

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

NİTRİK OKSİTİN MISIRDA (*Zea mays*) DÜŞÜK SICAKLIK STRESİ
TOLERANSI ÜZERİNE ETKİSİ

Nevzat ESİM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM

2011

Her hakkı saklıdır.



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

Nitrik Oksitin (NO) Mısırdaki Düşük Sıcaklık Toleransı Üzerine Etkisi

Prof. Dr. Ökkeş ATICI'nın danışmanlığında, Nevzat ESİM tarafından hazırlanan bu çalışma 18/08/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (5./5.) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

İmza : A. Kadioğlu

Üye : Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza : Ö. Atıcı

Üye : Doç. Dr. Güleray AĞAR

İmza : G. Ağar

Üye : Yrd. Doç. Dr. Rahmi DÜMLÜPINAR

İmza : R. Dumlupınar

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serkan ERDAL

İmza : S. Erdal

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. Ömer AKBULUT
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2009/240

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirilerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

NİTRİK OKSİTİN MISIRDA (*Zea mays*) DÜŞÜK SICAKLIK STRESİ TOLERANSI ÜZERİNE
ETKİSİ

Nevzat ESİM

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Bu araştırmada, düşük sıcaklığa hassas olan mısırın yapraklarında donma hasarı, buz nükleasyon aktivitesi, hidrojen peroksit (H_2O_2) ile süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) miktarı, lipid peroksidasyon seviyesi, apoplastik ve hücrel antioksidan enzimlerin (katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz) aktivitesi, nitrat redüktaz (NR) enzim aktivitesi, içsel nitrik oksit (NO) miktarı, absisik asit (ABA) hormonu seviyesi ile apoplastik ve hücrel protein profilleri üzerine düşük sıcaklık ve NO'nun etkileri araştırılmıştır. Ekim gününe göre bitki yapraklarına 10. gün 0.0, 0.1, 1 ve 100 μM sodyum nitro prussid (SNP) (bir NO vericisi) konsantrasyonları püskürtülerek uygulanmış ve bitkiler kesim günlerinden (14, 21 ve 28) 2 gün önce düşük sıcaklığa (10/7 °C) transfer edilmişlerdir. Mısır yapraklarında donma hasarı düşük sıcaklık ile tüm günlerde artmıştır. Bununla birlikte, düşük sıcaklığa maruz bırakılan yapraklarda SNP uygulamaları genellikle donma hasarını düşürmüştür. Donma hasarının azaltılmasında en etkili SNP konsantrasyonunun 100 μM olduğu bulunmuştur. Düşük sıcaklık uygulaması tüm günlerde buz nükleasyon aktivitesini düşürürken SNP uygulamaları ise aktiviteyi genelde artırmıştır. Düşük sıcaklık H_2O_2 ile $O_2^{\cdot-}$ miktarını, lipid peroksidasyon seviyesini apoplastik ve hücrel antioksidan enzimlerin aktivitelerini, NR enzim aktivitesini, içsel NO ve ABA miktarını tüm günlerde kontrol bitkilerine oranla genelde artırmıştır. 0.1 μM 'lık SNP uygulaması H_2O_2 ile $O_2^{\cdot-}$ miktarlarını ve lipid peroksidasyon seviyesini düşürmüştür. Ayrıca, antioksidan enzimler için maximum aktivitelerde aynı SNP konsantrasyonunda ölçülmüştür. Benzer şekilde, uygulama zamanına bağlı olarak, 1 ve 100 μM SNP konsantrasyonları da genelde H_2O_2 ile $O_2^{\cdot-}$ miktarlarını ve lipid peroksidasyon seviyesini düşürmüştür. Aynı zamanda, bu konsantrasyonlar antioksidan enzimlerin aktivitelerini de artırmıştır. SNP'nin üç konsantrasyonu da (0.1, 1 and 100 μM) NR enzim aktivitesini, içsel NO ve ABA miktarında tüm günler de genel de azalmalara neden olmuştur. Apoplastik ve hücrel proteinlerin analizi SDS-PAGE metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hem 14 hem de 28 günlük bitkilerin apoplastik proteinleri SDS-PAGE de yeni bantlar oluşturduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, tüm günler de bitkilerin hücrel proteinleri SDS-PAGE de hem yeni bantlar oluşturmuş hem de mevcut bantları daha belirgin yapmıştır.

