sağlarken 1 mM SA'da ise herhangi etki görülmemiştir ($P>0.05$).

Buna ilave olarak soğuk uygulaması kontrol ile karşılaştırıldığında, SOD aktivitesini 10, 17, 24 ve 31 günlük bitkilerin hepsinde düşürmüştür. Soğuk+SA'lar soğuk ile karşılaştırıldığında, 0.1 mM aktiviteyi tüm günlerde artırırken, 1 mM SA aktiviteyi 10 günlüklerde bir miktar artırmış, 24 günlüklerde düşürmüş ve 17 ve 31 günlük bitkilerde herhangi bir etkiye sebep olmamıştır. Bu sonuç, soğuğa dayanıklı bu arpada soğukla birlikte genelde düşen SOD aktivitesinin uygulanan düşük konsantrasyonlarda (0.1 mM) SA ile artırıldığını ve bu etkinin uzun süre devam ettiğini göstermektedir (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen **simplastik süperoksit dismutaz (SOD)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	200	208	167	205
Soğuk	108	108	142	104
Soğuk + 0.1 mM SA	120	263	207	217
Soğuk + 1 mM SA	139	112	62	106



Şekil 4.25. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen **simplastik süperoksit dismutaz (SOD)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).

4.4.2. Soğuga hassas arpa varyetesi Akhisar'dan elde edilen sonuçlar

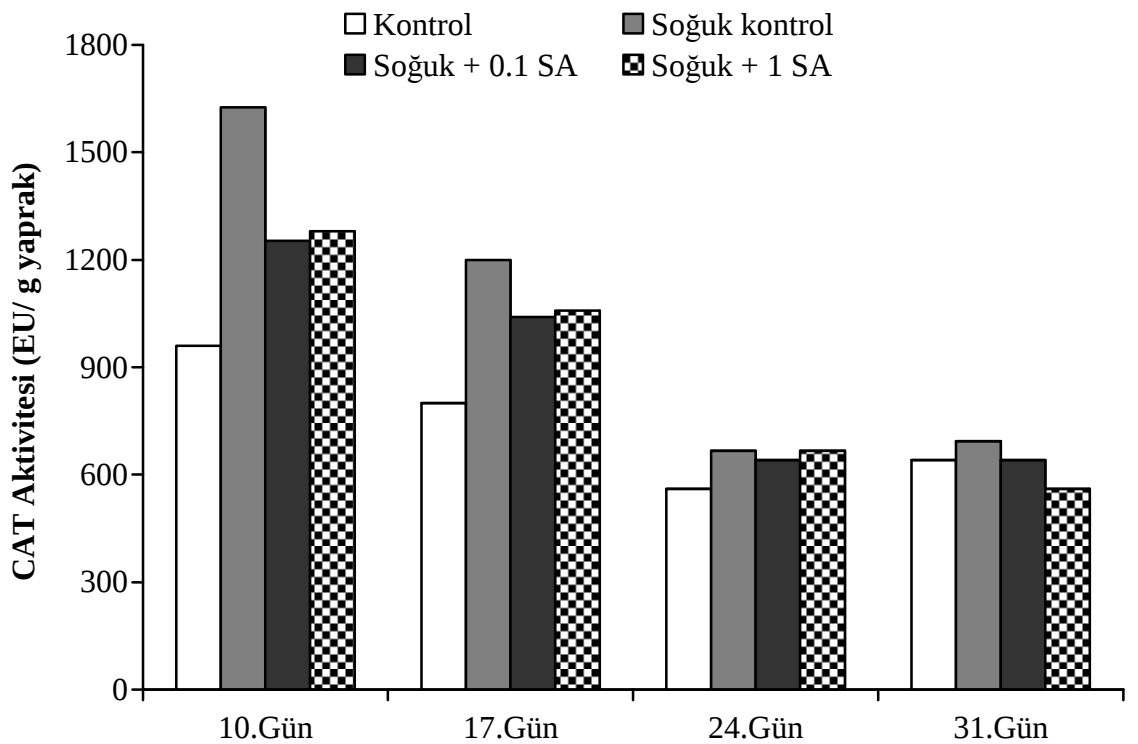
4.4.2.a. Katalaz aktivitesi sonuçları

Simplastik **katalaz (CAT)** aktivitesi, 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.20 ve Şekil 4.26). **10 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması CAT aktivitesinde kontrole göre önemli derecede artışa sebep olmuştur. Örneğin, tek başına soğuk uygulamasıyla aktivitede kontrole göre %69'luk artış gözlenmiştir. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması aktiviteyi sırasıyla %23 ve %22 oranında düşürmüştür ($P<0.05$). **17 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması CAT aktivitesinde kontrole göre artışa sebep olmuştur. Örneğin, soğuk uygulamasıyla kontrole göre %50'lik artış olmuştur. Soğukla karşılaştırıldığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması ise aktivitede sırasıyla %14 ve %40'lık bir düşüş sağlamıştır. **24 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması CAT aktivitesinde kontrole göre önemli derecede artışa sebep olmuştur. Tek başına soğuk uygulaması kontrole göre %18'lik artışa neden olmuştur ($P<0.05$). Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları aktivitede önemli derecede bir etkiye sebep olmamıştır ($P>0.05$). **31 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması CAT aktivitesini artırmıştır. Örneğin, tek başına soğuk uygulaması kontrole göre aktiviteyi %8 artırmıştır ($P<0.05$). Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması aktiviteyi sırasıyla %8 ve %20 düşürmüştür.

Ayrıca 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk uygulaması CAT aktivitesinde artışa sebep olurken soğukla kıyaslandığında ise 0.1 mM ve 1 mM SA uygulamalarında aktivitede düşüş şeklinde bir paralellik göze çarpmaktadır. Tüm günlerde 0.1 mM SA uygulamasının soğuga göre önemli bir aktivite düşüşüne sebep olduğu da dikkat çekmektedir. Bu sonuç, soğuga hassas arpada (Akhisar) soğukla birlikte genelde artan CAT aktivitesinin uygulanan SA ile düşürüldüğü ve bu etkinin uzun süre devam ettiğini göstermektedir (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen **simplastik katalaz (CAT)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak. Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	960 c	800 c	560 b	640 b
Soğuk	1626 a	1200 a	666 a	693 a
Soğuk + 0.1 mM SA	1253 b	1040 b	640 a	640 b
Soğuk + 1 mM SA	1280 b	1058 b	666 a	560 c



Şekil 4.26. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen **simplastik katalaz (CAT)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).

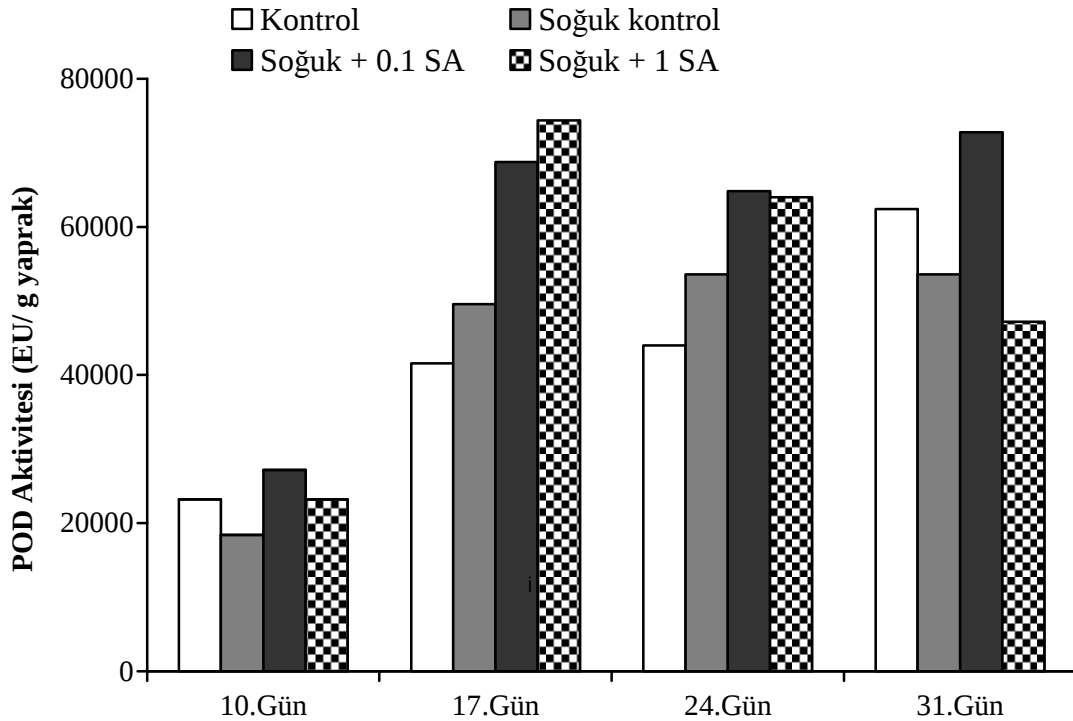
4.4.2.b. Peroksidaz aktivitesi sonuçları

Simplastik **peroksidaz (POD)** aktivitesi de, 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.21 ve Şekil 4.27). **10 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması POD aktivitesinde kontrole göre önemli derecede düşüşe sebep olmuştur. Örneğin, kontrole göre soğuk uygulamasıyla %21'lik bir düşüş kaydedilmiştir. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması da aktivitede sırasıyla %47 ve %26'lık önemli derecede bir artışa sebep olmuştur ($P<0.05$). **17 günlük** bitki yaprakları incelendiğinde soğuk uygulaması POD aktivitesinde kontrole göre önemli derecede bir artışa sebep olmuştur. Bu artış tek başına soğuk uygulamasıyla kontrole göre %19 olmuştur. Soğukla karşılaştırıldığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması da POD aktivitesini sırasıyla %38 ve %50 oranında artırmıştır ($P<0.05$). **24 günlük** yapraklarda soğuk uygulaması POD aktivitesinde kontrole artışa sebep olmuştur. Örneğin, kontrole göre bu artış soğuk muamelesiyle %21 olmuştur. Soğukla kıyaslandığında 0.1 ve 1 mM SA uygulaması aktiviteyi sırasıyla %20 ve %19 artırmıştır. **31 günlük** bitki yapraklarında da 10 günlükteki gibi soğuk uygulaması POD aktivitesini düşürmüştür. Soğuk uygulamasıyla kontrole göre %15'lik bir düşüş olmuştur. Soğukla karşılaştırıldığında ise 0.1 mM SA uygulaması aktivitede %35'lik bir artış sağlarken 1 mM SA'de ise %12'lik bir düşüş olmuştur.

Bunlara ilaveten, 10 ve 31 günlerde soğuk uygulamasıyla POD aktivitesinde düşüş 17 ve 24 günlüklerde ise artış görülmektedir. Soğukla kıyaslandığında ise tüm günlerde 0.1 mM ve 1 mM SA uygulamalarında önemli derecede bir aktivite artışı şeklinde bir paralellik göze çarpmaktadır. Tüm günlere bakıldığında zamanla POD aktivitesinde de önemli bir artış da dikkat çekmektedir. Bu sonuç, soğuğa hassas arpada (Akhisar) soğuk uygulamasıyla birlikte genelde artan POD aktivitesinin her iki konsantrasyonda da uygulanan SA ile yükseltildiğini ve bu etkinin uzun süre devam ettiğini göstermektedir (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen simplastik **peroksidaz (POD)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	23200 b	41600 d	44000 c	62400 b
Soğuk	18400 c	49600 c	53600 b	53600 c
Soğuk + 0.1 mM SA	27200 a	68800 b	64800 a	72800 a
Soğuk + 1 mM SA	23200 b	74400 a	64000 a	47200 d



Şekil 4.27. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen simplastik **peroksidaz (POD)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).

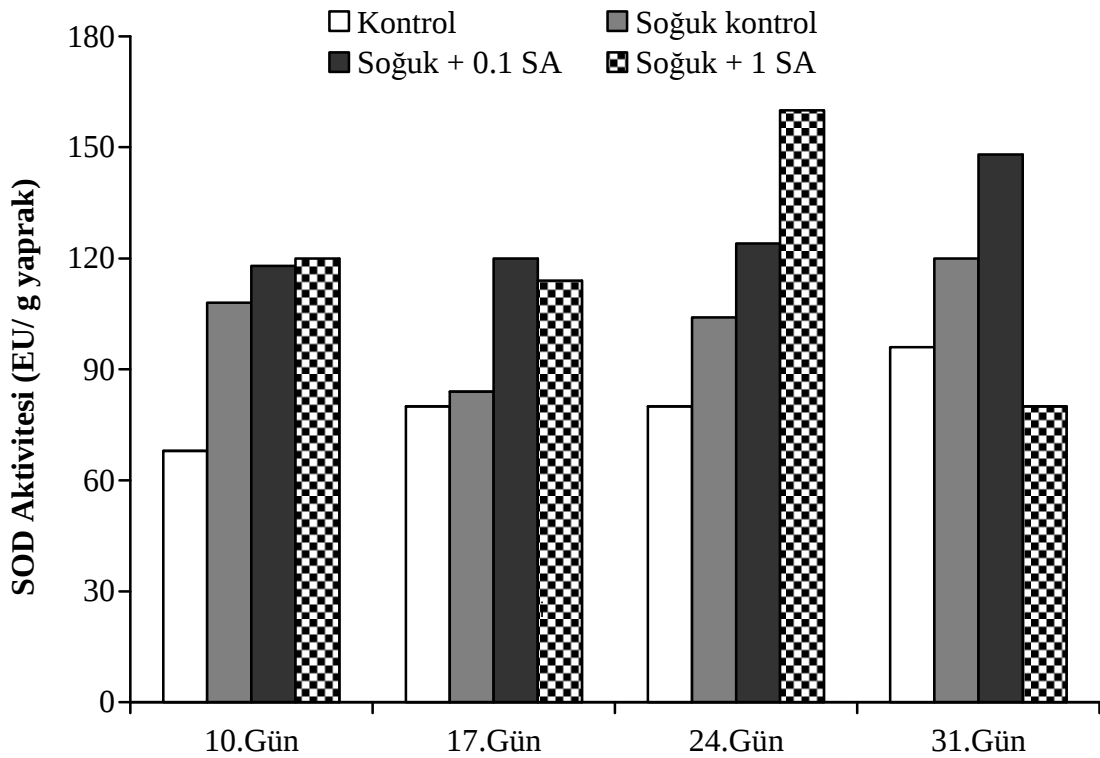
4.4.2.c. Süperoksit dismutaz aktivitesi sonuçları

Simplastik **süperoksit dismutaz (SOD)** aktivitesi de, 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.22 ve Şekil 4.28). **10 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması SOD aktivitesinde kontrole göre önemli derecede artışa sebep olmuştur. Bu artış tek başına soğuk uygulamasıyla kontrole göre %58 olmuştur. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması SOD aktivitesinde sırasıyla %9 ve %11'lik önemli derecede ($P<0.05$) bir artışa sebep olmuştur. **17 günlük** bitki yaprakları incelendiğinde soğukla uygulamasıyla SOD aktivitesinde kontrole artışa sebep olmuştur. Örneğin, kontrole göre soğuk uygulamasıyla %5'lik bir artış olmuştur ($P<0.05$). Soğukla karşılaştırıldığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması aktiviteyi sırasıyla %42 ve %35 artırmıştır. **24 günlük** yapraklarda soğuk uygulaması SOD aktivitesinde önemli derecede artış sağladığı görülmektedir. Örneğin soğuk uygulaması kontrole göre aktiviteyi %30 artırmıştır. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları aktiviteyi sırasıyla %19 ve %53 oranında artırmıştır ($P<0.05$). **31 günlük** yapraklarda da 17 günlükteki gibi soğuk uygulaması SOD aktivitesinde artışa sebep olmuştur. Tek başına soğuk uygulaması kontrole göre aktiviteyi %25 oranında artırmıştır. Soğukla karşılaştırıldığında ise 0.1 mM SA uygulaması aktivitede %23'lük bir artış sağlarken, 1 mM SA'da ise %34'lük bir düşüş gerçekleşmiştir.

Bunun yanında, 10, 17, 24 ve 31 günler arasında paralellik görülmektedir. Tüm günlerde kontrol ile karşılaştırıldığında, soğuk uygulaması SOD aktivitesini artırmıştır. 10, 17, 24 ve 31 günlük bitkilerde soğuk ile karşılaştırıldığında soğuk+SA uygulamaları her iki konsantrasyonda da (0.1 ve 1 mM SA) aktiviteyi artırmıştır. Bu sonuç, soğuğa hassas arpada (Akhisar) soğuk uygulamasıyla birlikte genelde artan SOD aktivitesinin uygulanan SA ile daha da yükseltildiğini ve bu etkinin uzun süre devam ettiğini göstermektedir (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.22. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen **simplastik süperoksit dismutaz (SOD)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	68 c	80 b	80 d	96 c
Soğuk	108 b	84 b	104 c	120 b
Soğuk + 0.1 mM SA	118 a	120 a	124 b	148 a
Soğuk + 1 mM SA	120 a	114 a	160 a	80 d



Şekil 4.28. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen **simplastik süperoksit dismutaz (SOD)** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).

4.5. Lipid Peroksidasyon Aktivitesi Sonuçları

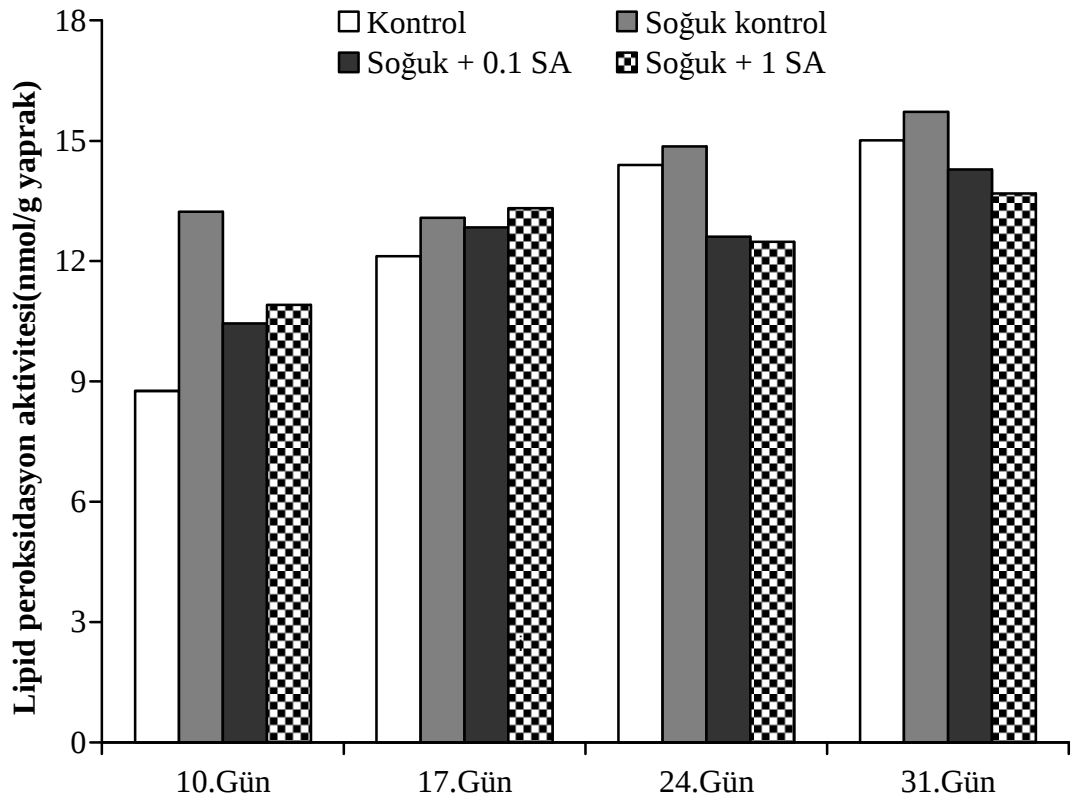
4.5.1. Soğuga dayanıklı arpa varyetesi Tokak'tan elde edilen sonuçlar

Yapraklarda **lipid peroksidasyon (LPO)** aktivitesi, 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.23 ve Şekil 4.29). **10 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması lipid peroksidasyon aktivitesini kontrole göre önemli derecede artırmıştır. Bu artış tek başına soğuk uygulamasıyla kontrole göre %51 olmuştur. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulamalarında ise LPO sırasıyla %22 ve %18 oranında düşmüştür. **17 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması LPO aktivitesinde kontrole göre önemli bir artışa sebep olmuştur ($P<0.05$). Örneğin, soğuk uygulamasıyla kontrole göre %7 artış olmuştur. Soğukla karşılaştırıldığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulamalarında ise LPO'da önemli derecede etki gözlenememiştir ($P>0.05$). **24 günlük** bitki yapraklarında LPO aktivitesinde kontrole göre soğuk uygulamasıyla bir miktar artış olmuştur. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları ise aktivitede sırasıyla %16 ve %17'lik bir düşüşe sebep olmuştur. **31 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması aktiviteyi artırmıştır. Kendi içinde değerlendirildiğinde kontrole göre soğukta uygulaması aktiviteyi %4 artırmıştır. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları LPO aktivasyonunda sırasıyla %10 ve %17 oranında düşürmüştür ($P<0.05$).