2011, 146 sayfa

Anahtar Kelimeler: Düşük Sıcaklık, Nitrik Oksit, Apoplast, Nitrat Redüktaz, ABA, SDS-PAGE

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

THE EFFECTS of NITRIC OXIDE on LOW TEMPERATURE STRESS TOLERANCE in
MAIZE (*Zea mays*)

Nevzat ESİM

AtaturkUniversity
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

In this study, effects of low temperature and nitric oxide on the freezing injury, ice nucleation activity, activities of apoplastic and cellular antioxidant enzymes (catalase, peroxidase and superoxide dismutase), hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) contents, lipid peroxidation level, nitrate reductase (NR) enzyme activity, endogenous nitric oxide (NO) amount, abscisic acid (ABA) level, apoplastic and cellular proteins profiles on the leaves of maize (*Zea mays*) which are sensitive to low temperature stress were investigated. According to planting day, sodium nitroprusidde (SNP) (a donor NO) concentrations of 0.0, 0.1, 1 and 100 μ M were applied by spraying on the plant leaves at 10th day and plants were transferred into the low temperature (10/7 °C) before 2 days of harvesting day (14, 21 and 28th days). Only low temperature application increased freezing injury in the leaves of maize at all the days. Conversely, SNP application generally decreased freezing injury in the leaves exposed to low temperature. The most effective SNP concentration in decreasing of freezing injury was found to be 100 μ M. All the concentrations of SNP generally increased ice nucleation activity, while low temperature application decreased ice nucleation activity at all the days. H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ contents, lipid peroxidation level, apoplastic and cellular antioxidant enzymes activities, NR activity, endogenous NO amount and ABA level generally increased at all the days in the leaves exposed to low temperature compared to the controls. SNP application of 0.1 μ M before low temperature decreased H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ contents and lipid peroxidation level. Besides, the maximum activity for antioxidant enzymes were assayed at the same SNP concentration. Similarly, depending on application time, SNP concentrations of 1 and 100 μ M generally decreased H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ contents and lipid peroxidation level. At the same time, these concentrations also increased the activities of antioxidant enzymes. Three concentrations (0.1, 1 and 100 μ M) of SNP generally gave rise to decreases in NR activity, endogenous NO amount and ABA level at all the days. Analysis of apoplastic and cellular proteins were performed using SDS-PAGE method. It was observed that apoplastic proteins of both 14 and 28-days leaves formed new bands at SDS-PAGE. Similarly, cellular proteins of at all the days leaves both formed new bands and make available bands more apparent at SDS-PAGE.

2011, 146 pages

Keywords: Low temperature, Nitric Oxide, Apoplastic, Nitrate Reductase, ABA, SDS-PAGE.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu araştırma, 2009-240 nolu Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi olarak desteklenmiş ve Fen-Fakültesi Bitki Fizyolojisi Laboratuvarında yapılmıştır.

Öncelikle çalışmalarımnda her türlü desteği sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanımız ve kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya en içten şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımın yapılabilmesi için Atatürk Üniversitesine yurt içi görevlendirme ile gelmeme imkan tanıyan Bingöl Üniversitesi Rektörlüğüne ve Fen – Edebiyat Fakültesi Dekanlığına teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında ilgi, yardım ve desteğini gördüğüm, tez izleme komitesinde bulunan sayın Prof. Dr. Yavuz DEMİR ve sayın Doç. Dr. Güleray AĞAR'a, benimle her türlü bilgi ve deneyimlerini paylaşan sayın Yrd. Doç. Dr. Salih MUTLU'ya, deneylerin gerçekleşmesi aşamalarında büyük emeği olan kıymetli arkadaşlarım sayın Deniz TIRYAKI ve sayın Ömer KARADAĞOĞLU'na ayrıca teşekkür ederim.