Bunlara ilaveten, 10, 17, 24 ve 31 günlerde kontrol bitkilerinde zamanla lipid peroksidasyon aktivitesinde fark edilir bir artış da dikkat çekmektedir. Ayrıca tüm günlerde soğuk uygulamasıyla birlikte LPO aktivitesinde artış, soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulamalarında ise önemli derecede bir düşüş fark edilmektedir. Bu sonuç, soğuga dayanıklı arpada (Tokak) soğukla birlikte genelde artan lipid peroksidasyon aktivitesinin her iki konsantrasyonda da (0.1 mM ve 1 mM) uygulanan SA ile azaltıldığı ve bu etkinin uzun süre devam ettiğini göstermektedir (Çizelge 4.23).

Çizelge 4.23. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarında belirlenen **lipid peroksidasyon** aktivitesi değerleri (nmol/g yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	8.76 c	12.12 b	14.39 a	15.01 a
Soğuk	13.23 a	13.08 a	14.86 a	15.72 a
Soğuk + 0.1 mM SA	10.44 b	12.84 a	12.61 b	14.28 b
Soğuk + 1 mM SA	10.91 b	13.32 a	12.48 b	13.68 c



Şekil 4.29. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarında belirlenen **lipid peroksidasyon** aktivitesi değerleri (nmol/g yaprak)

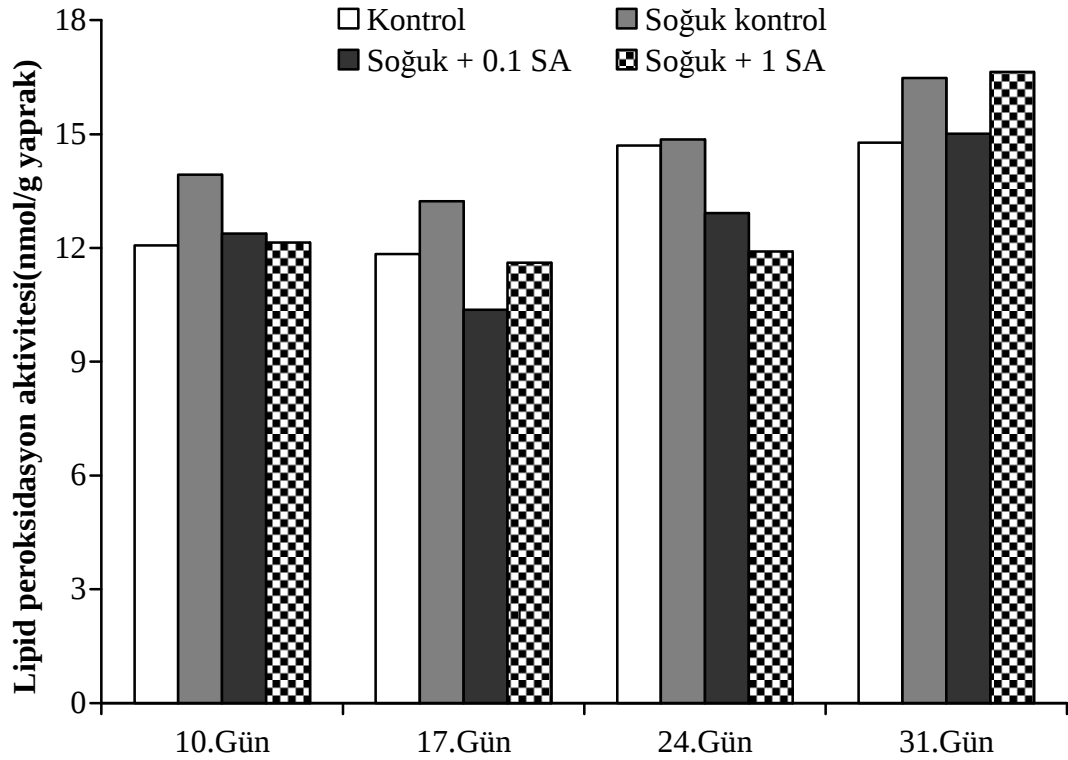
4.5.2. Soğuk hassas arpa varyetesi Akhisar'dan elde edilen sonuçlar

Yapraklarda belirlenen **lipid peroksidasyon (LPO)** aktivitesi, 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.24 ve Şekil 4.30). **10 günlük** bitki yapraklarında kontrole göre soğuk uygulamasıyla lipid peroksidasyon aktivitesinde artışa sebep olmuştur. Örneğin, tek başına soğuk uygulaması kontrole göre LPO'yu %15 oranında artırmıştır. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması ise sırasıyla %12 ve %13 düşürmüştür ($P<0.05$). **17 günlük** bitki yaprakları incelendiğinde soğuk uygulaması LPO aktivitesinde kontrole göre artış sağlamıştır. Kontrole göre bu artış soğuk uygulamasıyla %11 olmuştur. Soğukla karşılaştırıldığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları LPO'yu sırasıyla %22 ve %13 oranında düşürmüştür ($P<0.05$). **24 günlük** bitki yapraklarında tek başına soğuk uygulaması kontrole göre lipid peroksidasyon aktivitesini etkilememiştir ($P>0.05$). Soğukla kıyaslandığında 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları ise LPO aktivitesinin sırasıyla %14 ve %20 oranında düşmesine sebep olmuştur. **31 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması LPO aktivitesini artırmıştır. Bu artış tek başına soğuk uygulamasıyla kontrole göre %11 olmuştur. Soğukla karşılaştırıldığında ise 0.1 mM SA uygulaması aktivitede %10'luk düşüşe neden olurken ($P<0.05$), 1 mM SA ise önemli derecede bir etkiye sebep olmamıştır ($P>0.05$).

Bunlara ilave olarak 10, 17, 24 ve 31. günlerde kontrollerde günden güne lipid peroksidasyon aktivitesinde fark edilir bir artış da göze çarpmaktadır. Bununla birlikte tüm günlerde soğuk uygulamasıyla birlikte LPO aktivitesinde artış, soğukla kıyaslandığında ise 0.1 mM ve 1 mM SA uygulamalarında önemli derecede bir düşüş olmuştur. Bu sonuç, soğuk hassas bu arpa çeşidinde (Akhisar) soğuk uygulamasıyla birlikte artan lipid peroksidasyon aktivitesinin her iki konsantrasyonda da (0.1 ve 1 mM) uygulanan SA ile azaltıldığı ve bu etkinin de uzun süre devam ettiğini göstermektedir (Çizelge 4.24).

Çizelge 4.24. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarında belirlenen **lipid peroksidasyon** aktivitesi değerleri (nmol/g yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	12.07 b	11.84 b	14.70 a	14.78 b
Soğuk	13.93 a	13.23 a	14.86 a	16.48 a
Soğuk + 0.1 mM SA	12.38 b	10.37 c	12.92 b	15.01 b
Soğuk + 1 mM SA	12.14 b	11.61 b	11.91 c	16.64 a



Şekil 4.30. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarında belirlenen **lipid peroksidasyon** aktivitesi değerleri (nmol/g yaprak)

4.6. Hidrojen Peroksit Miktarı Sonuçları

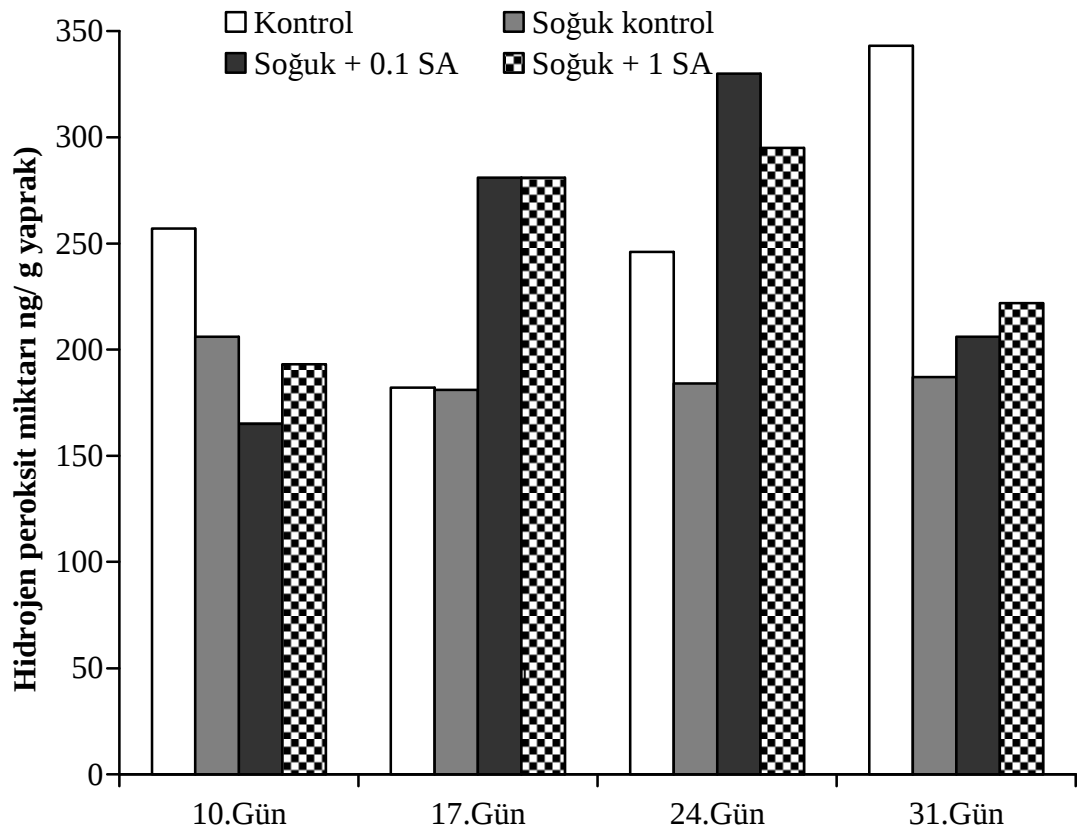
4.6.1. Soğuğa dayanıklı arpa varyetesi Tokak'tan elde edilen sonuçlar

Yapraklarda **hidrojen peroksit miktarı** 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.25 ve Şekil 4.31). **10 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması hidrojen peroksit miktarında kontrole göre önemli derecede düşüşe sebep olmuştur. Bu düşüş kontrole göre soğuk uygulamasıyla %20 olmuştur. Soğukla kıyaslandığında da 0.1 ve 1 mM SA uygulaması H_2O_2 miktarını sırasıyla %20 ve %7 oranında düşürmüştür ($P<0.05$). **17 günlük** bitki yaprakları incelendiğinde soğuk uygulaması H_2O_2 miktarını etkilememiştir ($P>0.05$). Soğukla karşılaştırıldığında 0.1 ve 1 mM SA uygulaması ise H_2O_2 miktarında %55'lik önemli derecede artışa sebep olmuştur ($P<0.05$). **24 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması H_2O_2 miktarını kontrole göre düşürmüştür. Örneğin, tek başına soğuk uygulaması kontrole göre miktarı %26 oranında düşürmüştür. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması H_2O_2 miktarında sırasıyla %79 ve %60'lık önemli derecede) bir artışa sebep olmuştur ($P<0.05$). **31 günlük** bitki yapraklarında da soğuk uygulaması H_2O_2 miktarını düşürmüştür. Bu düşüş kontrole göre soğuk uygulamasıyla %46 olmuştur. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması miktarda sırasıyla %10 ve %19'luk önemli derecede bir artışa sebep olmuştur ($P<0.01$).

Bunlara ilaveten 10, 17, 24 ve 31 günlerde kontrole göre soğuk uygulamasıyla hidrojen peroksit miktarında fark edilir bir düşüş dikkat çekmektedir. Bunun yanında 17, 24, 31 günlerde soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulamalarında önemli derecede bir artış meydana gelmiştir. Bu sonuç, soğuğa dayanıklı arpada (Tokak) soğukla birlikte genelde düşen hidrojen peroksit miktarında her iki konsantrasyonda da (0.1 ve 1 mM) uygulanan SA ile artırıldığı ve bu etkinin uzun süre devam ettiğini göstermektedir (Çizelge 4.25).

Çizelge 4.25. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarında belirlenen **hidrojen peroksit miktarı** değerleri (ng/g yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir (P>0.05).

Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	257 a	182 b	246 c	343 a
Soğuk	206 b	181 b	184 d	187 c
Soğuk + 0.1 mM SA	165 c	281 a	330 a	206 bc
Soğuk + 1 mM SA	193 b	281 a	295 b	222 b



Şekil 4.31. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarında belirlenen **hidrojen peroksit miktarı** değerleri (ng H₂O₂ /g yaprak)

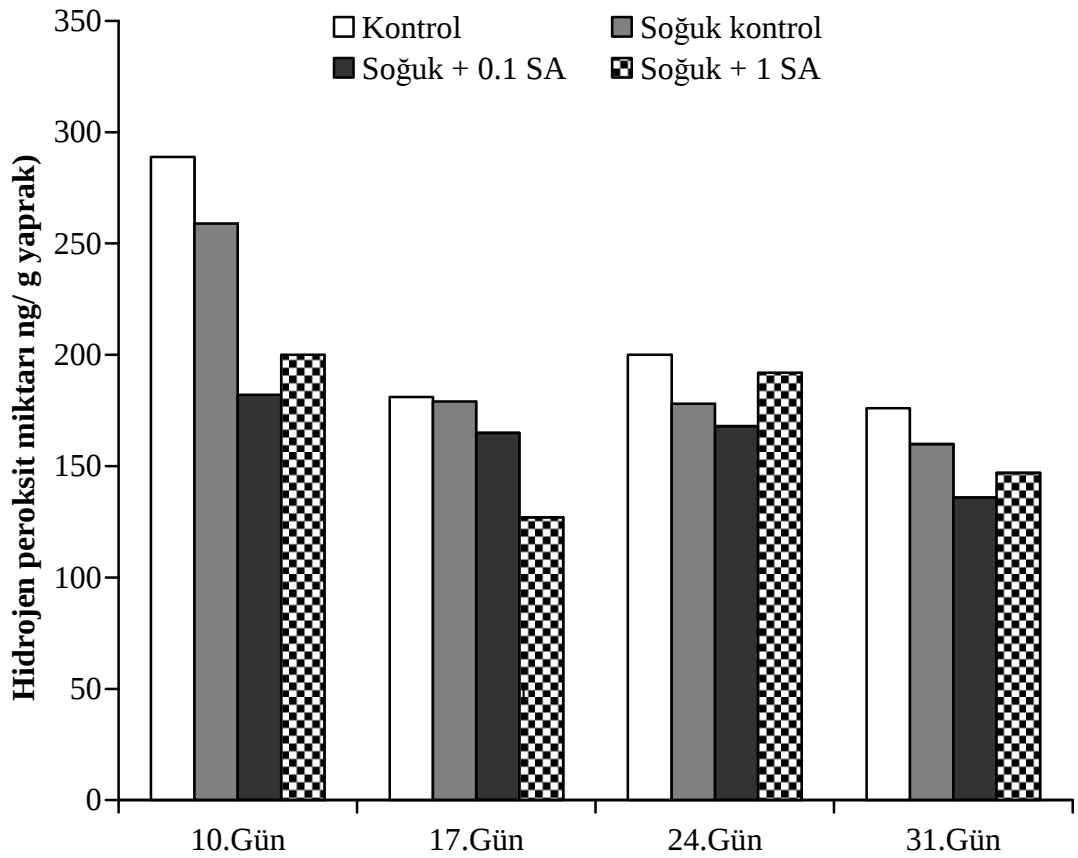
4.6.2. Soğuk hassas arpa varyetesi Akhisar'dan elde edilen sonuçlar

Yapraklarda **hidrojen peroksit miktarı** 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.26 ve Şekil 4.32). **10 günlük** bitki yapraklarında soğuk uygulaması ile H_2O_2 miktarında kontrole göre önemli derecede düşüş olmuştur. Örneğin, tek başına soğuk uygulaması kontrole göre miktarı %11 oranında düşürmüştür. Soğukla kıyaslandığında da 0.1 ve 1 mM SA uygulaması H_2O_2 miktarında sırasıyla %30 ve %23'lük düşüşe sebep olmuştur ($P<0.05$). **17 günlük** bitki yaprakları incelendiğinde soğuk uygulaması H_2O_2 miktarını önemli oranda etkilememiştir ($P>0.05$). Soğukla karşılaştırıldığında 0.1 ve 1 mM SA uygulamasıyla H_2O_2 miktarını sırasıyla %8 ve %30 oranında düşürmüştür. **24 günlük** bitki yapraklarında kontrole soğuk uygulaması H_2O_2 miktarının düşmesine neden olmuştur. Bu düşüş soğuk uygulamasıyla kontrole göre %11 oranında olmuştur. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 mM SA uygulaması H_2O_2 miktarında %6'lık düşüşe, 1 mM SA ise %7'lik bir artışa sebep olmuştur ($P<0.05$). **31 günlük** bitki yapraklarında da soğuk uygulaması H_2O_2 miktarını düşürmüştür. Örneğin kontrole göre soğukla birlikte %10'luk bir düşüş olmuştur. Soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulaması miktarda sırasıyla %15 ve %9 olarak belirlenmiştir.