Her türlü desteklerinden dolayı sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan ERDAL'a, sayın Yrd. Doç. Dr. Mesut TAŞKIN'a, sayın Arş.Gör. Mucip GENİŞEL'e, sayın Arş. Gör. Derya YANMIŞ'a, sayın Biyolog Furkan ORHAN'a ve diğer tüm mesai arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Kendimi bildiğimden beri bana hayatta herşeylerini veren, bugünlere gelmemde en büyük pay sahipleri olan annem ve babam'a, her türlü desteğinden dolayı nişanlım Ravda'ya, benim için büyük fedakarlık yapan sevgili abim ve ablam'a ve tüm sevdiklerime şükranlarımı sunarım.

Nevzat ESİM

Temmuz 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM	39
3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	39
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları	40
3.3. Yöntemler	45
3.3.1. Bitkilerin Büyütülmesi	45
3.3.2. % Donma Hasarının Belirlenmesi	45
3.3.3. Buz Nükleasyon Aktivitesinin Belirlenmesi	46
3.3.4. Apoplastik Proteinlerin Ekstraksiyonu ve İzolasyonu	46
3.3.5. Hücrel Proteinlerin Ekstraksiyonu	47
3.3.6. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) Miktarının Belirlenmesi	48
3.3.7. Süperoksit Anyon Miktarının Belirlenmesi	49
3.3.8. Lipid Peroksidasyon Aktivitesinin Belirlenmesi	50
3.3.9. Apoplastik ve Hücrel Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	51
3.3.9.a. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi	51
3.3.9.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi	52
3.3.9.c. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi	52
3.3.10. Nitrat Redüktaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	53
3.3.11. İçsel NO Miktarının Belirlenmesi	54
3.3.12. ABA Hormon Analizi	55

3.3.13. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	55
4. BULGULAR	58
4.1. % Donma Hasarı Sonuçları	58
4.2. Buz Nükleasyon Aktivitesi Sonuçları	63
4.3. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı Sonuçları	67
4.4. Süperoksit anyonu (O ₂ ⁻) Miktarı Sonuçları	69
4.5. Lipid peroksidasyon seviyesi (MDA miktarı) Sonuçları	71
4.6. Apoplastik Antioksidant enzim aktiviteleri sonuçları	73
4.6.1. Apoplastik SOD enzim aktivitesi	73
4.6.2. Apoplastik POD enzim aktivitesi	75
4.7. Hücresel Antioksidan enzim Sonuçları	77
4.7.1. Hücresel SOD enzim aktivitesi	77
4.7.2. Hücresel POD enzim aktivitesi	79
4.7.3. Hücresel CAT enzim aktivitesi	81
4.8. Nitrat Redüktaz (NR) enzim sonuçları	83
4.9. içsel NO miktarı sonuçları	85
4.10. ABA Hormon sonuçları	87
4.11. SDS PAGE sonuçları	89
4.11.1. Hücresel Protein Profillerin SDS-PAGE Sonuçları	89
4.11.1. Apoplast Protein Profillerinin SDS-PAGE Sonuçları	93
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	97
5.1. Düşük sıcaklık ve NO'nun Donma Hasarı Üzerine Etkileri	99
5.2. Düşük sıcaklık ve NO'nun Buz Nükleasyon Aktivitesi Üzerine Etkileri ..	100
5.3. Düşük Sıcaklık ve NO'nun Hidrojen Peroksit Miktarı Üzerine Etkileri ...	101
5.4. Düşük Sıcaklık ve NO'nun Süperoksit Anyonu Miktarı Üzerine Etkileri	103
5.5. Düşük Sıcaklık ve NO'nun Lipid Peroksidasyon Seviyesi Üzerine Etkileri	104
5.6. Düşük Sıcaklık ve NO'nun Apoplastik Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri	106

5.7. Düşük Sıcaklık ve NO'nun Hücresel Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri.....	109
5.8. Düşük Sıcaklık ve NO'nun Nitrat Redüktaz (NR) Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri	115
5.8. Düşük Sıcaklığın İçsel Üretilen NO Üzerine Etkileri	116
KAYNAKLAR	124
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
CAT	Katalaz
E.U.	Enzim ünitesi
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
MCH	Memeli cinsiyet hormonları
mg	Miligram
mM	Milimolar
NBT	Nitroblue tetrazolium klorür
nmol	Nano mol
PFO	Polifenol oksidaz
POX	Peroksidaz
PVP	Polivinilpirrolidon
ROT	Reaktif oksijen türleri
rpm	Devir/dakika
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiobarbutirik asit
TCA	Trikloroasetik asit
$\times g$	Yerçekimi ivmesinin katı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Apoplastik ve Hücrel bölgenin bir yaprak hücresinde gösterimi.....	8
Şekil 1.2. Bitkilerde Reaktif oksijen türleri ve etkileri	12
Şekil 1.3. Bitki hücresinde antioksidan savunma sistemi.....	14
Şekil 1.4. Bitkilerde NO'un farklı biyosentez yolları	21
Şekil 3.1. H ₂ O ₂ Standart grafiği	48
Şekil 3.1. O ₂ ⁻ , NR ve içsel NO miktarlarını belirlemede kullanılan NaNO ₂ Standart grafiği.....	49
Şekil 3.1. CAT Aktivitesi için Kullanılan Standart grafiği.....	52
Şekil 4.1. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 14 günlük Bitkilerde Donma hasarına Etkileri.	58
Şekil 4.2. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 21 günlük Bitkilerde Donma hasarına Etkileri.	59
Şekil 4.3. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 28 günlük Bitkilerde Donma hasarına Etkileri	60
Şekil 4.4. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 14 günlük Bitkilerde Buz Nükleasyon Aktivitesi üzerine etkileri	62
Şekil 4.5. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 21 günlük Bitkilerde Buz Nükleasyon Aktivitesi üzerine etkileri	63
Şekil 4.6. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 28 günlük Bitkilerde Buz Nükleasyon Aktivitesi üzerine etkileri	64
Şekil 4.7. Düşük sıcaklık ve SNP'nin H ₂ O ₂ Miktarı Üzerine Etkileri.....	66
Şekil 4.8. Düşük sıcaklık ve SNP'nin O ₂ ⁻ Miktarı Üzerine Etkileri	68
Şekil 4.9. Düşük sıcaklık ve SNP'nin LPO Seviyesi Üzerine Etkileri.	70
Şekil 4.10. Düşük sıcaklık ve SNP'nin Apoplast SOD aktivitesi Üzerine Etkileri	72
Şekil 4.11. Düşük sıcaklık ve SNP'nin Apoplast POD aktivitesi Üzerine Etkileri	74
Şekil 4.12. Düşük sıcaklık ve SNP'nin Hücrel SOD aktivitesi Üzerine Etkileri	76
Şekil 4.13. Düşük sıcaklık ve SNP'nin Hücrel POD aktivitesi Üzerine Etkileri	78
Şekil 4.14. Düşük sıcaklık ve SNP'nin Hücrel CAT aktivitesi Üzerine Etkileri	80