Ayrıca 10, 17, 24 ve 31 günlerde kontrole göre soğuk uygulaması H_2O_2 miktarında önemli sayılabilecek bir düşüş dikkat çekmektedir. Buna ilaveten 10, 17, 24 ve 31 günlerde soğukla kıyaslandığında ise 0.1 ve 1 mM SA uygulamalarında önemli derecede bir düşüş fark edilmektedir. Bu sonuç, soğuk hassas arpada (Akhisar) soğukla birlikte düşen hidrojen peroksit miktarı her iki konsantrasyonda (0.1 ve 1 mM) uygulanan SA'nın da düşürdüğü ve bu etkinin uzun süre devam ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.26. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarında belirlenen **hidrojen peroksit miktarı** değerleri (ng H_2O_2 /g yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

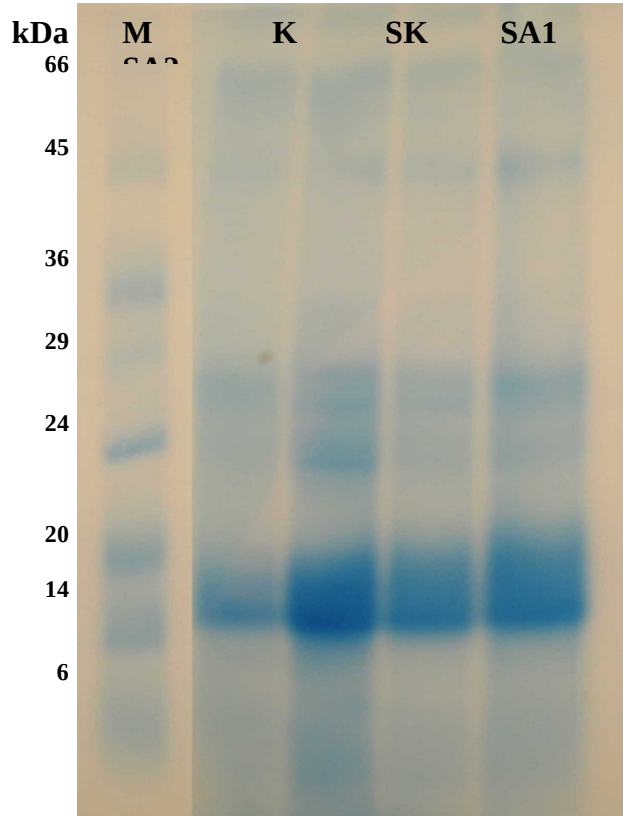
Uygulama / Kesim Günleri	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	289 a	181 a	200 a	176 a
Soğuk	259 b	179 a	178 b	160 b
Soğuk + 0.1 mM SA	182 d	165 b	168 c	136 c
Soğuk + 1 mM SA	200 c	127 c	192 ab	147 bc



Ş
ekil 4.32. 10, 17, 24 ve 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarında belirlenen **hidrojen peroksit miktarı** değerleri (ng H₂O₂ /g yaprak)

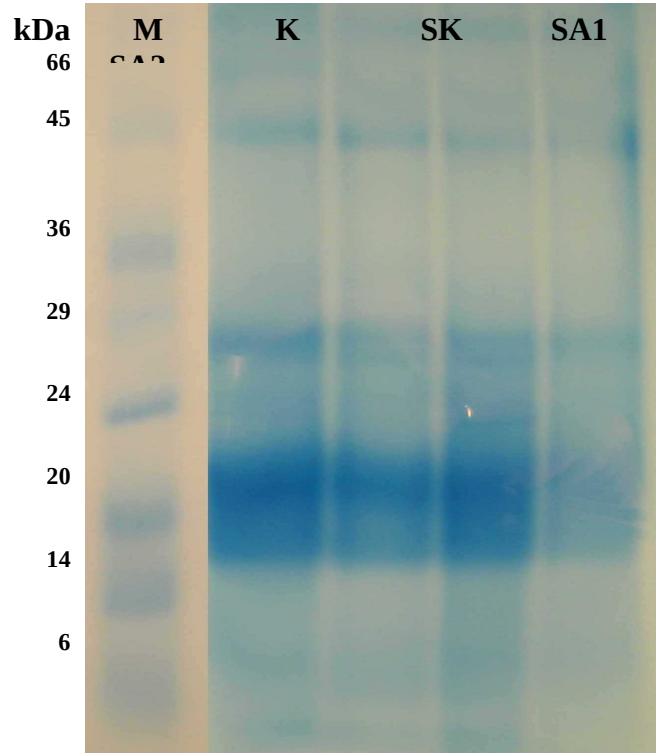
4.7. Apoplastik Proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları

4.7.1. Soğuga dayanıklı arpa varyetesi Tokak'tan elde edilen sonuçlar



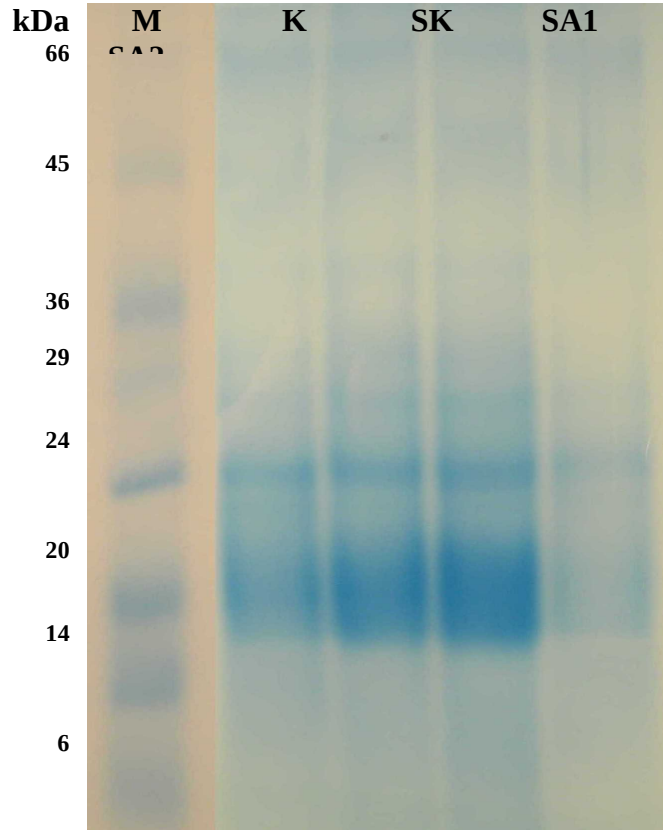
Şekil 4.33. 10 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi fotoğrafı (kDa: Kilodalton, M: Standart proteinler, K: Kontrol, SK: Soğuk Kontrol, SA1: Soğuk + 0.1 mM SA, SA2: Soğuk + 1 mM SA).

Şekil 4.33'de Tokak çeşidinde 10 günlük yapraklarının apoplastlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 14 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 14-20 kDa arasındaki polipeptidlerde önemli farklar göze çarpmaktadır. Bu bandın soğuk uygulamasıyla şiddetinin arttığı, SA uygulamalarında ise şiddetinde hafif bir azalma dikkat çekmektedir. Benzer durum 24-29 kDa aralığındaki iki bantta da görülmektedir.



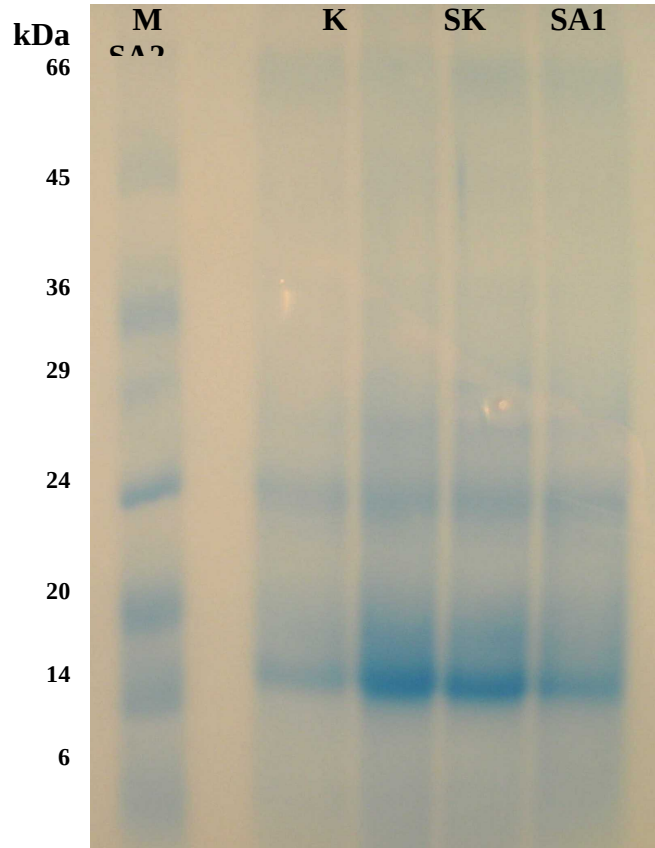
Şekil 4.34. 17 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı (**kDa**: Kilodalton, **M**: Standart proteinler, **K**: Kontrol, **SK**: Soğuk Kontrol, **SA1**: Soğuk + 0.1 mM SA, **SA2**: Soğuk + 1 mM SA).

Şekil 4.34’de Tokak çeşidinde 17 günlük yaprakların apoplastlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 14 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 14 ile 24 kDa arasındaki polipeptidlerde önemli farklar görülmektedir. Bu aralıktaki iki bandın soğuk uygulamasıyla şiddetinin hafif azaldığı, SA uygulamalarında ise 0.1 mM’da şiddetin bir miktar arttığı, 1 mM’da ise önemli miktarda azalma dikkat çekmektedir. Benzer durum 24-29 kDa aralığındaki bir bantta da görülmektedir.



Şekil 4.35. 24 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı (**kDa**: Kilodalton, **M**: Standart proteinler, **K**: Kontrol, **SK**: Soğuk Kontrol, **SA1**: Soğuk + 0.1 mM SA, **SA2**: Soğuk + 1 mM SA).

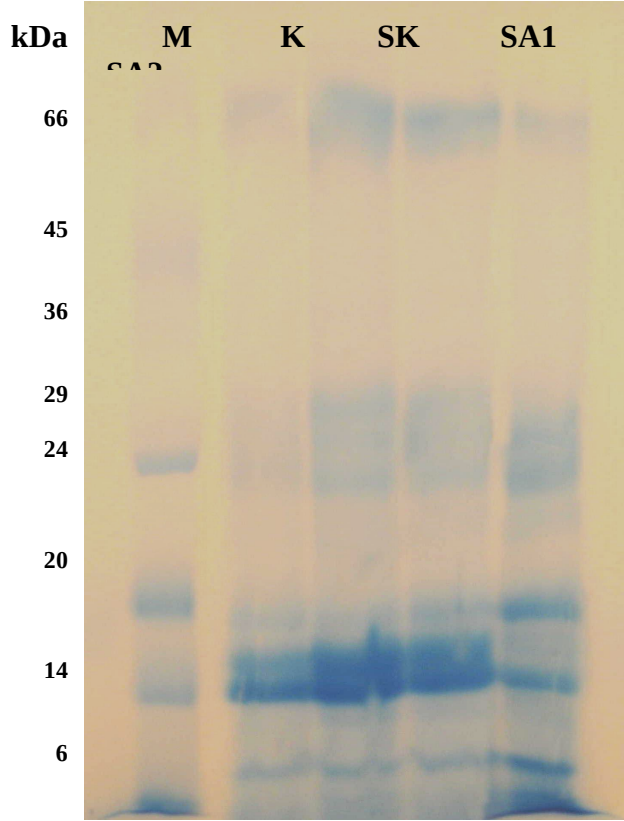
Şekil 4.35’de Tokak çeşidinde 24 günlük yaprakların apoplastlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 14 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 14 ile 24 kDa arasındaki polipeptidlerde önemli farklar görülmektedir. Bu aralıktaki iki bandın soğuk uygulamasıyla şiddetinin arttığı, SA uygulamalarında ise 0.1 mM’da şiddetin bir miktar daha arttığı 1 mM’da ise önemli miktarda azalma dikkat çekmektedir. Benzer durum yaklaşık 24 kDa civarındaki bir bantta da görülmektedir.



Şekil 4.36. 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Tokak) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı (kDa: Kilodalton, **M: Standart proteinler, **K**: Kontrol, **SK**: Soğuk Kontrol, **SA1**: Soğuk + 0.1 mM SA, **SA2**: Soğuk + 1 mM SA).**

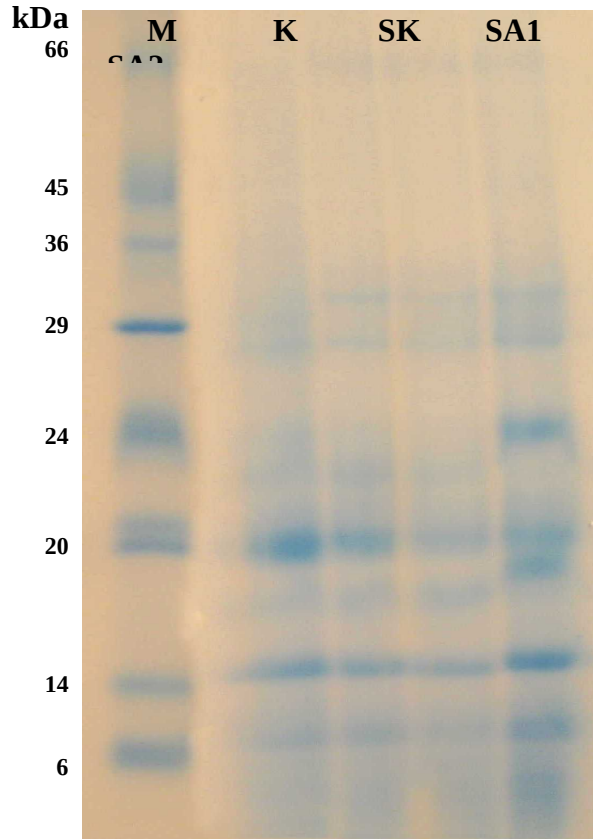
Şekil 4.36’da Tokak çeşidinde 31 günlük yaprakların apoplastlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 14 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 14 ile 20 kDa arasındaki polipeptidlerde önemli farklar görülmektedir. Bu aralıktaki iki bandın soğuk uygulamasıyla şiddetinin arttığı, SA uygulamalarında ise 0.1 mM’da şiddette bir miktar azalma, 1 mM’da ise önemli miktarda azalma dikkat çekmektedir. Benzer durum yaklaşık 24 kDa civarındaki bir bantta da görülmektedir. Dayanıklı arpadan elde edilen sonuçlara topluca bakıldığında; kontrole göre soğuk uygulaması özellikle 14-24 kDa arasındaki polipeptid miktarını artırırken SA uygulaması ise azaltmıştır.

4.7.1. Soğuga hassas arpa varyetesi Akhisar'dan elde edilen sonuçlar



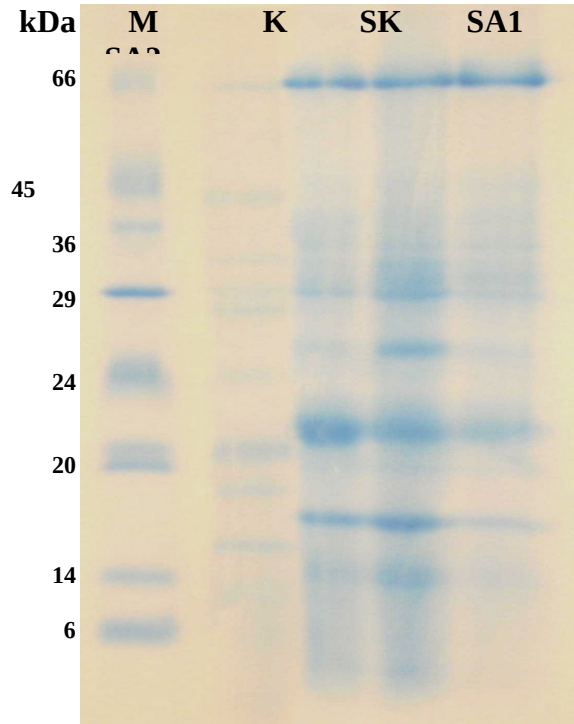
Şekil 4.37. 10 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı (kDa: Kilodalton, **M: Standart proteinler, **K**: Kontrol, **SK**: Soğuk Kontrol, **SA1**: Soğuk + 0.1 mM SA, **SA2**: Soğuk + 1 mM SA).**

Şekil 4.37'de Akhisar çeşidinde 10 günlük yaprakların apoplastlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 14-20 kDa arasındaki polipeptidlerde önemli farklar göze çarpmaktadır. Bu iki bandın soğuk uygulamasıyla şiddetinin arttığı, SA uygulamalarında ise, 0.1 mM'da şiddetin korunduğu 1mM'da ise azaldığı görülmektedir. Benzer durum 24 ve 66 kDa civarındaki iki bantta da görülmektedir. Ayrıca 1 m M SA uygulamasıyla yaklaşık 6 ile 20 kDa civarlarında iki bandın oluştuğu da göze çarpmaktadır.



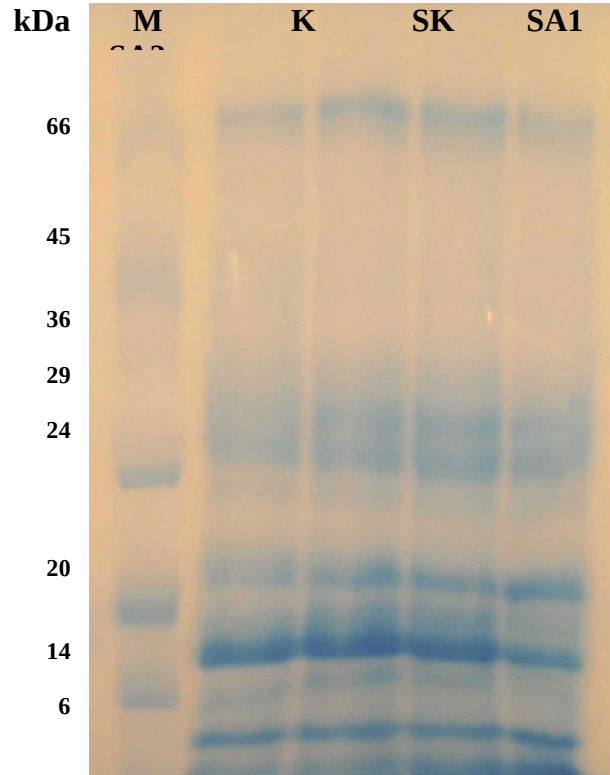
Şekil 4.38. 17 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi fotoğrafı (**kDa**: Kilodalton, **M**: Standart proteinler, **K**: Kontrol, **SK**: Soğuk Kontrol, **SA1**: Soğuk + 0.1 mM SA, **SA2**: Soğuk + 1 mM SA).

Şekil 4.38’de Akhisar çeşidinde 17 günlük yaprakların apoplastlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 14 ile 20 kDa civarındaki polipeptidlerde önemli farklar göze çarpmaktadır. Bu iki bandın soğuk uygulamasıyla şiddetinin azaldığı SA uygulamalarında ise özellikle 1mM’da bant şiddetinin arttığı görülmektedir.. Ayrıca 1 m M SA uygulamasıyla yaklaşık 4, 6, 18, 24 ile 28 kDa civarlarında beş bandın oluştuğu da görülmektedir.



Şekil 4.39. 24 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı (**kDa**: Kilodalton, **M**: Standart proteinler, **K**: Kontrol, **SK**: Soğuk Kontrol, **SA1**: Soğuk + 0.1 mM SA, **SA2**: Soğuk + 1 mM SA).

Şekil 4.39'da Akhisar çeşidinde 24 günlük yaprakların apoplastlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 14 ile 20 kDa civarındaki polipeptidlerde önemli farklar göze çarpmaktadır. Bu iki bandın soğuk uygulamasıyla şiddetinin arttığı SA uygulamalarından 0.1 mM'da bant şiddeti korunurken 1 mM'da ise azaldığı görülmektedir. Bunun yanında 66 kDa civarındaki bir bantta ise soğukla artan şiddetin SA uygulamalarında da devam ettiği dikkat çekmektedir. Ayrıca 0.1 mM SA uygulamasıyla yaklaşık 14, 24 ile 29 kDa civarlarında üç bandın oluştuğu da görülmektedir.



Şekil 4.40. 31 günlük arpa (*Hordeum vulgare* cv. Akhisar) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı (**kDa**: Kilodalton, **M**: Standart proteinler, **K**: Kontrol, **SK**: Soğuk Kontrol, **SA1**: Soğuk + 0.1 mM SA, **SA2**: Soğuk + 1 mM SA).

Şekil 4.40'da Akhisar çeşidinde 31 günlük yaprakların apoplastlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 6, 14 ile 20 kDa civarındaki polipeptidlerde belirgin bantlar göze çarpmaktadır. 14 kDa civarındaki bandın soğuk uygulamasıyla şiddetinin arttığı, SA uygulamalarından da özellikle 1 mM'da bant şiddetlerinin korunduğu görülmektedir. Benzer durum 66 kDa civarındaki bir bantta da dikkat çekmektedir. Soğuğa hassas bu arpa çeşidinde tüm günlere topluca bakıldığında, soğukla 14 ile 20 kDa civarındaki polipeptidlerin bant şiddetinin arttığı bununla birlikte SA uygulamalarında da ekstra bazı bantların oluştuğu görülmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Araştırmamızda bitki materyali olarak bölgemizde tarımı yapılan ve soğuğa kışlık buğday kadar dayanıklı olmayan arpa (*Hordeum vulgare*) bitkisi tercih edilmiştir. Çünkü bu bitkinin yöremizde kışlık ekimi ya yapılamamakta veya pek tercih edilmemektedir. Yazlık ekiminde ise kışlık ekimine göre büyük oranda bir verim düşüşü yaşanmaktadır. Kışlık ekim yapılamamasının birkaç sebebi vardır. Bunlardan en önemlisi, arpanın kışlık ekildiği Ekim-Kasım aylarında veya fidelerin geliştiği Mayıs-Haziran aylarında beklenmedik ani sıcaklık düşüşleri sonucunda büyük bir ürün kaybının yaşanmasıdır. Bu problem çerçevesinde, araştırmamızda bir hedef olarak soğuğa hassas bitkilere soğukla karşılaşmadan önce yapılacak uygulamaların, bitkiyi soğuk zararından kurtarabilme veya en az zararla atlatabilme amacı güdülmüştür. Diğer taraftan yapılacak uygulama ile alakalı olarak pratik anlamda başka bir problemle de karşılaşmaktayız. Bu da bitkiye verilecek bir maddenin, bu korumada ne kadar süre etkili olacağıdır. Çünkü iklimsel dengesizliklerin ne zaman gerçekleşeceği kesin değildir. Bitkiye uygulanan ve onu soğuktan koruyabilen bir maddenin etki süresi, birkaç gün gibi kısa ise bunun pratikte pek bir anlamı olmayacaktır. Bu nedenle bitkiye verilecek maddenin etki süresinin de belirlenmesi gerekmektedir. Literatürde salisilik asit (SA) ile ilgili bu anlamda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Birçok çalışmada dışarıdan SA uygulamasının bitkiyi birçok çevresel stresten koruyabildiği ile ilgili bilgiye rastlanılmaktadır. Bunlar kaynak özetlerinde ayrıntılı olarak verilmiştir. Ancak bu bilgiler yetersiz ve kısıtlıdır. Bu yüzden çalışmamızın sonuçları literatürdeki bilimsel bir boşluğu doldurmakla kalmamış, aynı zamanda SA'nın pratikte kullanılabilme potansiyelini de tartışmaya açmıştır.

Stres altındaki bitkilerde reaktif oksijen türlerinin (ROT) hızlı bir artışı meydana gelir ve bu reaktif bileşikler, biyolojik membranlar, nükleik asitler, proteinleri, lipidler ve diğer birçok makro ve mikro biyomolekülleri etkileyerek doğal metabolik düzenin bozulmasına sebep olurlar. Metabolizmada meydana gelen bu işlevsel bozukluk sonucunda hücre ve dokularda bozulma ve hasar oluşur, nihayetinde hasarın derecesine

göre hücrelerde ölüm de gözlenebilir. Bu yüzden stresle birlikte ROT seviyesindeki hızlı artış, antioksidan enzimler (katalaz, peroksidaz ve süperoksid dismutaz gibi) ve enzimatik olmayan antioksidanlarca (glutatyon, C ve E vitamini gibi) uzaklaştırılması veya dengelenmesi gerekir. Salisilik asit de gerek normal koşullarda gerekse stres altındaki bitkilerde, antioksidan sistemi ve bu sistemle ilgili enzimleri etkileyen önemli hücresel sinyal moleküllerden biridir (Sakhabutdinova *et al.* 2004; Hayat and Ahmad 2007). Çalışmamızda salisilik asidin arpa fidelerini soğuktan koruyabilme potansiyeli araştırılırken, koruma derecesi ve kriteri olarak literatürde en çok kullanılan parametreler seçilmiştir. Bunlardan toleransın derecesini gösterenler olarak, kontrol ve SA uygulamalı bitkiler arasında, yapraklarındaki donma hasarı, apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi, lipid peroksidasyon (MDA) derecesi ve dokularda hidrojen peroksit (bir reaktif oksijen türü) birikiminin ölçülmesi tercih edilmiştir. Ayrıca hücrelerde antioksidan kapasitenin değişimini takip etmek için de apoplastik ve simplastik antioksidan enzim (katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz) aktiviteleri ve apoplastik polipeptidlerin elektroforezi (SDS-PAGE) yapılmıştır. Diğer taraftan, çalışmamızda salisilik asidin aynı bitki türünün farklı çeşitlerinde etkisini gözlemlemek için arpanın soğuğa toleransları farklı iki çeşidi kullanılmıştır. Bunlardan Tokak çeşidi nispeten Akhisar çeşidine göre daha dayanıklı bir çeşittir. Akhisar, daha çok Orta Anadolu'da ekimi yapılan bir çeşit olmasına rağmen, Tokak Doğu Anadolu'da yaygın ekimi yapılan ve tercih edilen bir çeşittir. Aşağıda araştırmamızdan elde edilen sonuçların yorumlanması ve diğer araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırmalı değerlendirmeleri yapılmıştır.

5.1. Donma Hasarı (DH) Üzerine Düşük Sıcaklık ve Salisilik Asidin Etkileri

10, 17, 24 ve 31 günlük kontrol, düşük sıcaklık, SA'lı ve SA'sız bitki yaprakları için elde edilen maksimum DH değerleri %100 kabul edilerek, SA, düşük sıcaklık ve düşük sıcaklık+SA değerleri için %DH'ları hesaplanmıştır. Bunlardan yararlanılarak her bir durum için -10 ile -20 °C'ler arasındaki %DH'ları değerlerinin ortalamaları da hesaplanmıştır. Çalışmamızda, arpanın soğuğa dayanıklı **Tokak** çeşidinde düşük SA (0.1 mM) konsantrasyonların kısa süreli (10. ve 17. gün) ve yüksek SA konsantrasyonların (1 mM) uzun süreli (24. gün) donma hasarını azalttığı ve donma noktasını geciktirerek koruma sağladığı belirlenmiştir. Arpanın soğuğa hassas **Akhisar** çeşidinde de düşük SA konsantrasyonları 10, 17 ve 24. günlerde koruma sağlarken, 1 mM SA'nın ise tüm günlerde donma hasarını azaltmada en etkili konsantrasyon olduğu ve SA uygulandıktan sonra 21. günden 24. güne kadar soğuğa maruz kalan bitkilerde (toplam 31 gün) hala etkili olduğu da bulunmuştur.

Daha önce kışlık çavdar, kışlık buğday ve karalahana yapraklarındaki DH üzerine düşük sıcaklığın etkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda, düşük sıcaklığın DH'nda bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Marentez *et al.* 1993, Atıcı and Nalbantoğlu 1999a). Pirinç fidelerinde SA'nın hücre membranlarındaki elektrolit sızıntısını önleyerek donma toleransını sağladığı bulunmuştur (Kang and Saltveit 2002). Kışlık buğday yapraklarındaki donma hasarı üzerine hem düşük sıcaklık hem de SA muamelelerinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada düşük sıcaklıklar (15/10, 10/5 ve 5/3°C) yapraklardaki DH'nı azaltmış eksojen SA muamelesi, hem kontrol (15 ve 30 günlük) hem de düşük sıcaklık (15/10°C) şartlarında yapraklardaki DH'nda azalmaya neden olmuştur (Taşgın *et al.* 2003). Mısır, domates, muz, salatalık, fasulye ve pirinç ile yapılan çalışmalarda da benzer durum gözlenmiştir (Janda *et al.* 1999; Senaratna 2000; Ding *et al.* 2002; Bishop 2002; Kang *et al.* 2002; 2003). Tohumlarına SA emdirilmiş hibrit mısırla (*Zea mays*) yapılan bir çalışmada, SA'nın membran geçişlerini azaltarak donma hasarını engellediği bulunmuştur (Farooq *et al.* 2008). Bu çalışma ışığında, düşük sıcaklıkta sentezlenebilen endojen SA'nın yapraklardaki DH seviyesinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

5.2. Buz Nükleasyon Aktivitesi Üzerine Düşük Sıcaklık ve Salisilik Asidin Etkileri

10, 17, 24 ve 31 günlük kontrol, düşük sıcaklık, SA'lı ve SA'sız bitki yaprakları için elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivite değerlerinden normal sıcaklıkta SA uygulanmamış bitkiden elde edilen değer kontrol kabul edilerek, soğukta, 0.1 ve 1 mM SA'daki değişim belirlenmiştir (Çizelge 4.9 ve 4.10).

Çalışmamızdaki sonuçlardan; arpanın soğuğa dayanıklı **Tokak** çeşidinde kontrol ile karşılaştırıldığında soğuk 10 ve 17 günlük bitkilerde buz nükleasyon aktivitesini artmıştır. Soğuk ile soğuk+SA karşılaştırıldığında, 10, 17, 24 ve 31 günlük bitkilerde her iki SA konsantrasyonu da buz nükleasyon aktivitesini artırmış ve 0.1 mM SA'nın 1 mM'dan daha etkili olduğu belirlenmiştir. Arpanın soğuğa hassas **Akhisar** çeşidinde de kontrol ile karşılaştırıldığında, soğuk 10, 17, 24 ve 31 günlük bitkilerde buz nükleasyon aktivitesini artmıştır. Soğuk ile soğuk+SA karşılaştırıldığında, 10 ve 24 günlük bitkilerde SA uygulamaları buz nükleasyon aktivitesini artırmış ve 10 günlükte 1 mM SA'nın 24 günlükte ise 0.1 mM'nın daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Daha önceki çalışmalarda, kışlık çavdar, kışlık buğday ve kara lahana yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesine etkileri incelenmiştir. Bu bitkiler düşük sıcaklık şartlarında yetiştirildiklerinde, buz nükleasyon aktivitesinde bir artış olduğu gösterilmiştir (Hon *et al.* 1994, Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b). Kışlık buğday yapraklarındaki apoplastik proteinlerin buz nükleasyonu üzerine hem düşük sıcaklık hem de SA muamelelerinin etkileri araştırılmış ve düşük sıcaklığın etkileri artırdığı görülmüştür. Bu çalışmada ayrıca eksojen SA muamelesinin hem normal hem de düşük sıcaklık (15/10 ve 10/5 °C) şartlarındaki apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesinde önemli bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (Taşgın *et al.* 2003). Bu çalışmaları bizim çalışmamızın sonuçlarıyla birlikte değerlendirdiğimizde, eksojen SA uygulamasının ve düşük sıcaklıkta sentezlenebilen içsel SA'nın apoplastik proteinleri etkileyebildiği düşünülmektedir.

5.3. Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Düşük Sıcaklık ve Salisilik Asidin Etkileri

Çalışmamızda antioksidan enzimlerin sadece total seviyelerine bakmanın ötesinde, bunların apoplastik ve simplastik bölgelerdeki seviyeleri incelenmiştir. Çünkü son yıllarda, stres altındaki bitkilerde apoplastik bölge çok çalışılmış ve bu bölgenin streslere cevapta çok büyük bir rolünün olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Vanacker *et al.* 1998a,b; Minibaeva *et al.* 2001; Hernandez *et al.* 2001; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşgın *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2009). Çalışmalarımızda elde edilen apoplastik antioksidan enzim miktarları, totalin yaklaşık %0.1 ile %2'si arasında olmuştur. Bu sonuç başka araştırmacıların bulduğu değerlerle uyum içerisindedir (Vanacker *et al.* 1998a,b; Hernandez *et al.* 2001). Literatür verilerinde, soğuk şartlarda, salisilik asit uygulaması sonucu apoplastik ve simplastik antioksidan enzimlerle ilgili çalışmalar yetersiz ya da sınırlı olduğundan, elde ettiğimiz bulgular, genelde bu konudaki total hücresel enzim miktarlarıyla yapılmış çalışmalarla kıyaslanmıştır.

5.3.1. Apoplastik katalaz aktivitesine düşük sıcaklık ve salisilik asidin etkileri

Çalışmamızda, arpanın soğuğa dayanıklı **Tokak** çeşidinde 10 günlük yapraklarda soğuk uygulamasıyla düşen CAT aktivitesinde 17, 24 ve 31. günlerde artış olmuştur (Çizelge 4.11). Buna karşın, arpanın soğuğa hassas **Akhisar** çeşidinde sadece 17 günlük yapraklarda artan CAT aktivitesinde 10, 24, 31 günlerde ise düşüş görülmüştür (Çizelge 4.14). Soğuk şartlarda büyütülen bitkilerde apoplastik CAT aktivitesiyle ilgili literatür bilgisi yetersizdir. Kışlık buğdayla yapılan bir çalışmada düşük sıcaklık apoplastik CAT aktivitesini düşürmüştür (Taşgın *et al.* 2006). Bu çalışma bizim çalışmamızdaki hassas çeşit olan Akhisar'ın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Ancak, CAT'ın diğer streslerde nasıl değiştiği ile ilgili birkaç çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde iki domates çeşidi, patojenlerle muamele edildiğinde, apoplastik CAT aktivitesinin yükseldiği tespit edilmiştir (Vanacher *et al.* 1998; Patykowski *et al.* 2003). İki çeşit buğdayla yapılan bir başka çalışmada da tuz uygulamaları ile CAT aktivitesi artmıştır (Mutlu *et al.* 2009). Bu çalışmaların sonuçları ise bizim çalışmamızdaki dayanıklı çeşit

Tokak'tan elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir. Sonuçta CAT'ın, streslerin tipine ve derecesine göre bir davranış sergilediği görülmektedir. Bizim sonuçlarımızda soğuk uygulaması ile apoplastik CAT'ın değişmesinin nedeni, bu bölgede H₂O₂ üreten mekanizmaların çalışmasına dayandırılabilir.

Çalışmamızda soğuk+SA uygulaması soğukla kıyaslandığında, arpanın soğuğa dayanıklı **Tokak** çeşidinde 0.1 mM SA'da 24 ve 31. günlüklerde artış 10 ve 17. günlerde CAT aktivitesi düşmüştür. 1 mM SA uygulamasının ise tüm günlerde aktiviteyi düşürdüğü göze çarpmaktadır (Çizelge 4.11). Buna karşın, arpanın soğuğa hassas **Akhisar** çeşidinde soğukla kıyaslandığında ise 0.1 mM SA uygulamalarında CAT aktivitesinde artış, 1 mM SA uygulamalarında ise ya az miktarda düşüş veya etkilemediği görülmektedir (Çizelge 4.14). Bu sonuç, soğuğa hassas arpada soğukla birlikte genelde düşen CAT aktivitesinin düşük konsantrasyonda (0.1 mM) uygulanan SA ile yükseltildiğini ve bu etkinin uzun süre devam ettiğini göstermektedir. Soğukla birlikte SA uygulamasının CAT aktivitesine etkisiyle ilgili literatürde çok fazla çalışmaya rastlanılmamıştır. Kışlık buğdayla yapılan bir çalışmada, soğuk+SA uygulamasının apoplastik CAT'ı inhibe ettiğini belirtmiştir. Arpanın soğuğa dayanıklı Tokak çeşidindeki sonucumuz bu çalışma ile uyum içerisindedir. Dayanıklı arpa ile hassas arpa varyetesini bu açıdan karşılaştırdığımızda, soğuk şartlarda SA'nın CAT üzerine inhibisyon etkisi, dayanıklı varyetede daha yüksek olmuştur. Hassas varyetede ise düşük SA uygulamasının CAT aktivitesini artırdığı görülmektedir. Bunun sebebi dayanıklı çeşitte soğuk şartlarda üretilen içsel SA'nın yeterli olması, eksojen SA uygulamasının ise yüksek doz etkisi göstererek aktiviteyi düşürmesi olabilir. Benzer bir durum tuza dayanıklılığı farklı iki buğday varyetesiyle yapılan bir çalışmada da SA uygulamasının tuza hassas çeşitte daha etkili olduğu bulunmuştur (Mutlu et al. 2009).

5.3.2. Apoplastik peroksidaz aktivitesine düşük sıcaklık ve salisilik asidin etkileri

Çalışmamızda, arpanın soğuğa dayanıklı **Tokak** çeşidinin yapraklarda 10, 17, 24 ve 31 günlerde soğuk uygulamasıyla kontrole göre POD aktivitesinde artış olmuştur (Çizelge 4.12). Buna karşın, arpanın soğuğa hassas **Akhisar** çeşidinde ise soğuk uygulamasıyla 10 ve 31 günlük yapraklarda düşen POD aktivitesinde 17 ve 24 günlerde ise artış görülmüştür (Çizelge 4.15). Birçok çalışmada da stres altındaki bitkilerde apoplastik POD'un genelde arttığına dair bilgiler bulunmakla birlikte, sınırlı sayıdaki araştırmalarda düştüğü de rapor edilmiştir. Örneğin, ozon stresi apoplastik POD'u teşvik etmiştir (Ranieri *et al.* 1996). Yulaf bitkisi, fungal bir patojen ile enfekte olduğunda apoplastik POD aktivitesinin düştüğü (Vanacker *et al.* 1998), buna karşılık buğday ve arpa patojen ile enfekte edildiğinde apoplastik POD aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Bishop 2002). Başka bir çalışmada, domates bitkileri patojenle muamele edildiğinde, apoplastik POD aktivitesinin yükseldiği belirlenmiştir (Patykowski *et al.* 2003). Soğuk şartlarda büyütülen bitkilerde apoplastik POD aktivitesiyle ilgili literatür bilgisi yetersizdir. Ladin ağacı yapraklarında aylara göre apoplastik POD aktivitelere bakılmış ve havaların soğuduğu Kasım ayında apoplastta aktivitenin yükseldiği gözlenmiştir (Polle *et al.* 1994). Kışlık buğdayla yapılan bir çalışmada soğuk uygulaması apoplastik POD aktivitesini genelde artırmıştır (Taşgın *et al.* 2006). Yukarıdaki çalışmalara ait bulgular bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Bizim çalışmamızdaki dayanıklı arpa çeşidi olan Tokak'tan elde ettiğimiz sonuçlar tamamen bu çalışmalarla uyum içindeyken, dayanıksız çeşit olan Akhisar'dan elde ettiğimiz sonuçlardan 10 ve 31. günler hariç bu çalışmalarla paralellik arz etmektedir. Ayrıca tuz stresine toleransları farklı iki çeşit dut ve buğday çeşidinde tuz stresi muamelesiyle yapılan çalışmalarda ise apoplastik POD aktivitesinin tuza dayanıklı varyetede daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Sudhakar *et al.* 2001; Mutlu *et al.* 2009). Burada, soğuk stresi altında, bu strese dayanıklı arpada apoplastik POD aktivitesinin arttığı, ancak, dayanıksız buğday varyetelerinde ise kararlı bir durum sergilemediği sonucuna varılmıştır. Bu durumda çalışmamız, soğuk stresine toleransta apoplastik POD'un bir rol üstlendiğini ve stres esnasında apoplastik POD'u aktive edebilen bitkinin soğuğa dayanma kapasitesinin arttığını göstermektedir.