Şekil 4.15. Düşük sıcaklık ve SNP'nin NR aktivitesi Üzerine Etkileri	82
Şekil 4.16. Düşük sıcaklık ve SNP'nin İçsel NO miktarı Üzerine Etkileri	84
Şekil 4.17. Düşük sıcaklık ve SNP'nin ABA miktarı Üzerine Etkileri	86
Şekil 4.18. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 14 günlük Hücrel SDS-PAGE Görüntüsü .	87
Şekil 4.19. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 21 günlük Hücrel SDS-PAGE Görüntüsü .	88
Şekil 4.20. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 28 günlük Hücrel SDS-PAGE Görüntüsü .	90
Şekil 4.21. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 14 günlük Apoplast SDS-PAGE Görüntüsü .	91
Şekil 4.22. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 21 günlük Apoplast SDS-PAGE Görüntüsü .	93
Şekil 4.23. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 28 günlük Apoplast SDS-PAGE Görüntüsü .	94

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 14 günlük Bitkilerde Donma hasarına Etkiler	58
Çizelge 4.2. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 21 günlük Bitkilerde Donma hasarına Etkiler	59
Çizelge 4.3. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 28 günlük Bitkilerde Donma hasarına Etkiler	60
Çizelge 4.4. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 14 günlük Bitkilerde Buz Nükleasyon Aktivitesi üzerine etkileri	62
Çizelge 4.5. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 21 günlük Bitkilerde Buz Nükleasyon Aktivitesi üzerine etkileri	63
Çizelge 4.6. Düşük sıcaklık ve SNP'nin 28 günlük Bitkilerde Buz Nükleasyon Aktivitesi üzerine etkileri	64
Çizelge 4.7. Düşük sıcaklık ve SNP'nin H ₂ O ₂ Miktarı Üzerine Etkileri	66
Çizelge 4.8. Düşük sıcaklık ve SNP'nin O ₂ ⁻ Miktarı Üzerine Etkileri	68
Çizelge 4.9. Düşük sıcaklık ve SNP'nin LPO Seviyesi Üzerine Etkileri	70
Çizelge 4.10. Düşük sıcaklık ve SNP'nin Apoplast SOD aktivitesi Üzerine Etkileri .	72
Çizelge 4.11. Düşük sıcaklık ve SNP'nin Apoplast POD aktivitesi Üzerine Etkileri .	74
Çizelge 4.12. Düşük sıcaklık ve SNP'nin Hücrel SOD aktivitesi Üzerine Etkileri .	76
Çizelge 4.13. Düşük sıcaklık ve SNP'nin Hücrel POD aktivitesi Üzerine Etkileri .	78
Çizelge 4.14. Düşük sıcaklık ve SNP'nin Hücrel CAT aktivitesi Üzerine Etkileri .	80
Çizelge 4.15. Düşük sıcaklık ve SNP'nin NR aktivitesi Üzerine Etkileri	82
Çizelge 4.16. Düşük sıcaklık ve SNP'nin İçsel NO miktarı Üzerine Etkileri	84
Çizelge 4.17. Düşük sıcaklık ve SNP'nin ABA miktarı Üzerine Etkileri	86

1. GİRİŞ

Dünyada toplam nüfus sayısı 1900’lü yıllarda 1,5 milyar iken günümüzde bu rakam 6,9 milyara ulaşmıştır (Wikipedia 2011). Nüfus sayısı bu hızla artacağı göz önüne alınırsa 2050 yılına kadar 9 milyarı aşacağı tahmin edilmektedir (Mahajan and Tuteja 2005). FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu)’nun verilerine göre yeryüzündeki işlenebilir toplam tarımsal arazi alanlarının azalması ve nüfus artışı ile birlikte, kişi başına düşen işlenebilir arazi alanı da gittikçe azalmaktadır. Bununla birlikte FAO’nun 2009 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 duruma gelmesi ve nüfus artışı, şimdilik herhangi bir kıtlık tehlikesi olmasa da, uzun dönemde risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (Jones *et al.* 1989; Bray *et al.* 2000; Doğru 2006; Mutlu 2009).