Soğuk şartlarda büyütülen bitkilerde apoplastik POD aktivitesi üzerine SA'nın etkisi ile ilgili kısıtlı literatür bilgisi mevcuttur. Yaralanmış buğday fidelerine SA uygulamasıyla apoplastik POD aktivitesi artmıştır (Minibaeva *et al.* 2003). Kışlık buğdayla yapılan bir çalışmada soğuk stresi+SA uygulamasının apoplastik POD'u artırdığı belirlenmiştir (Taşkın *et al.* 2006). İki çeşit buğdayla yapılan bir çalışmada tuza dayanıklı çeşitte, tuzla birlikte SA uygulaması, apoplastik POD aktivitesini artırırken tuza hassas buğdayda ise Tuz+SA uygulamalarında, POD aktivitesi kontrollerine göre önemli derecede değişmemiştir (Mutlu *et al.* 2009). Çalışmamızda, arpanın soğuğa dayanıklı **Tokak** çeşidinin yapraklarında 10, 17, 24 ve 31 günlerde soğuk kontrole göre SA uygulaması POD aktivitesini düşürürken, (Çizelge 4.12) arpanın soğuğa hassas **Akhisar** çeşidinde ise SA uygulaması POD aktivitesini artırmıştır (Çizelge 4.15). Yani SA uygulaması hassas varyetede POD aktivitesini artırırken dayanıklı varyetede de ise düşürmüştür. Bunun sebebi dayanıklı çeşitte soğuk şartlarda üretilen içsel SA'nın yeterli olması, eksojen SA uygulamasının ise yüksek doz etkisi göstererek aktiviteyi düşürmesi olabilir.

5.3.3. Apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesine düşük sıcaklık ve salisilik asidin etkileri

Çalışmamızda, arpanın soğuğa dayanıklı **Tokak** çeşidinin yapraklarında 10, 17, ve 31. günlerde soğuk uygulaması SOD aktivitesini kontrole göre düşürürken 24. günde ise artırmıştır (Çizelge 4.13). Benzer şekilde, arpanın soğuğa hassas **Akhisar** çeşidinde de soğuk uygulamasıyla tüm günlerde SOD aktivitesinde düşüş görülmüştür (Çizelge 4.21). Deneysel çalışmalar, apoplastik bölgede yerleşik SOD'un, oksidatif olaylar esnasında, hücre dış yüzeyi ve apoplastik bölgedeki O_2^- (süperoksit) ve H_2O_2 'nin temel kaynağı olduğunu göstermektedir (Ranieri *et al.* 1996, 2000). Çalışmamızdaki düşüşün sebebi soğukla beraber metabolizmanın yavaşlaması olabilir. Soğuk uygulamasıyla apoplastik SOD aktivitesinin nasıl değiştiği ile ilgili literatür bilgisi yetersizdir. Tuz stresine toleransları farklı iki çeşit bezelye (Hernandez *et al.* 2001) ve iki çeşit dutta (Sudhakar *et al.* 2001) apoplastik SOD aktivitesinin, tuza dayanıklı varyetelerde daha çok arttığı belirlenmiştir. Tuza toleransları farklı iki buğday varyetesinde de sadece tuz

muameleli bitki yapraklarındaki apoplastik SOD aktivitesinde, kontrollerine göre önemli derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (Mutlu *et al.* 2009). Sonuçta SOD'un, streslerin tipine ve derecesine göre bir davranış sergilediği görülmektedir.

Çalışmamızda, arpanın soğuğa dayanıklı **Tokak** çeşidinin yapraklarındaki SOD aktivitesinde soğuk kontrole göre SA uygulamasıyla 10 ve 24. günlerde düşüş, 17 ve 31. günlerde ise artış olmuştur (Çizelge 4.13). Arpanın soğuğa hassas **Akhisar** çeşidinde ise soğuk kontrole göre SA uygulaması (özellikle de 0,1 mM SA) SOD aktivitesini tüm günlerde artırmıştır (Çizelge 4.21). Soğuk ve SA'nın apoplastik SOD üzerine etkisiyle ilgili her hangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat tuzlu koşullarda büyütülen tuza dayanıklılığı farklı iki buğdaydan dayanıklı olanında sadece tuz uygulanmış kontrollerine göre tuz+SA uygulaması, SOD aktivitesini genelde düşürürken, hassas buğdayda SOD aktivitesi belirgin bir düzen sergilememiştir (Mutlu *et al.* 2009). Bu çalışmayı da göz önünde bulundurursak, SA her ne kadar tuz stresine maruz kalan bitkilerde antioksidan kapasitenin artmasına katkı sağlamazsa da bizim çalışmamızda gösterdiğimiz gibi soğuk şartlara maruz kalan bitkilerde bunu sağlamıştır. Özellikle de hassas arpa çeşidinde SA'nın belirgin etkisi litaretür açısından önemlidir.

5.3.4. Simplastik katalaz aktivitesine düşük sıcaklık ve salisilik asidin etkileri

Çalışmamızda, arpanın soğuğa dayanıklı **Tokak** çeşidinin yapraklarında 10, 17 ve 24. günlerde soğuk uygulaması CAT aktivitesini kontrole göre artırmış ve bu etki 31. güne kadar devam etmiştir (Çizelge 4.17). Benzer şekilde, arpanın soğuğa hassas **Akhisar** çeşidinin yapraklarında da CAT aktivitesinde 10, 17, 24 ve 31. günlerde ise artış görülmüştür (Çizelge 4.20). Bugüne kadar simplastik CAT aktivitesi ile ilgili hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Daha önce yapılan çalışmalar toplam CAT aktivitesine dayandırılmıştır. Çalışmamızla paralel sonuçları olan çalışmalar mevcuttur. Örneğin buğdayla yapılan bir diğer çalışmada soğuk muamelesiyle CAT aktivitesinde önemli bir artış tespit edilmiştir (Keleş *et al.* 2002). Soğuk şartlarda yetiştirilen salatalık ve pirinç filizlerinde CAT aktivitesindeki artışın donma toleransı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Saruyama *et al.* 1995; Kang *et al.* 2001, 2002). CAT aktivitesindeki

değişimler alp çiminde aylık olarak takip edilmiş ve havaların soğuduğu sonbahar mevsiminde aktivitenin arttığı tespit edilmiştir (Zhou and Zhao 2004). Tropikal bir bitki olan soya fasulyesi (*Glycine max*) kademeli olarak düşük sıcaklıklara maruz bırakıldığında bitkinin kök ve gövdesinde CAT aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Yadeghari *et al.* 2008). Bu çalışmaların sonuçlarının aksine CAT aktivitesinin soğuk uygulamasıyla düştüğünü tespit eden araştırmalarda mevcuttur. Buğday, arpa, çavdar ve yulaf bitkileri soğuk şartlarda büyütüldüğünde ise CAT aktivitesinin önemli derecede düştüğü belirlenmiştir (Janda *et al.* 2002, 2003). Soğuğa dayanıklı ve hassas dört farklı mandalina kültürü soğukta depolanmış, bu mandalinaların kabuklarında ve meyvelerinde CAT aktivitesine bakılmış ve hassas türlerde depolama süresince CAT aktivitesi düşerken toleranslı türlerde aktivitenin yükseldiği belirlenmiştir (Sala 1998; Sala *et al.* 2000). Ayrıca soğuk stresi birçok bitkide, özellikle soğuğa duyarlı genotiplerde, CAT aktivitesinde belirgin bir düşüşe neden olmaktadır (Lukatkin, 2002). Kışlık buğdayla yapılan bir çalışmada, soğuk simplastik CAT aktivitesini 15/10 ve 5/3°C'lerinde azaltırken 10/5°C'inde artırmıştır. Görüldüğü gibi soğuk toplam CAT aktivitesini hem azaltabilmekte hem de artırabilmektedir.

Çalışmamızda soğuk+SA uygulaması soğukla kıyaslandığında, arpanın soğuğa dayanıklı **Tokak** çeşidinde 0.1 mM ve 1 mM SA'da 10, 17 ve 24. günlerde aktivite artışına sebep olurken 31. günlüklerde aktivite düşmüştür (Çizelge 4.17). Buna karşın, arpanın soğuğa hassas **Akhisar** çeşidinde soğukla kıyaslandığında, tüm günlerde 0.1 mM SA uygulamasının soğuğa göre önemli bir aktivite düşüşüne sebep olduğu da dikkat çekmektedir (Çizelge 4.20). SA'nın simplastik CAT aktivitesi üzerine hem artırıcı hem de azaltıcı yönde sonuçları bulunan çalışmalar mevcuttur. SA uygulanmış bezelye, tütün ve mantarda SA'nın CAT aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Aebi 1974; Willekens *et al.* 1997; Martima *et al.* 1995; Srivastava *et al.* 2001). Yine, mısır fidelerine 1 mM SA uygulandığında, yapraklarda CAT aktivitesinin inhibe edildiği belirlenmiştir (Padu 1999; Horvath *et al.* 2002). Sadece SA'nın değil aynı zamanda onun türevi olan asetil-SA'nın da mısır bitkisinde CAT aktivitesinde düşüşe neden olduğu gözlenmiştir (Westhuizen *et al.* 1998). Muz bitkisinde 0.5 mM ve 1 mM SA uygulaması, CAT aktivitesinin ilk günlerde düşüşüne, ilerleyen günlerde tekrar

yükselmesine neden olmuştur (Srivastava *et al.* 2000). Arpa ile yapılan çalışmada ise SA'nın CAT aktivitesini normale göre yükselttiği görülmüştür (Souza *et al.* 2001). SA'nın birkaç bitki türünde CAT aktivitesinin temel bir bölgesini bloklamak suretiyle H₂O₂'nin birikimine neden olduğu ve bu nedenle enzimi inhibe ettiği kabul edilmektedir (Raskin, 1992a,b). Soğuk şartlarda (2.5 °C) SA uygulanmış salatalık ve mısır bitkisinde yaprak, kök ve kotiledonlarda CAT aktivitesinin kontrol değerleri ile aynı olduğu bulunmuştur (Kang *et al.* 2002). Muz bitkisi soğukta yetiştirilip SA uygulandığında, soğuk ve SA kontrole göre CAT aktivitesini düşürürken, SA soğukta CAT aktivitesini artırmıştır (Kang *et al.* 2003). Kışlık buğday yapraklarına eksojen SA uygulaması CAT aktivitesinde hem kontrol hem de düşük sıcaklık şartlarında düşüşe sebep olmuştur (Taşğın *et al.* 2006).

Ayrıca her iki varyete de (özellikle Akhisar'da) zamanla CAT aktivitesinin azalması da bitkinin günden güne streslere farklı bir mekanizma ile tepki verebildiğini gösterebilir.

5.3.5. Simplastik peroksidaz aktivitesine düşük sıcaklık ve salisilik asidin etkileri

Çalışmamızda, arpanın soğuğa dayanıklı **Tokak** çeşidinin yapraklarında 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk uygulaması kontrole göre simplastik POD aktivitesini düşürmüştür (Çizelge 4.18). Benzer şekilde, arpanın soğuğa hassas **Akhisar** çeşidinin yapraklarında da POD aktivitesinde 10 ve 31. günlerde düşüş 17 ve 24. günlerde ise artış görülmektedir (Çizelge 4.21). Dayanıklı ile hassas çeşit kıyaslandığında POD aktivitesindeki düşüş dayanıklı çeşitte daha düzenlidir. Bugüne kadar simplastik POD aktivitesi ile ilgili literatür bilgisi kısıtlıdır (Taşğın *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2009). Daha önce yapılan çalışmalar daha çok toplam POD aktivitesine dayandırılmıştır. Soğuk stresinin etkileriyle ilgili çalışmalara baktığımızda POD aktivitesinin hem arttığı hem de düştüğü çalışmalar mevcuttur. Norveç ladin ağacı -10 °C'de 45 gün maruz bakıldığında POD aktivitesinde de önemli derecede bir düşüş gözlenmiştir (Kaminska-Rozek and Pukacki 2005). Soğukta ve kontrol şartlarda depolanan elmalarda depolama sonunda POD aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir (Leja *et al.* 2003). Bu iki çalışma bizim

çalışma sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Birçok stres faktöründe olduğu gibi soğuk stresinde de POD aktivitesinin genelde artması bu enzimin stres enzimi olarak anılmasına yol açmıştır. Soğuk şartlarda yapılan bir çalışmayla POD'un serbest radikalleri tutma özelliğine sahip olduğu ortaya konmuştur (Burris 1960). Ladin ağacında aylara göre POD aktivitesi takip edilmiş ve sıcaklığın düştüğü Kasım ayında simplastta aktivitenin yükseldiği tespit edilmiştir (Polle *et al.* 1994). Buğday, arpa, çavdar ve yulaf bitkileri soğukta büyütüldüklerinde POD aktivitesinin arttığı bulunmuştur (Janda *et al.* 2003). Soğuğa dayanıklı ve hassas dört farklı mandalina kültürü soğukta depolanmış, bu mandalinaların kabuklarında ve meyvelerinde POD aktivitesine bakılmış ve hassas türlerde depolama süresince POD aktivitesi düşerken toleranslı türlerde aktivitenin yükseldiği belirlenmiştir (Sala 1998,). Papatya bitkisiyle yapılan bir çalışmada 15 °C'de depolanan bitkilerde POD aktivitesi düşükken, 5 °C'de aktivitenin arttığı tespit edilmiştir (Setha *et al.* 2000). Soğuk şartlarda yetiştirilen salatalık ve pirinç filizlerinde POD aktivitesindeki artışın donma toleransı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Saruyama *et al.* 1995; Kang *et al.* 2001; 2002). Soya fasulyesi (*Glycine max*) ile yapılan bir çalışmada kademeli olarak düşük sıcaklıklara maruz bırakıldığında bitkinin kök ve gövdesinde POD aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Yadeghari *et al.* 2008). Mercimek bitkisine soğuk stresi uygulandığında kök dokusunda POD aktivitesinde önemli bir artış kaydedilmiştir (Öktem *et al.* 2008). Çalıştığımız her iki çeşitte de aktivitenin düşmesi genele uymadığı için literatür için farklı bir bilgidir. Ayrıca her iki varyete kendi içinde değerlendirildiğinde soğuğa dayanıklı çeşitte hassasa göre daha düzgün aktivite azalması dikkat çekmektedir.

Çalışmamızda soğuk+SA uygulaması soğukla kıyaslandığında, arpanın hem soğuğa dayanıklı **Tokak** çeşidinde hem de hassas **Akhisar** 'da 0.1 mM SA ve 1 mM SA uygulamalarında 10, 17, 24 ve 31. günlerde önemli derecede bir artış göze çarpmaktadır (Çizelge 4.18 ve 4.21). SA uygulamasının her iki varyetede POD aktivitesinin artırması literatür açısından önemlidir. Mısır ve havyar bitkisinde yapılan çalışmalarda, SA uygulaması POD'un aktivitesini artırmıştır (Dat *et al.* 1998; Padu 1999; Horvath *et al.* 2002; Yee *et al.* 2002). Ancak, *Cuscuta reflexa* ve bezelye bitkisinde ise SA'nın POD aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir (Aebi 1974; Srivastava *et al.* 2001). Muz meyvesi

olgunlaşma süresince SA uygulanmış ve POD aktivitesi ilk günlerde düşmesine rağmen ilerleyen günlerde tekrar yükselmeye başladığı gözlenmiştir (Srivastava *et al.* 2000). Soğuk şartlarda SA'nın POD aktivitesi üzerine etkileriyle ilgilide birkaç çalışma mevcuttur. Soğuk şartlarda (2.5 °C) SA uygulanmış salatalık ve mısır bitkisinde yaprak, kök ve kotiledonlarda POD aktivitesinin kontrol değerleri ile aynı olduğu bulunmuştur (Kang *et al.* 2002). Muz bitkisi soğukta yetiştirilip SA uygulandığında, soğuk ve SA kontrole göre POD aktivitesini artırmıştır (Kang *et al.* 2003). Bu çalışma sonuçları bizim çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir. Soğuk stresinin bitkilerde H₂O₂ miktarını artırdığı belirlenmiştir (Saruyama and Tanida 1995, Öktem *et al.* 2008). Bilindiği gibi hücrelerde H₂O₂ artışı çok fazla hasarlara neden olacak bir moleküldür. Bu molekül, POD'ların doğal bir substratı olup hızlıca zararsızlaştırılır. Görüldüğü gibi çeşitli stresler esnasında yüksek bir POD içeriği, stresten korunma için temel bir mekanizmadır. Bitkiler arasında soğuk stresine toleranslı olan çeşitlerde POD aktivitesinin yüksek olduğunu ve soğuk stresine toleransta POD'un aktivitesini artıran SA'nın önemli bir koruyucu rolünün olduğu görülmektedir.

Ayrıca her iki varyete de (özellikle Akhisar'da) zamanla POD aktivitesinin artması da bitkinin günden güne streslere farklı bir mekanizmayla tepki vermektedir fikrini uyandırmaktadır. Çünkü POD aktivitesi artarken CAT aktivitesi azalmaktadır.

5.3.6. Simplastik Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Düşük Sıcaklık ve Salisilik Asidin Etkileri

Çalışmamızda, arpanın soğuğa dayanıklı **Tokak** çeşidinin yapraklarında 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk uygulaması kontrole göre simplastik SOD aktivitesini düşürmüştür (Çizelge 4.19). Buna karşın, arpanın soğuğa hassas **Akhisar** çeşidinin yapraklarında ise SOD aktivitesinde 10 17, 24 ve 31. günlerde ise artış görülmektedir (Çizelge 4.22). Soğuk etkisiyle SOD enziminin aktivitesi üzerine yapılmış çalışmalar da mevcuttur. Kışlık çavdarla yapılan bir çalışmada 5 haftalık soğuğa uyum süresi sonunda yapraklardaki SOD aktivitesinin kontrollere göre %408 oranında arttığı bulunmuştur (Streb *et al.* 1999). Mutant pamuk bitkisiyle yapılan bir çalışmada SOD aktivitesinin,

düşük sıcaklık uygulaması sonucu kontrole göre yaklaşık 3 kat arttığını belirlenmiştir (Kornyeyev *et al.* 2001). Kışlık buğday yapraklarında 4 haftalık soğuğa uyum boyunca MnSOD genlerinin ifadesinin artış gösterdiği belirlenmiştir (Beak and Skinner 2003). Alp çiminde aylık olarak SOD aktivitesindeki değişimler takip edilmiş ve havaların soğuduğu sonbahar mevsiminde aktivitenin arttığı tespit edilmiştir (Zhou and Zhao 2004). Norveç ladin ağacı -10 ° C gibi çok düşük sıcaklıklara 45 gün gibi uzunca bir süre maruz bakıldığında ROT miktarındaki artışa paralel olarak SOD aktivitesinde de önemli derecede bir artış görülmüştür (Kaminska-Rozek and Pukacki 2005). Soğuğa duyarlı olduğu bilinen salatalık ve pirinç bitkilerinde de uygulanan düşük sıcaklığın yapraklardaki toplam SOD aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Lee and Lee 2000; Guo *et al.*, 2006). Çalışmamızdaki hassas çeşit alan Akhisar'dan elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışma sonuçlarıyla paralellik arz etmektedir. Soğuk şartlarda SOD aktivitesinin azaldığı ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Bunlardan birinde Sibiry'a'da doğal ortamında takip edilen çamlarda (*Pinus sylvestris*) rizosfer sıcaklığının düşmesine paralel olarak diğer antioksidan enzimlerle birlikte SOD enzim kapasitesinin düştüğü ve buna mukabil dokuda oksidatif stres belirtileri görülmeye başlanmıştır (Milyutina *et al.* 2008). Bu çalışmanın sonuçları da dayanıklı çeşidimiz olan Tokak'tan elde ettiğimiz sonuçlarla örtüşmektedir. Soğuğa dayanıklı bitkilerde SOD aktivitesinin genelde düşerken hassas bitkilerde ise artması literatür açısından ilginç bir bilgidir.