Doğadaki canlıların önemli bir bölümünü oluşturan bitkiler, canlı yaşamının devamlılığı açısından ekosistemin temel elemanlarından biridir. Hem doğal hem de tarımsal koşullar altında, bitkiler sıklıkla çevresel streslere maruz kalırlar. Dünya genelinde bitkisel üretimde ürün kaybının başlıca nedeni abiyotik streslerdir ve önemli tarımsal ürünlerin ortalama üretimini yaklaşık %50 azaltarak tarım endüstrisinin geleceğini tehdit etmektedir (Bray *et al.* 2000; Mahajan and Tuteja 2005).

Stres genellikle bitkinin yaşayabilirlik, verimlilik, büyüme (biyolojik kütle birikimi) ya da primer özümleme işlemlerine (CO₂ ve mineral alımı) dayanılarak ölçülmektedir (Taiz and Zeiger 2006). 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. Bazı durumlarda

bir bitkinin bütünü veya bir kısmı strese karşı dirençli olabilirken, diğer bazı kısımları ise strese daha duyarlı olabilmektedir (Hale and Orcutt 1987; Salisbury and Ross 1992; Taiz and Zeiger 2006). Birçok bitki, stresin öldürücü olmayan dozlarına maruz kaldıktan sonra strese daha dayanıklı olabilir. Bu olay kuvvetlenme (hardening) veya aklimasyon (uyum veya alışım) safhası olarak adlandırılır. Diğer bir yaklaşımla aklimasyon yeni bir çevreye maruz kalan bitkideki kalıtsal olmayan değişiklikler olarak tarif edilir (Kocaçalışkan 2004). Stresle alakalı diğer bir kavram adaptasyondur. Bu ise pek çok nesil boyunca seçim sonucu kazanılan, genetiksel olarak belirlenmiş direncin düzeyini belirtir (Taiz and Zeiger, 2006). Strese dayanıklılığın belli başlı iki tipinden birisi sakınma diğeri de toleranstır. Sakınma, dış çevrede stres oluşturabilecek koşullar olmasına rağmen, bitki hücrelerini stres altına sokmayan bir iç ortam sağlanmasıdır. Stres kavramı strese tolerans ile de yakından ilişkilidir. Stres toleransı bitkinin uygunsuz ortam koşulları ile başa çıkma potansiyelidir. Stres toleransı daha fazla tercih edilmekle birlikte, literatürde bu terimin yerine sıklıkla strese direnç terimi de kullanılmaktadır (Jones and Jones 1989; Mahajan and Tuteja 2005; Kocaçalışkan 2008).

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).

Düşük sıcaklık, bitkilerin yeryüzündeki dağılımını, gelişimini ve verimini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biridir (Pearce 1999; Janda *et al.* 2003; Turan 2007; Maestrini *et al.* 2009). Steponkus (1992), ekonomik öneme sahip bitkileri düşük sıcaklık zararından korumak için dünya genelinde yıllık olarak yaklaşık 100 milyon dolar harcanmasına rağmen, yıllık ekonomik kaybında 10 - 100 milyon dolar arasında olduğunu belirtmiştir. Düşük sıcaklık bitkilerde çimlenme, büyüme ve gelişme, reproduktif organlar ve hasat sonrası depolama süresi de dahil olmak üzere birçok olay üzerinde etkili olan çevresel bir

faktördür (Lyons 1973; Wang 1990). Örneğin dünyanın ortalama sıcaklığındaki 1 °C'lik düşüş çeltik üretiminde %40 oranında 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 1992).

Bitkilerin düşük sıcaklığa toleransları farklıdır. Tropik bölge bitkileri donma sıcaklığında yaşayamazken, bazı çok yıllık bitkiler ise -30 °C gibi sıcaklıklarda dahi yaşayabilmektedirler. (Thomashow 1999). Genel olarak bitkiler soğuk stresine karşı 3 farklı grupta toplanabilir.