Çalışmamızda soğuk+SA uygulaması soğukla kıyaslandığında, arpanın hem soğuğa dayanıklı **Tokak** çeşidinde düşük konsantrasyondaki SA (0.1 mM) aktiviteyi tüm günlerde artırırken, yüksek konsantrasyon SA (1 mM) ise aktiviteyi 10 günlüklerde bir miktar artırmış, 24 günlüklerde düşürmüş ve 17 ve 31 günlük bitkilerde her hangi bir etkiye sebep olmamıştır (Çizelge 4.19). Benzer durum arpanın hem soğuğa hassas **Akhisar**'da da görülmüştür. Her iki konsantrasyon SA (0.1 mM ve 1 mM) uygulamalarında da 10, 17, 24 ve 31. günlerde önemli derecede bir artış göze çarpmaktadır (Çizelge 4.22).

SA'nın değişik stres tiplerinde SOD üzerine etkisini inceleyen çalışmalarda, SOD aktivitesinin SA uygulamasından önemli ölçüde etkilendiğini ortaya koymuştur.

Örneğin, tuz stresi altındaki buğdaylarda hücresel SOD aktivitesinin eksogen (dışarıdan) SA uygulaması ile arttığı belirlenmiştir (Sakhabutdinova *et al.* 2004). Buna karşılık, su stresi altındaki buğdaylarda SOD aktivitesi yükselirken, SA uygulaması ile düştüğü belirlenmiştir (Singh and Usha 2003). Tuz stresi altındaki domateslerde, tuzlu koşullar içsel (endogen) SA miktarını artırmıştır. Ancak, belirli bir süre tuza aklime edilmiş domateslerde içsel SA miktarı daha düşük bulunmuştur. Aynı bitkilerde, hem tuz hem SA uygulaması, SOD aktivitesini artırmış fakat yine tuza adapte edilmiş bitkilerde SOD aktivitesi daha düşük bulunmuştur (Molina *et al.* 2002). SA'nın soğuk stresi altındaki bitkilerde SOD üzerine etkisini inceleyen çalışmalardan birinde muz fideleriyle yapılan çalışmada SOD aktivitesi düşük sıcaklık ve SA uygulamasıyla artmıştır (Kang *et al.* 2003). Çalışmamız sonuçları da bu çalışmayla örtüşmektedir. Ayrıca dayanıklı ve hassas çeşide SA uygulamasıyla SOD aktivitesindeki değişim incelendiğinde; hassas çeşitte hem düşük hem de yüksek SA konsantrasyonu SOD aktivitesini artırırken dayanıklı çeşitte sadece düşük konsantrasyon SA SOD'u artırmıştır. Yüksek konsantrasyon SA'nın SOD aktivitesini olumsuz etkilemesi içsel üretilen SA'nın yeterli olmasıyla açıklanabilir. SA'nın bir hormon olduğu düşünüldüğünde hormonların da yüksek dozda alınımı ters etki etmektedir tezini doğrular niteliktedir.

5.4. Lipid Peroksidasyon Aktivitesine Düşük Sıcaklık ve Salisilik Asidin Etkileri

Hücre zarı lipidlerinin serbest radikallerle indüklenen peroksidasyonu olarak bilinen lipid peroksidasyon aktivitesi, hücresel düzeyde stresin sebep olduğu hasarın hem derecesi hem de yansıması olduğu bilinmektedir (de Azevedo Neto *et al.* 2006). Bitkiler strese maruz kaldıklarında, doymamış yağ asitlerinin bozulmasıyla son ürün olarak oluşan malondialdehit (MDA) miktarındaki artış, hücrelerde zarların yapısal bütünlüğünün bozulduğunu gösteren iyi bir indikatördür (Posmyk *et al.* 2005). Değişik stres faktörlerinin LPO üzerine etkisiyle ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Yüksek sıcaklığa maruz bırakılmış arpa yapraklarının membran lipid peroksidasyonu aktivitesinde artış belirlenmiştir (Kappen, 1981). Bazı ağır metallerin toksik dozlarının bitkilerde lipid peroksidasyonu uyardığı tespit edilmiştir (De Vos *et al.* 1989; 1991;

Çakmak *et al.* 1991; Çınar 2005). Tuzluluğa dayanıklılığı farklı iki fasulye çeşidiyle yapılan bir çalışmada, tuz uygulamasıyla hassas varyetede daha fazla olmak üzere iki çeşitte de MDA seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Yasar *et al.* 2008). Bazı asma (*Vitis vinifera*) çeşitlerine uygulanan kuraklık stresinin lipid peroksidasyonda önemli derecede artışa sebep olmuştur (Yağmur 2008). Kuraklık stresiyile ilgili diğer bir çalışmada; iki kahve türü (*Coffea arabica* ve *C. liberica*) kuraklığa maruz bırakıldığında, orta derecedeki kuraklık şiddetinde lipid peroksidasyonu görülmezken, şiddetli kuraklık stresinde, özellikle kuraklığa daha duyarlı olan *C. arabica* türünde, MDA birikiminin daha fazla olduğu gözlenmiştir (Cai *et al.* 2005). Su stresi altında büyütülen buğday fidelerinde lipid peroksidasyonunda büyük bir artışın olduğu kaydedilmiştir (Tatar and Gevrek 2008).

Çalışmamızda soğuğa dayanıklılığı farklı iki arpa çeşidinde de (dayanıklı; **Tokak** ve hassas; **Akhisar**) 10, 17, 24 ve 31. günlerde kontrollerle kıyasladığımızda soğuk uygulamasıyla MDA seviyesinde veya lipid peroksidasyon (LPO) aktivitesinde fark edilir bir artış da dikkat çekmektedir (Çizelge 4.23 ve 4.24). Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde de LPO aktivitesinin belirlendiği çalışmalarda azda olsa mevcuttur. Düşük sıcaklık stresinden kaynaklanan oksidatif stresin hücre zarlarında lipid peroksidasyonuna neden olduğu ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Soğuk stresine maruz bırakılmış kışlık çavdar, tütün, *Arabidopsis thaliana*, ve patatesten lipid peroksidasyon ürünü olan MDA içeriğinin arttığı belirlenmiştir (Lynch and Steponkus 1987; Moon *et al.* 1995; Uemura *et al.* 1995; Lin *et al.* 2006). Nohutla yapılan bir çalışmada da soğuğa maruz kalan fidelerde MDA miktarının buna bağlı olarak da lipid peroksidasyon aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Turan 2007). Mercimek bitkisine soğuk stresi uygulandığında, kök ve gövde dokusunda MDA içeriğinde kayda değer bir artış kaydedilmiştir (Öktem *et al.* 2008). Çalışma sonuçlarımız bu çalışma sonuçlarıyla örtüşmektedir.

Ayrıca çalışmamızda kullandığımız iki arpa çeşidinde de 10, 17, 24 ve 31. günlerde soğuk kontrollerle kıyasladığımızda SA uygulamasıyla, (hem 0,1 mM hem de 1 mM SA) MDA seviyesinde bağlı olarak da lipid peroksidasyon (LPO) aktivitesinde fark

edilir bir düşüş göze çarpmaktadır (Çizelge 4.23 ve 4.24). SA'nın soğuk şartlarda LPO üzerine yapılmış çalışmalar kısıtlıdır. Değerlendirmeyi daha çok diğer streslerdeki sonuçlarla bağlantılı olarak yapacağız. *Taxus chinensis* bitkisi patojenle muamele edilmiş ve MDA seviyesinin arttığı belirlenmiş, patojenle birlikte SA uygulandığında ise MDA seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir (Yu *et al.* 2001). Bir yıllık üzüm fideleriyle yapılan bir çalışmada yapraklara püskürtülen SA'nın MDA seviyesini düşürdüğü belirlenmiştir (Wang *et al.* 2003). Su stresi altındaki iki buğday çeşidiyle yapılan bir çalışmada yapraklara püskürtülen SA'nın LPO aktivitesini düşürdüğü bulunmuştur (Agarwal *et al.* 2005). Fasulye ile yapılan çalışmada tek başına verilen SA lipid peroksidasyonunu etkilemezken, tuz verilmesiyle artan LPO miktarının SA uygulamasıyla önemli derecede düşürdüğü bulunmuştur (Palma *et al.* 2009). Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular literatürle uyum içindedir. SA'nın LPO aktivitesini düşürmesi LPO'ya sebep olan serbest radikallerin SA'nın uyardığı antioksidan enzim sistemi tarafından bertaraf edilmiş olabileceği ihtimalidir.

Bunun yanında kontrol şartlarında zamanla LPO aktivitesinin artması da dikkat çekmektedir. Her ne kadar kontrol şartlarında her hangi bir stres faktörü olmasa da LPO aktivitesinin olabileceğini gösterir. Bu durum stres şartlarının LPO üzerine etkisinin yoktan var etme şeklinde değil miktarını artırma şeklinde olduğunu gösterir.

5.5. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarına Düşük Sıcaklık ve Salisilik Asidin Etkileri

Streslerin belirlenmesinde bir biyolojik işaret olarak kullanılır hale gelen **hidrojen peroksitin (H₂O₂)** miktarına birçok stres şartında bakılmıştır (Cheeseman 2006). Serada mangrov bitkisine hidroponik ortamda tuz verildiğinde, H₂O₂ seviyesinin gram dokuda 0.067 den 0.089 µmol'a çıktığı belirlenmiştir (Parida and Das 2005). Sera şartlarında ozon stresiyle muamele edilen bir bitkide H₂O₂ seviyesinin gram dokuda 0,03 µmol'dan 0.06 µmol'a çıktığı ve özellikle de kloroplastlarda birikiminin olduğu tespit edilmiştir (Chen and Gallie, 2004; 2005). Tütünle yapılan bir çalışmada normal şartlarda yapraklarının gram dokusunda 0.15 µmol olan H₂O₂ seviyesi *Botrytis cinerea* patojeni ile muamele edilmesiyle 0.2 µmol'a yükseldiği gösterilmiştir (Patykowski and

Urbanek 2003). Kadife çiçeği (*Calendula officinalis*) tuz stresine (100 mM) maruz bırakıldığında H_2O_2 seviyesinin normale göre %26 arttığı gösterilmiştir (Chaparzadeh *et al.* 2004). *Phragmites australis* bitkisi kısa süreli yüksek sıcaklık (38 °C) stresine maruz bırakıldığında H_2O_2 miktarında önemli bir artış belirlenmiştir (Velikova and Loreto 2005). Su stresine maruz bırakılan bezelye bitkisinde yapraklarda doku hasarıyla birlikte H_2O_2 miktarında da büyük bir artış rapor edilmiştir (Kocsy *et al.* 2005).

Çalışmamızda soğuğa dayanıklılığı farklı iki arpa çeşidinde de (dayanıklı; **Tokak** ve hassas; **Akhisar**) 10, 17, 24 ve 31. günlerde kontrollerle kıyasladığımızda soğuk uygulaması H_2O_2 miktarında önemli bir miktarda düşüş görülmüştür (Çizelge 4.25 ve 4.26). Soğuk uygulamasıyla H_2O_2 miktarındaki değişimlerin araştırıldığı birçok araştırma mevcuttur. Arpayla yapılan bir çalışmada ise soğuk stresi etkisi ile H_2O_2 üretiminin önemli miktarda azaldığı görülmüştür. Bu durumun sebebinin tüm metabolizmanın yavaşlaması olabileceğini savunan bazı araştırmacılar mevcuttur (Saruyama and Tanida 1995). Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. Soğuk stresine maruz bırakılmış başka bitkilerle yapılan çalışmalarda H_2O_2 miktarında artmanın olduğu da rapor edilmiştir. Norveç ladin ağacı -10 ° C gibi çok düşük sıcaklıklara 45 gün gibi uzunca bir süre maruz bakıldığında ROT üretimindeki artışla birlikte H_2O_2 miktarında da önemli derecede bir artış görülmüştür (Kaminska-Rozek and Pukacki 2005). Mercimek bitkisine ise soğuk stresi uygulandığında, gövde dokusunda H_2O_2 içeriğinin önemli bir şekilde arttığı gözlenmiştir (Öktem *et al.* 2008).

Çalışmamızda soğuk+SA uygulaması soğukla kıyaslandığında, arpanın soğuğa dayanıklı **Tokak** çeşidinde SA H_2O_2 miktarını artırmıştır (Çizelge 4.25). Buna karşılık, arpanın soğuğa hassas **Akhisar** çeşidinde ise SA uygulamasıyla H_2O_2 miktarında azalma görülmüştür (Çizelge 4.26). SA'nın bitkilerdeki hücresel H_2O_2 miktarı üzerine yapılmış çalışmalarla ilgili kısıtlı literatür mevcuttur. Tütünle yapılan bir çalışmada, SA uygulamasından 24 saat sonra içsel H_2O_2 miktarı gram dokuda 0.15'den 0.25 μmol 'a yükseldiği tespit edilmiştir (Patykowski and Urbanek 2003). Bu çalışmanın sonuçları dayanıklı çeşit olan Tokak'tan elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir.

Diğer bir çalışmada ise su stresi altındaki iki buğday çeşidinde yapraklara püskürtülen SA'nın H₂O₂ miktarını kontrol bitkisine göre düşürdüğü bulunmuştur (Agarwal *et al.* 2005). Bu çalışmanın sonuçları ise hassas çeşidimiz olan Akhisar'dan elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. SA'nın özellikle hassas çeşitte H₂O₂ miktarını düşürmesi SA'nın bu serbest radikali ortadan kaldıran mekanizmaları aktive etmesiyle ilgili olabilir.

5.6. SDS-PAGE Elektroforezi Üzerine Düşük Sıcaklık ve Salisilik Asidin Etkileri

Bir bitkinin soğuğa aklimasyonu sırasında üretebildiği antifriz proteinlerle (AFP) bir bakıma onun soğuğa dayanıklılığının bir göstergesidir. Son yıllarda kışlık ve yazlık çavdar, kışlık ve yazlık buğday, kışlık ve yazlık kanola, arpa, bezelye, lahana, mısır, ıspanak, havuç, *Ammopiptanthus mongolicus*, *Solanum dulcamara*, *Lolium perenne* ve tütün gibi bitkilerin soğuğa dirençli olanlarında antifriz özelliğinde birçok polipeptidin varlığı gösterilmiştir (Griffith *et al.* 1992, 1997; Marentez *et al.* 1993; Hon *et al.* 1994; Antikainen and Griffith 1997; Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b; Mayer *et al.* 1999; Fletcher *et al.* 1999; Huang-Duman 2002; Pudney *et al.* 2003; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşkın *et al.* 2006).

Antifriz aktivitesi kanıtlanan bitki proteinleri, *S. dulcamara*, 67 kDa (Duman *et al.* 1994), kışlık çavdar 11-37 kDa (Hon *et al.* 1994,1995), çiçek 66 kDa (Huang and Duman 1995), şeftali 60 kDa (Wisniewski *et al.* 1999), havuç 36 kDa (Worrall *et al.* 1998, Smallwood *et al.* 1999), kışlık buğday 12-39 kDa (Chun *et al.* 1998; Atıcı and Nalbantoğlu 1999b), *Arachis hypogaea* 33 kDa (Dave and Mitra 1998), *Picea abies* 70 kDa (Sabala *et al.* 1996), *Rhodiola algida* 29-85 kDa (Lu *et al.* 1998; 2000) ve *L. perenne* 29 kDa (Pudney *et al.* 2000) gibi bitkilerden izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Kışlık çavdardaki AFP'ler Griffith ve arkadaşları tarafından ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır (Griffith *et al.* 1992, 1997; Griffith and McIntyre 1993; Hon *et al.* 1994, 1995; Antikainen 1996; Griffith and Antikainen 1996; Antikainen and Griffith 1997; Yu and Griffith 1999, 2001). Soğuğa aklime edilmiş kışlık çavdar yapraklarından elde edilen apoplastik ekstraktların SDS-PAGE'si sonunda 7 tane farklı molekül

ağırlığına sahip polipeptid gözlenmiştir. Bunlar 16-37 kDa arasında değişen ve antifriz aktivite gösteren apoplastik polipeptidlerdir (Hon *et al.* 1994). Kışlık çavdar ile ilgili başka bir çalışmada da apoplastik AFP'leri karakterize edilmiştir (Yu and Griffith 1999). Bunlar doğal elektroforezle 9 banda ayrılmıştır. AFP komplekslerinin tek bir polipeptitten daha etkili bir şekilde buz büyümesini inhibe ettikleri gözlenmiştir (Yu and Griffith 1999). Kışlık buğday yaprağına ait apoplastik proteinler SDS-PAGE'de yürütüldüğünde, soğuk şartlarında polipeptidlerin band şiddetinin arttığı gözlenmiştir (Atıcı and Nalbantoğlu 1999b; Taşgın *et al.* 2006). Çalışmamız sırasında arpanın soğuğa dayanıklı (Tokak) çeşidinden elde ettiğimiz apoplast polipeptidlerin elektroforez bantlarına baktığımızda, özellikle molekül ağırlığı 14-24 kDa arasında olan bantların şiddetinde belirgin değişimler gözlenmiştir. Arpanın hassas (Akhisar) çeşidinde ise 14 kDa civarında bir bantta değişimler görülmektedir. Soğuk uygulamalarında bu bantların şiddetinde meydana gelen değişimler, bu bantların antifriz proteinlere ait olabileceğini göstermiştir. Tokak'ta soğuk uygulamasıyla 10, 24 ve 31. gün bitkilerden elde edilen elektroforez bantlarında şiddetin arttığı da görülmüştür. Diğer çalışmalarda da düşük molekül ağırlıklı polipeptidler antifriz protein olarak tanımlanmış olduğundan bu bantların AFP'lere ait olduğunu söyleyebiliriz.

Son yıllarda kışlık çavdar yapraklarında antifriz aktivitenin düzenlenmesi yaprakların etilen, SA, ABA ve kuraklığa maruz bırakılmasıyla incelenmiştir (Yu and Griffith 2001, Yu *et al.* 2001). SA ve ABA ile muamele edildiğinde çavdar yapraklarında antifriz aktivite göstermeyen apoplastik proteinler birikmiştir (Yu and Griffith 2001, Yu *et al.* 2001). Kışlık buğdayda yapılan bir çalışmada yaprakların apoplastik bölgelerinde düşük sıcaklıkta SA muamelesinin mevcut protein miktarlarında ve bant sayısında artışa neden olduğu ve ekstra polipeptitlerin oluşmasını sağladığı gösterilmiştir (Taşgın *et al.* 2006). Çalışmamızda SA uygulamasının Tokak'ta herhangi bir bant sayısı ve şiddetine katkısı görülmezken Akhisar'da ise 10, 17 ve 24. günlerde molekül ağırlığı 24 kDa civarında olan bir bandın oluştuğu görülmüştür. Bu bandın SA uygulamasıyla sentezi teşvik edilen bir antifriz proteine ait olması muhtemeldir.

Bu araştırmadan elde edilen önemli sonuçlar ve öneriler:

SA uygulaması her iki bitkide özellikle de hassas çeşitte (Akhisar) donma hasarını düşürerek bitkinin soğuğa uyumunu artırmıştır.

Soğuk uygulamasıyla artan buz nükleasyon aktivitesinin SA uygulamasıyla daha da artması, SA'nın buz oluşumunu geciktirici mekanizmaları aktive etmesiyle ilgili olabilir.

Dayanıklı çeşitte soğuk uygulamasıyla apoplastik CAT ve POD aktivitesi artarken hassas çeşitte düşmüştür. SA uygulaması ise dayanıklı çeşitte CAT, POD ve SOD aktivitesini düşürürken hassas çeşitte artırmıştır. Bu sonuç soğuk şartlarda dayanıklı çeşidin antioksidan enzimlerini kendi içsel SA'sı ile yükseltebildiğini hassas çeşidin ise bunu ancak dışsal SA uygulamasıyla başarabildiğini göstermesi bakımından önemlidir. SA bu açıdan dayanıklı çeşitte yüksek doz etkisi yapmış olabilir.

Tüm streslerde miktarı artan ve stresin bir ölçütü olarak kullanılan lipid peroksidasyonun (LPO) soğuk uygulamasıyla artması ve SA uygulamalarında ise miktarının düşmesi SA'nın soğuk stresinin yıkıcı etkisini düşürerek bitkinin soğuk şartlara uyumunda etkili olduğu tezini desteklemektedir.

Zararlı bir serbest radikal olan ve genelde stres şartlarında miktarı artan H_2O_2 'nin soğuk etkisiyle her iki çeşitte de miktarının düşmesi literatür açısından ilginç bir bilgi olacaktır. SA uygulamasıyla dayanıklı çeşitte miktarının artması hassas çeşitte ise miktarının düşmeye devam etmesi 'içsel SA'nın bu işte rolü var mıdır?' sorusunu akla getirmektedir.

Soğuk etkisiyle SDS-PAGE'de özellikle dayanıklı çeşitte (Tokak) bant şiddetinin artması bu bitkinin soğuk şartlarda apoplastik bölgede bazı proteinlerin miktarını artırabildiğini gösterir. SA'nın ise özellikle hassas çeşitte bazı bantların şiddetinin artmasını ve bazı yeni bantların oluşmasını sağlaması bitkinin soğuğa uyumunda etkili olduğunun bir diğer göstergesidir.

SA'nın tüm parametrelerdeki etkisinin 31. gün bile devam ettiği görülmektedir. Bu da soğuk şartlara karşı SA'nın koruyucu etkisinin uzun bir süre devam ettiğini göstermesi bakımından önemlidir. Bu sonuç da pratik anlamda SA'nın kullanılabileceği görüşünü desteklemekte ve tarla şartlarının araştırılmasının gerekliliğini göstermektedir .

SA'nın arpanın soğuğa dayanıklılıkları farklı bu iki çeşidinde meydana getirdiği fizyolojik tepkilerin daha iyi anlaşılabilmesi için içsel SA'nın da bu süreçte nasıl değiştiğinin belirlenmesi gerekmektedir.

Bu iki arpanın soğuğa dirençlerinin neden farklı olduğunun ve SA muamelesine neden farklı fizyolojik tepkiler oluşturdıklarının ortaya konmasında her ne kadar içsel SA'nın belirlenmesinin gerekliliği kadar, soğuk şartlarda ve SA uygulamasıyla sergiledikleri fizyolojik davranışların yorumlanabilmesine ve bu iş üzerinde kafa yoran bilim insanlarının gayretlerine bağlıdır.

KAYNAKLAR

- Aebi, H., 1974. Catalase, in: H.U. Bergmeyer (Ed), Methods of enzymatic analysis, Varley, Chemie/ Academic Pres, 680 p, Weinheim/ New York.
- Agarwal, S. and Pandey V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 48(4), 555-560.
- Agarwal, S., Sairam R.K., Srivastava G.C. and Meena R.C., 2005. Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 49(4), 541-550.
- Akkus, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkiler, Mimoza Yayınları, Konya.
- Ananieva, E.A., Alexieva V.S., Popova L.P., 2002. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *J. Plant Physiol.*, (159), 685-693.
- Ananieva, E.A., Christov K.N. and Popova L.P., 2004. Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. *Journal of Plant Physiology*, (161), 319-328.
- Angelini, R. and Federico R., 1989. Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *J. Plant Physiol.*, (135), 212-217.
- Angelini, R., Manes F. and Federico R., 1990. Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon deetilation and wounding in chick-pea. *Planta*, (182), 89-96.
- Antikainen, M., 1996. Cold Acclimation in Winter Rye (*Secale cereale* L.): identification and characterization of protein involved in freezing tolerance. *Painasolama OY. Turku*.
- Antikainen, M. and Griffith M., 1997. Antifreeze proteins accumulation in freezing tolerant cereals. *Physiol. Plant.* 99, 423-432.
- Atıcı, Ö. and Nalbantoğlu B., 2003. Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry*, (64), 1187-1196
- Atıcı, Ö. and Nalbantoğlu B. 1999b. Apoplastic proteins associated with the cold acclimation process in leaves. *Bio-Sci. Res. Bull*, (15), 55-60.
- Atıcı, Ö., Nalbantoğlu B., 1999a. Effect of apoplastic proteins on freezing tolerance in leaves. *Phytochemistry*, (50), 755-761.
- Augustin, W., Wiswedel I., Noack H., Reinheckel T. and Reichelt O., 1997. Role of endogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria, *Molecular and cellular biochemistry*, (174), 199-205.
- Badger M, Andrews T, Calvin D, Lorimer G., 1980. Interactions of hydrogen peroxide with ribulose biphosphate carboxylase oxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, (25), 7870-7875.
- Baet, S.H., Kwan I.S., Part T.I., Yun S.J., Kim J.K. and Chai K.G., 2000. Activities and isozyme profiles of antioxidant enzymes in intercellular compartment of overwintering barley leaves. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 33(5), 385-390.

- Bakardjieva, N., and Christov K., 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from moses (*Mnium* sp.) and ferns (*Polydium vulgare*) to high temperature. *Can. J. Bot.*, (74), 1665-1670.
- Banci, L., 1997. Structural properties of peroxidase. *J. Biotech.*, (53), 253-263.
- Beak, K.-H. and Skinner D. Z., 2003. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Science*, (165), 1221-1227.
- Bergmeyer, J. and Grabl M., 1983. *Methods of Enzymatik Analysis* (Third Edition), pp.190-302, Germany.
- Bhattacharya, J., GhoshDastidar K., Chatterjee A., Majee M., Majumder A.L., 2004. *Synechocystis* Fe superoxide dismutase gene confers oxidative stress tolerance to *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (316), 540–544.
- Bidwell, R.G.S., 1974. *Plant Physiology*, Giles, McMillan Co., New York.
- Bishop, D.L., 2002. Gene expression of vakuolar peroxidase with stress-induced pathogenesis in wheat sheats. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, (61), 65-71.
- Blum, A., 1986. *Plant Breeding for Stress Environments*, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Boeuf, G., Legnard B. and Rambour S., 1999. Influence of light conditions on development, apoplastic peroxidase activities and peroxidase activities and peroxidase isoenzymes in chicory root explants. *Physiol. Plant*, (106), 331-336.
- Boeuf, G., Legnard B. and Rambour S., 2001. Effect of NAA on the development, apoplastic peroxidase activities, and peroxidase isoenzymes in chicory root explants. *J. Plant Physiol*, (158), 963-969.
- Bor, M., Özdemir F. and Türkan I., 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science*, (164), 77-84.
- Brennan, T., Frenkel C., 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiology*, (59), 411–416.
- Brush, R.A., Griffith M., Mlynarz A., 1994. Characterization and quantification of intrinsic ice nucleators in winter rye (*Scale cereale*) leaves. *Plant Physiol.*, (104), 725-735.
- Burke, M.J. and Lindow S.E., 1990. Surface properties and size of the ice nucleation active bacteria. *Cryobiology*, (27), 80-84.
- Burke, R.A., Gutsa L.V., Quamme H.A., Weiser C.J. and Li P.H., 1976. Freezing and injury in plant. *Annu. Rev. Plant physiol.*, (27), 507-528.
- Burris, R.H., 1960. Hydroperoxidase (peroxidase and catalase). In: Ruhland W.ed. *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. 12. Berlin, Springer-Verlag, 365-400.
- Cai, Z.Q., Chen Y.J., Guo Y.H. and Cao K.F., 2005. Responses of two field-grown coffee species to drought and re-hydration. *Photosynthetica*, 43 (2), 187-193.
- Chanda, S.V. and Singh Y.D., 1997. Changes in peroxidase and IAA oxidase activities during wheat grain development. *Plant Physiol. Biochem.*, (35), 245-250.
- Chang, M.Y., Chen, S.L., Lee C.F., and Chen Y.M., 2001. Cold acclimation and root temperature protection from chilling injury in chilling-sensitive mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42:53, 60.
- Chaparzadeh, N., D'Amico M.L., Khavari-Nejad R.A., Izzo R. and Navari-Izzo F., 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, (42), 695–701.

- Chaudiere, J. and Ferrari-Iliou R., 1999. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem. Toxicol.*, (37), 949-962.
- Cheeseman, J. M., 2006. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *Journal of Experimental Botany*, (57), 10, 2435-2444.
- Chen Z, Gallie D., 2004. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *The Plant Cell*, (16), 1143-1162.
- Chen, Z., Silva H., Klessig D., 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance induced by salicylic acid. *Science*, (262), 1883-1886.
- Chikov, V.I. and Bakirova G.G., 2004. Role of apoplast in the control of assimilate transport, photosynthesis, and plant productivity. *Rus. J. of Plant Physiology*, 51(3), 420-431.
- Chun, J.U., Yu X.-M., Griffith M., 1998. Genetic studies of antifreeze proteins and their correlation with winter survival in wheat. *Euphytica* 102, 219-236.
- Cleland, F.C. and Ajami A., 1974. Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honey dew as being salicylic acid. *Plant Physiol.*, (54), 904-906.
- Close, T.J., 1997. Dehydrins: a commonality in response of plants to dehydrations and low temperature. *Physiol. Plant.* 100, 291-296.
- Cloutier, Y., 1983. Changes in electrophoretic patterns of the soluble proteins of winter wheat and rye following cold acclimation and desiccation stress. *Plant Physiol.* 1, 400-403.
- Çakmak, I. and Horst W. J., 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*), *Physiologia Plantarum*, (83), 463-468.
- Çınar, S., 2005. Mangan ve Demir Stresi Uygulanmış Roka (*Eruca sativa*) Bitkisinde Bazı Antioksidan Enzim Aktivitesindeki ve Lipid Peroksidasyon Düzeylerindeki Değişiminin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Dat, J.F., Foyer C.H., and Scott I.M., 1998. Changes in salicylic acid antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiol.* 118, 1455-1461.
- Dat, J.F., Lopez-Delgado H., Foyer C.H., and Scott I.M., 1998. Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol.* 116:1351-1357.
- Dave, R.S., and Mitra R.K., 1998. A low temperature induced apoplastic protein isolated from *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry*. 49, 2207-2213.
- De Azevedo Neto, A.D., Prisco J.T., Enéas-Filho J., de Abreu C.E.B., Gomes-Filho E., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes, *Environ. Exp. Bot.*, (56), 87-94.
- De Vos, C.H.R., Schat H., Waal M. A. M., Vooijs R. and Ernst W.H.O., 1991. Increased resistance to copper induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*, *Physiol. Plant.*, (82), 523-528.
- De Vos, C.H.R., Vooijs R., Schat H. and Ernst W.H.O., 1989. Copper induced damage to permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*, (135), 165-169.
- DeVries, A.L., 1983. Antifreeze peptides and glycopeptides in cold-water fishes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, (45), 245-260.

- Ding, CK., Wang C.Y., Gross KC. and Smith D.L., 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of parhogenesis-related-protein genes and increases resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* (214), 895-901.
- Doğru, A., 2006. Kolza (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*)’nın Bazı Kışlık Çeşitlerinde Düşük Sıcaklık Toleransı ile İlgili Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametrelerin Araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Duman, J.G., DeVries A.L., 1974. Freezing resistance in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Nature*, (247), 237-238.
- Duman, J.G., Xu L.G., Trusman D. and Wu D.W. 1991. Hemolymph protein involved in insect subzero-temperature tolerance: İce nucleators and antifreeze proteins. In RE Lee J.R., Denlinger D.1L., eds. *Insects at low temperature*. Chapman and Hall, New York, pp. 94-27.
- Duman, J.G., 1994. Purification and characterization of thermal hysteresis protein from plant, bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. *Biochim. Biophys. Acta* 1206, 129-135.
- Duran-Caril, M.V. and Bujan C.R., 1998. Antioxidant system in the leaf apoplast compartment of *Pinus pinaster* Ait. and *Pinus radiata* D. Don plants exposed to SO₂. *Annal. of App. Biology*, 133(3), 455-466.
- Durner, J., Shah J., and Klessig D.F., 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends İn Plant Science*, 2(7), 266-274.
- Eberhard, S., Doubrova N., Marta V., Mohnen D., Southwick A., Darviell A. and Albersheim P., 1989. Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell layer explant morphogenesis. *Plant Cell*, (1), 747-755.
- Edwards, R., Blount, J.W., Dixon, R.A., 1991. Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cell cultures. *Planta* 184:403-409.
- Ewart, K.V., Lin Q. and Hew C.L., 1999. Structures function and evolution antifreeze proteins. *CMLS*, (55), 271-283.
- Eyidoğan, F.İ., Öktem H.A. and Yücel M., 2003. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. *Acta Physiologia Plantarum*, (25), 263-269.
- Farooq, M., Aziz T., Basra S. M. A., Cheema M. A. and Rehman H., 2008. Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. *J. Agronomy and Crop Science*, (194), 161–168.
- Fletcher, G.L., Goddend S.V., Wu, Y., 1999. Antifreeze proteins and their genes from basic research to business opportunity. *Chemitechnology*. 30, 17-28.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado H., Dat J.F. ve Scott I.M., 1997. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling, *Physiol. Plant.*, 100, 241-254.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases, *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 97-112.
- Gechev, T., Gadjev I., Van Breusegem F., Inze D., Dukiandjiev S., Taneve V. and Minkov I., 2002. Hydrogen peroxide protect tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *CMLS*, (59), 708-714.
- Gong, Y., Toivonen P.M.A., Lau O.L. and Wiersma PA., 2001. Antioxidant system level in ‘Braeburn’ apple in related to its browning disorder. *Bot. Bull. Acad. Sin.*,(42), 259-264.

- Griffith, M., Ala P., Yang D.S.C., Hon W.C., Moffatt B.A., 1992. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiology*, (100), 593–596.
- Griffith, M., Antikainen M., Hon W.C., Pihakaski-Maunsbach K., Yu X.-M., Chun J.U., Yang D.S.C., 1997. Antifreeze proteins in winter rye. *Physiologia Plantarum*, (100), 327–332.
- Guo, Z., Ou, W., Lu S., Zhong Q., 2006. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiol. Biochem.*, (44), 828–836.
- Güler, N.S., 2008. *Ctenanthe setosa*'da yaprak kıvrılması sırasında apoplastik ve simplastik alanlarda antioksidan sistemde meydana gelen değişimler. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Hale, M.G., Orcutt D.M., 1987. The physiology of plants under stress, John Wiley and Sons, 206p. New York,
- Halliwell, B., 1982. The toxic effects activated oxygen on plant tissues, 89–123.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutri. Rev.* 52, 253–265.
- Halliwell, B., Clement M. and Long L., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, (486), 10–13.
- Hamed, R.R., Maharem T.M., Fatah M.M.A. and Ataya F.S., 1998. Purification of peroxidase isoenzymes from Turnip roots. *Phytochemistry*, (48), 1291–1294.
- Harlan, J.R., Zohary D., 1966. Distribution of wild wheats and barley. *Science*, (4), 1074–1079.
- Havir, E.A. and Mchale N.A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.*, (84), 1291–1294.
- Hayat S., Ahmad A., 2007. Salicylic acid: A plant hormone. Springer, Dordrecht, pp. 1–371.
- Hernandez, J.A., Ferrer M.A., Jimenez A., Barcelo A.R. and Sevilla F., 2001. Antioxidant systems and O_2^- / H_2O_2 production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*, (127), 817–831.
- Hernandez, J.A., Jimenez A., Mullineaux P.M., Sevilla F., 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. *Plant Cell Environ.*, (23), 853–862.
- Hincha, D.K., Meins Jr., F., Schmitt J.M., 1997. α -1,3-Glucanase is cryoprotective in vitro and is accumulated in leaves during cold acclimation. *Plant Physiol.* 114, 1077–1083.
- Hon, W-C., Griffith M., Chong P., Yang D.S.C., 1994. Extraction and isolation of antifreeze protein from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiol.*, (104), 971–980.
- Hon, W-C., Griffith M., Mlynarz A., Kwok Y.K., Yang D.S.C., 1995. Antifreeze proteins in winter rye leaves are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.*, (109), 879–889.
- Horvath E., Janda T., Szalia G. and Paldi E., 2002. In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. *Plant Sci.*, (163), 1129–1135.
- Huang, T. and Duman J.G., 1995. Purification and characterization of thermal hysteresis protein from cold-acclimated kale, *Brasica oleracea*. *Cryobiology* 32, 577–581.

- Huang, T. and Duman J.G., 2002. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. Plant Mol. Biol. 48, 339-350.
- Janda T., Szalai G., Rios-Gonzalez K., Veisz O. and Paldi E., 2002. Correlation between frost tolerance and antioxidant activities in cereals. Acta Biologica Szegediensis, 46(3-4), 67-69.
- Janda, T., Szalai G., Rios-Gonzales K., Veisa O. and Paldi E., 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. Plant Science, (164), 301-306.
- Janda, T., Szalai G., Tari I., Paldi E., 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. Planta, (208), 175-180.
- Jarillo, J.A., Capel J., Leyva A., Martinez-Zapater J.M., Salinas J., 1994. Two related low-temperature-inducible genes of *Arabidopsis* encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. Plant Mol. Biol. 25, 693-704.
- Kang, H.M., Saltveit M.E., 2001. Activity of enzymatic antioxidant defence systems in chilled and heat shocked cucumber seedlings radicles. Physiol. Plant. 113, 548-556.
- Kang, H.M., Saltveit M.E., 2002. Antioxidant enzymes and DPPH-radical scavenging activity in chilled and heat shocked rice (*Oryza sativa* L.) seedlings radicles. J. Agric. Food Chem. 50: 513-518.
- Kang, G., Wang C., Sun G., Wang Z., 2003. Salicylic acid changes activities of H₂O₂ metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. Environ. Exp. Bot., (00), 1-7.
- Kachroo, A., He Z, Paktar R., Zhu Q., Zhong J., Li D., Ronald P., Lamb C., Chattoo B., 2003. Induction of H₂O₂ in transgenic rice leads to cell death and enhanced resistance to both bacterial and fungal pathogens. Transgenic Research, (12), 577-586.
- Kadioğlu, A., 2004. Bitki Fizyolojisi. Trabzon.
- Kaminska-Rozek, E., Pukacki P.M., 2005. Effect of freezing desiccation on cold hardiness, ROS, membrane lipid levels and antioxidant status in spruce seedlings. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 74(3), 218-228.
- Kappen, L., 1981. Ecological significance of resistance to high temperature, Physiological, 12 A, 439-474.
- Karahocagil, P., Ege H., 2004. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü. Sayı:6 Nüsha:8 ISSN:1303-8346
- Kaya, Y., 2008. Tohumlu Bitkiler. Erzurum
- Keleş, Y., Öncel I., 2002. Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. Plant Sci. 163, 783-790.
- Kerby, K. and Somerville S.C., 1992. Purification of an infection-related, extracellular peroxidase from barley. Plant Physiol., (100), 397-402.
- Kim, J.S., Yun B.W., Choi J.S., Kim T.J., Kwak S.S., Cho K.Y., 2003. Death mechanisms caused by carotenoid biosynthesis inhibitors in green and in undeveloped plant tissues. Pesticide Biochemistry and Physiology, (78), 127-139.

- Kim, K.Y., Kwon S.Y., Lee H.S., Hur Y., Bang C.W., Choi K.S. and Kwak S.S., 2000. Differential expression of four sweet potato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethephon. *Phytochemistry*, (54), 19-22.
- Kocaçalışkan, İ., 2004. Bitki Fizyolojisi. Kütahya
- Kornyeyev, D., Logan B.A., Payton P., Allen R.D. and Holaday A.S., 2001. Enhanced photochemical light utilization and decrease chilling-induced photoinhibition of photosystem II in cotton overexpressing genes encoding chloroplast-targeted antioxidant enzymes. *Physiologia Plantarum*, (113), 323-331.
- Kronfuss, G., Wieser G., Havranek W.M., and Polle A., 1996. Effects of ozone and mild drought stress on total and apoplastic guaiacol and lipid peroxidation in current-year needles of young Norway Spruce (*Picea abies* L., Karst). *J. Plant Physiol.* 148, 203-206.
- Kuru, H.İ., 2007. Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Kütahya
- Lee, D.H. and Lee C.B., 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.*, (159), 75-85.
- Lee, T.M. and Lin Y.H., 1996b. Peroxidase activity in ethylene-, ABA-, or MeJA, treated rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, (37), 201-207.
- Lee, T.M., and Lin Y.H., 1996a. Peroxidase activity in ethylene-induced rice (*Oryza sativa* L.) coleoptile elongation. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 37(4), 239-245.
- Leja, M., Mareczek A., Ben J., 2003. Antioxidant properties of two apple cultivars during long-term storage. *Food Chem.* 80, 303-307.
- Leemmler, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage. T4. *Nature (London)*. (227) 680-685.
- Levine, A., Tenhaken R., Dixon R.A., Lamb C.J., 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, (79), 583-593.
- Lewit, J., 1980. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, (1), New York.
- Lin, C.C. and Kuo C.H., 2000. Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, (30), 151-155.
- Lin, C.C., and Kao C.H., 2001. Abscisic acid induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Science*, (160), 323-329.
- Lin, K.H., Pai F.H., Hwang S.Y., Lo H.F., 2006. Pre-treating paclobutrazol enhanced chilling tolerance of sweet potato. *Plant Growth Regul.*, (49), 249-262.
- Lu, C.F., Jian L.C., Kuang T.Y., 2000. Secretory antifreeze proteins produced in suspension culture cells of *Rhodiola algida* var. *tangutica* during cold acclimation. *Progress in Biochem. Biophys.* 27, 555-559.
- Lu, C.F., Wang H., Jian L.C., Kuang T.Y., 1998. Progress in study of plant antifreeze proteins. *Progress in Biochem. Biophys.* 25, 210-216.
- Lukatkin, A.S., 2002. Contribution of oxidative stress to the development of cold-induced damage to leaves of chilling-sensitive plants: 2. the activity of antioxidant enzymes during plant chilling. *Russ. J. Plant Physiol.*, (49), 782-788.

- Lynch, D. V. and Steponkus P. L., 1987. Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv. Puma). *Plant Physiology*, (83), 761-767.
- Lyons, J. M., 1973. Chilling injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, (24), 445-466.
- Mahajan, S. and Tuteja N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview, *Arch. Biochem. Biophys.*, (444), 139-158.
- Marentez, E., Griffith M., Mlynarz A. And Brus R., 1993. Protein accumulate in the apoplast of winter rye leaves during cold acclimation. *Physiol. Plant.* 87, 499-507.
- Martina, R., Steipe B., Zenk M.H., 1995. Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. *FEBS Letters* 377, 175-180.
- Mauch-Mani, B. and Metraux J.P., 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, (82), 535-540.
- Mayer, K., Keil M., Naldrett M.J., 1999. A leucine-rich repeat protein of carrot that exhibits antifreeze activity. *FEBS Letters* 447, 171-178.
- McClung, C.R., 1997. Regulation of catalases in Arabidopsis. *Free Radical Bio. Med.*, (23), 489-496.
- Meloni, D.A., Oliva M.A., Martinez C.A. and Cambraia J., 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environ. and Exp. Botany*, (49), 69-76.
- Michael, W.F.L., Takahama U. and Heber U., 1993. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiol.*, (101), 969-976.
- Milyutina, I. L., Sudachkova N. E., Romanova L.I. and Semenova G.P., 2008. Effect of Cold Stress in the Rhizosphere on the Activity of Antioxidant Enzymes in the Tissues of *Pinus sylvestris*. *Contemporary Problems of Ecology*, 1(4), 404-408.
- Minibaeva, F., Mika A. and Lüthje S., 2003b. Salicylic acid changes the properties of extracellular peroxidase activity secreted from wounded wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Protoplasma*, (221), 67-72.
- Minibaeva, F.V. and Gordon L.Kh., 2003a. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russ. J. of Plant Physiology*, 50(3), 411-416.
- Molina, A., Bueno P., Marin M.C., Rodriguez-Rosales M.P., Belver A., Venema K. and Donaire J.P., 2002. Involvement of endogenous salicylic acid content, lipoxygenase and antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension cultures to NaCl. *New Phytologist*, (156), 409-415.
- Moon, B. Y., Higashi S., Gombos Z., Murata N., 1995. Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Science*, (92), 6219-6223.
- Morsy, M.R., Jouve L., Hausman J-F., Hoffmann L., Stewart J.McD., 2007. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. *J. Plant Physiol.*, (164), 157-167.

- Mutlu, S., 2005. Tuz stresi ve salisilik asitin buğday yapraklarında apoplastik ve simplastik antioksidan enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Mutlu, S., Atici Ö., and Nalbantoglu B., 2009. Effects of salicylic acid and salinity on apoplastic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum*, 53 (2), 334-338.
- Nishiyama, Y. Ikeda, H. and Haramaki N., 1998. Oxidative stress is related to exercise in tolerance in patients with heart failure, *Am. Heart. J.*, 135, 115.
- Öktem, H.A., Eyidogan F., Demirba D., Bayrac A.T., Oz M.T., Ozgur E., Selcuk, F., Yucel, M., 2008. Antioxidant responses of lentil to cold and drought stres. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 17(1), 15-21.
- Özcan, S., Gürel E. and Babaoğlu M., 2001. Bitki Biyoteknolojisi. S.Ü. Vakfı Yayınları
- Orozco-Cárdenas, M., Narváez-Vásquez J. and Ryan C., 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, (13), 179–191.
- Otter, T., Polle A., 1997. Characterisation of acidic and basic apoplastic peroxidases from needles of Norway Spruce (*Picea abies*, L., Karsten) with respect to lignifying substrates. *Plant Cell Physiol.* 38(5):595-602.
- Padu, E., 1999. Apoplastic peroxidases, ascorbat and lignification in relation to nitrate supply in wheat stem. *J. Plant Physiol.* 154, 576- 583.
- Palma, F., Lluch C., Iribarne C., 2009. Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Growth Regul.*, (58), 307–316.
- Pan, O., Zhan J., Liu H., Zhang J., Chen J., Wen P., Huang W., 2006. Salicylic acid synthesized by benzoic acid 2-hydroxylase participates in the development of thermotolerance in pea plants. *Plant Sci.*, (171), 226-233.
- Parida, A.K., Das A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 324–349.
- Patykowski, J. and Urbanek H., 2003. Activity of enzymes related to H₂O₂ generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, (151), 153–161..
- Pearce, R.S., 1988. Extracellular ice and cell shape in frost-stressed cereal leaves: A low temperature scanning-electron-microscopy study, *Planta* 175, 313-324.
- Polle, A., and Junkermann W., 1994. Inhibition of apoplastic and symplastic peroxidase activity from of Norway Spruce by the photooxidant hydroxymethyl hydroperoxide, *Plant Physiol.* 104:617-621.
- Polle, A., Otter T., and Seifert F., 1994b. Apoplastic peroxidase and lignification in needles of Norway Spruce (*Picea abies*, L.). *Plant Physiol.* 94:312-319.
- Posmyk, M.M., Bailly C., Szafranska K., Janas K.M., Corbineau F., 2005, Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings, *J. Plant Physiol.*, (162), 403-412.
- Pudney, P.D.A., Buckley S.L., Sidebottom C.M., Twigg S.N., Sevilla M.P., Holt C.B., Roper D., Telford J.H., McArthur A.J., Lillford P.J., 2003. The physico-chemical characterization of boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*). *Arch. Biochem. Biophys.* 410, 238-245.

- Rao, I.M., Friesen D.K. and Osaki M., 1999, Plant Adaptaion to Phosphoruslimited tropical soils, in Handbook of Plant and Crop Stress, Pessarakli, M.(ed.), Marcel Dekker, Inc., 61-95 pp, New York.
- Raskin, I., 1992 b. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol.*, (99), 799-803.
- Raskin, I., 1992a. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (43), 439-463.
- Raymond, J.A., Wilson P., DeVries A.L., 1989. Inhibition of growth of nonbasal planes in ice by fish antifreezes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 881-885.
- Sabala, I., Egertsdotter U., Fircks H.V., Arnold S.V., 1996. Absisic acid-induced secretion of an antifreeze-like protein in embryogenic cell lines of *picea abies*. *J. Plant Physiol.* 149, 163-170.
- Sairam, R.K. and Srivastava G.C., 2000. Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 43(3), 381-386.
- Sairam, R.K., Srivastava G.C. and Saxena D.C., 2000. Increased antioxidant activity under elevated temperatures a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 43(2), 245-251.
- Sakhabutdinova, A.R., Fatkhutdinova D.R. and Shakirova F.M., 2004. Effect of salicylic acid on the activity of antioxidant enzymes in wheat under conditions of salination. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40 (5), 501-505.
- Sakurai, N., 1998. Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. *Journal of Plant Research*, 111(1101), 133-148.
- Sala, J.M., 1998. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruit to chilling. *Postharvest Biol. and Technol.* 20:81-89.
- Sala, J.M., Lafunte M.T., 2000. Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold stored mandarin fruits. *Postharvest Biol. and Technol.* 3:255-261.
- Salisbury, F.B. and Ross C.W., 1992. *Plant Physiol.* Wadswort Publishing Company. California, pp.682, USA.
- Saruyama H. and Tanida M. 1995. Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and -tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.*, (109), 105–113.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.*, (101), 7-12.
- Schettel, N. L. and N. E. Balke, 1983. Plant growth response to several allelopathia chemicals. *Weed Sci.*, (31), 293-298.
- Sencar, Ö., Gökmen S., Yıldırım A., Kandemir N., 1997. Tarla Bitkileri Üretimi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 3. Ders Kitabı 3, 180-185.
- Senaratna, T., Touchhell D., Bunn E., and Dixon K., 2000. Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regul.* 30:157-161.
- Setha, S., Kanlayanarat S., and Srilaong V., 2000. Changes in polyamine levels and peroxidase activity 'khakdum' (*Carica papaya* L.) under low temperature storage conditions. *Quality Assurnce in Agricultural Produce* 593-598.
- Shi, C., Dai Y., Xu X., Xie Y., Liu Q., 2002. The purification of polyphenol oxidase from tobacco. *Protein Exp. Purif.*, (249, 51–55.

- Shim, I.S., Momose Y., Yamamoto A., Kim D.W., and Usui, K., 2003. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to a salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 39: 285-292.
- Simonovicova, M., Huttova J., Mistrik I., Siroka B. and Tamas L., 2004. Peroxidase mediated hydrogen peroxide production in barley roots grown under stress conditions. *Plant Growth Regulation*, (44), 267-275.
- Sing, B. and Usha K., 2003. Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation*, (39), 137-141.
- Slesak, I., Libik M., Karpinska B., Karpinski S. and Misalski Z., 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses, *Acta Biochim. Pol.*, 54, 39-50.
- Souza, I.R.P. and McAdam J.W., 2001. Gibberellic acid dwarfism effect on the growth dynamics of b73 maize (*Zea mays* L.) leaf blades; a transient increase in apoplastic peroxidase activity precedes cessation of cell elongation. *J. Exp. Bot.*, 52(361), 1673-1682.
- Spiteller, G., 2001. Peroxidation of lineoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases", *Mechanisms of Ageing and Development*, Vol.122, 617-657
- Srivastava, M.K. Dwivedi U.N., 2000. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant Sci.* 158, 87-96.
- Srivastava, S. Dwivedi U.N., 2001. Plant regeneration from callus of cuscutea reflexa- an angiospermic parasite-and modulation of catalase and peroxidase activity by salicylic acid and naphthalene acetic acid. *Plant Physiol.* 39, 529-538.
- Stahl, W. ve Sies H., 2002. Introduction: Reactive oxygen species, research monographs, 1-2.
- Steponkus, P. L., 1992, Preface, *Advances in Low Temperature Biology*, 1: ix-xi.
- Storey, K.B., Storey J.M., 1988. Freeze tolerance in animals. *Physiol. Rev.* 68, 27-84.
- Streb, P., Shang W. and Feierabend J., 1999. Resistance to cold-hardened winter rye leaves (*Secale cereale* L.) to photo-oxidative stress. *Plant Cell and Environment*, (22), 1211-1223.
- Sudhakar, C., Lakshmi A. and Giridarakumar., 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, (161), 613-619.
- Şimsek, F., 1999. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu, *Türkiye Klinikleri J Pediatr*, 8, (1), 42-47.
- Tao, D. L., Oquist G. and Wingsle G., 1998, Active oxygen scavengers during cold acclimation of Scots pine seedlings in relation to freezing tolerance. *Cryobiology*, (37) 38-45.
- Taşgın E., Atıcı Ö., Nalbantoğlu B. Popova LP. 2006. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*, (67), 710-715.
- Taşgın, E., 2004. Düşük sıcaklık ve salisilik asidin kışlık buğday yapraklarındaki donma toleransı, oksidatif enzim aktiviteleri ve apoplastik proteinler üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Taşgın, E., Atıcı Ö. and Nalbantoğlu B., 2003. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation*, (41), 231-236.
- Tatar, O and Gevrek M.N. 2008 Influence of water stress on proline accumulation, lipid peroxidation and water content of wheat. *Asian Journal of Plant Sciences*, 7(4), 409-412.
- Tewari, R., Kumar P., Tewari N., Srivastava S., Sharma P., 2004. Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses: influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize. *Plant Science*, (166), 687–694.
- Tomimatsu, Y., Scheder J., Yeh Y., Feeney R.E., 1976. Raman spectra of a solid antifreeze glycoprotein and its liquid and frozen aqueous solutions. *J.Biol.Chem.* (251) 2290-2298.
- Turan, Ö., 2007. Nohut (*Cicer arietinum* L.) Çeşit ve Hatlarının Soğuk Stresine Karşı Toleransını Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametreler ile Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Uemura, M., Joseph, R.A. and Steponkus P.L., 1995. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. Effect of plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions, *Plant Physiology*, (109), 15-30.
- Urritia, M., Duman J., Knight C., 1992. Plant thermal hysteresis proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1121-199.
- Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruit and vegetables. *CRC Crit Rev. Food Sci. Nutr.*, (15), 49-127.
- Vanacker, H., Carver T.L.W., Foyer C.H., 1998a. Pathogen-induced changes in the antioxidants status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiol.* 117: 1103-1114.
- Vanacker, H., Foyer C.H., Carver T.L.W., 1998b. Changes in apoplastic antioxidants induced by powdery mildew attack in oat genotypes with race non-specific resistance. *Planta* 208: 444-452.
- Vanacker, H., Harbinson J., Ruisch J., Carver T.L.W., Foyer, C.H., 1998. Antioxidant defences of the apoplast. *Protoplasma* 205, 129-140.
- Velikova, V., Yordanov I., Edreva A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant system in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.* 151, 59-66.
- Velikova, V., Loreto F., 2005. On the relationship between isoprene emission and thermotolerance in *Phragmites australis* leaves exposed to high temperatures and during the recovery from a heat stress. *Plant, Cell and Environment* 28, 318–327.
- Wang, C.Y., 1990. Chilling Injury of Horticultural Crops, Boca Raton, FL: CRC, 313 pp.
- Wang, L.J., Huang W.D., Li J.Y., 2003. Effects of salicylic acid on the peroxidation of membrane-lipid of leaves in grape seedlings. *Scientia Agricultura Sinica*, 36(9), 1076-1080.
- Wang, S.H., Jiao H.J., Faust M., 1991. Changes in the activity of catalase, peroxidase and polyphenol oxidase in apple buds during bud break induced by thidiazuron. *J. Plant Growth Regul.* (10) 33-39.

- Wang, Y.X., Stass A. and Horst W.J., 2004. Apoplastic binding of aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize. *Plant Physiology*, 136(3), 3762-3770.
- Westhuizen, E.J., Qian X.M., Botha A.M., 1998. Differential induction of apoplastic peroxidase and chitinase activities in susceptible and resistant wheat cultivars by Russian wheat aphid infestation. *Plant Cell Rep.* 18: 132-137.
- Willekens, H., Villarroel R., Montagu M.V., Inze D., Camp, W.V., 1997. Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.), *FEBS Letters* 352, 79-83.
- Wingsle, G., Gardestorm P., Hallgren Karpinski S., 1991. Isolation, purification and subcellular localisation of isozyme of superoxide-dismutase from Scot pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Plant Physiol.* 95:21-28.
- Wisniewski, M., Webb R., Balsamo R., Close T.J., Yu X.-M., Griffith, M., 1999. Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60:a dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiol. Plant.* 105, 600-608.
- Wood, E. S. and Simith C. A., 1991, *Molecular and Cell Biochemistry*. Chapman & Hall, Hong Kong
- Wojtaszek, P., 1997. Oxidation burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemistry*, (322), 681-692.
- Yadeghari, L. Z., Heidari R., Carapetian J., 2008. Cold pretreatment-induced changes in antioxidant enzyme activities and relative water content and soluble sugars in shoots and roots of soybean seedlings. *Research Journal of Biological Sciences*, 3(1), 68-73
- Yağmur, Y., 2008. Farklı Asma (*Vitis vinifera* L.) Çeşitlerinin Kuraklık Stresine Karşı Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Tolerans Parametrelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir
- Yang, D.S.C., Sax A., Chakrabartty A., Hew C.L., 1988. Crystal structure of an antifreeze polypeptide and its mechanistic implications. *Nature*, (333) 232-237.
- Yang, S.J., Hosokawa M., Mizuta Y., Yun J.G., Mano J., Yazawa S., 2001. Antioxidant capacity is correlated with susceptibility to leaf spot caused by a rapid temperature drop in *Saintpaulia* (African violet). *Sci. Hort.*, (88), 59-69.
- Yaşar, F. Ellialtıoğlu, S. and Yildiz. K. 2008. Effect of salt stress on antioxidant defense systems, lipid peroxidation, and chlorophyll content in green bean. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(6), 782-786.
- Yee, Y., Tam N.F.Y., Wong Y.S. and Lu C.Y., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguira gymnorhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environ. Exp. Bot.*, 1-13.
- Yılmaz, S. and Ozan T. S., 2003. Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişki, *Türk Biyokimya Dergisi*, 28, (4), 252-256.
- Yordanova, R.Y., Christov K.N. and Popova L.P., 2004. Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environ. and Exp. Botany*, (51), 93-101.
- Yu L.J., Lan W.Z., Qin W.M., and Xu H.B., 2001. Effects of salicylic acid on fungal elicitor-induced membrane-lipid peroxidation and taxol production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Process Biochemistry*, (37), 477-482.
- Yu, X.M., Griffith M., 2001. Winter rye antifreeze activity increases in response to cold and drought, but not abscisic acid. *Physiologia Plantarum*, (112), 78-86.

- Zhou, R., Zhao H., 2004. Seasonal pattern of antioxidant enzyme system in the roots of perennial forage grasses grown in an alpine habitat, related to freezing tolerance. *Physiologia Plantarum*, (121), 399–408.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Gümüşhane'nin Kelkit ilçesinde doğdu. Kelkit'te başladığı ilköğrenimine Antalya'nın Gazipaşa ilçesinde devam etti. Burada orta ve lise öğrenimini tamamladı. 1997 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2001 yılında ikincilik derecesiyle mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2001 yılında başladığı yüksek lisans öğrenimini 2005 yılında tamamladı. 2005 te başladığı doktora öğrenimi devam etmektedir. Bunun yanında 2002 yılından itibaren özel öğretim kurumlarında öğretmenlik yapmaktadır. Ayrıca evli ve bir çocuk babasıdır.