1. Düşük sıcaklığa duyarlı olanlar: 12 °C sıcaklıkların altında zarar görürler.
2. Düşük sıcaklığa dayanıklı fakat donma sıcaklıklarına duyarlı olanlar.
3. Donma sıcaklıklarına karşı dayanıklı olanlar (Pearce 1999).

Tropikal ve subtropikal kökenli birçok bitki türü 12°C'nin altındaki sıcaklıklarda zarar gören, düşük sıcaklık ve donmaya duyarlı bitkilerdir. Ancak bazı ılıman bölge bitkileri düşük sıcaklıklara ve bunu izleyen donma sıcaklıklarına toleranslı bitkilerdir (Sutka and Galiba 2003). Bu grupta bulunan bitkilerin donma toleransını kazanabilmeleri için belli bir süre düşük fakat sıfırın üzerindeki sıcaklıklara maruz kalmaları gerekir. Bu evre “soğuk aklimasyonu” veya “soğuğa uyum” olarak bilinir (Lewitt 1980). Soğuğa uyum olayı doğal koşullarda sonbahar aylarında sıcaklıkların azalmasıyla başlar. Laboratuvar koşullarında ise bitkilerin 2-6°C sıcaklıklara belirli bir süre maruz bırakılmasıyla hızlandırılabilir. Maksimum donma toleransının sağlanması için gereken soğuğa uyum süresinin, bitki türüne göre birkaç gün veya birkaç hafta olduğu ve böylece bitkilerin -10 ile -60°C arasındaki sıcaklıklara tolerans kazanabilecekleri ileri sürülmüştür (Gilmour *et al.* 1988; Webb *et al.* 1994). Nitekim soğuğa uyum sağlamamış çavdar (*Secale cereale* L.) bitkisi -5°C'de ölürken, soğuğa uyum sağlandıktan sonra -30°C'de bile canlılığını

koruyabilmektedir. Bu durumda herhangi bir bitkinin düşük sıcaklığa verdiği metabolik cevaplar değerlendirilirken, bu bitkinin düşük sıcaklığa tolerans bakımından hangi gruba girdiği de göz önünde bulundurulmalıdır. Böylece fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonlarda meydana gelen değişimlerin hangilerinin düşük sıcaklığa duyarlılıktan kaynaklandığı hangilerinin soğuğa uyum sırasında gözlenen ve donma toleransının kazanılmasında rol oynayan faktörler olduğu da anlaşılabilir (Doğru 2006). 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 (Nishida *et al.* 1996; Tao *et al.* 1998; Thomashow 1999; Janda *et al.* 2003; Mahajan and Tuteja 2005).

Çevre sıcaklığının suyun donma noktasına yakın veya altına düştüğü durumlarda birçok bitkide üşüme veya 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 1990) 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.* 1995; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; 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; 2003; Taşgın *et al.* 2006).

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 Orcutt 1997). 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, 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).

Apoplast, hücre duvarı ile protoplazma arasındaki bölge olarak tanımlanır. Apoplast sadece hücrenin fiziksel yapısının dengelenmesinde değil aynı zamanda plazma membranı ile hücreler arası hava boşlukları arasında bir sıvı alanı oluşturur (Şekil 1.1). Apoplastik bölgedeki akıcı bileşenler hücre genişlemesi, farklılaşması, onarımı ve patojen saldırılarına cevapta önemli bir rol oynayarak plazmalemmmanın dış yüzeyi ile hücre duvarı arasındaki olayların koordinasyonunu sağlarlar (Vanacker *et al.* 1998a). 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 (Atıcı and Nalbantoğlu 2003):

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 yıllarda, 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 enzimatik antioksidan sistem (katalaz, peroksidaz, süperoksid dismutaz), hücresel hasarların ilk başladığı apoplastik bölgede reaktif oksijen türlerinin sistemli bir şekilde zararsız bir hale dönüştürülmesini 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). 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; Taşkın 2004). Son yıllarda yapılan çalışmalarda,

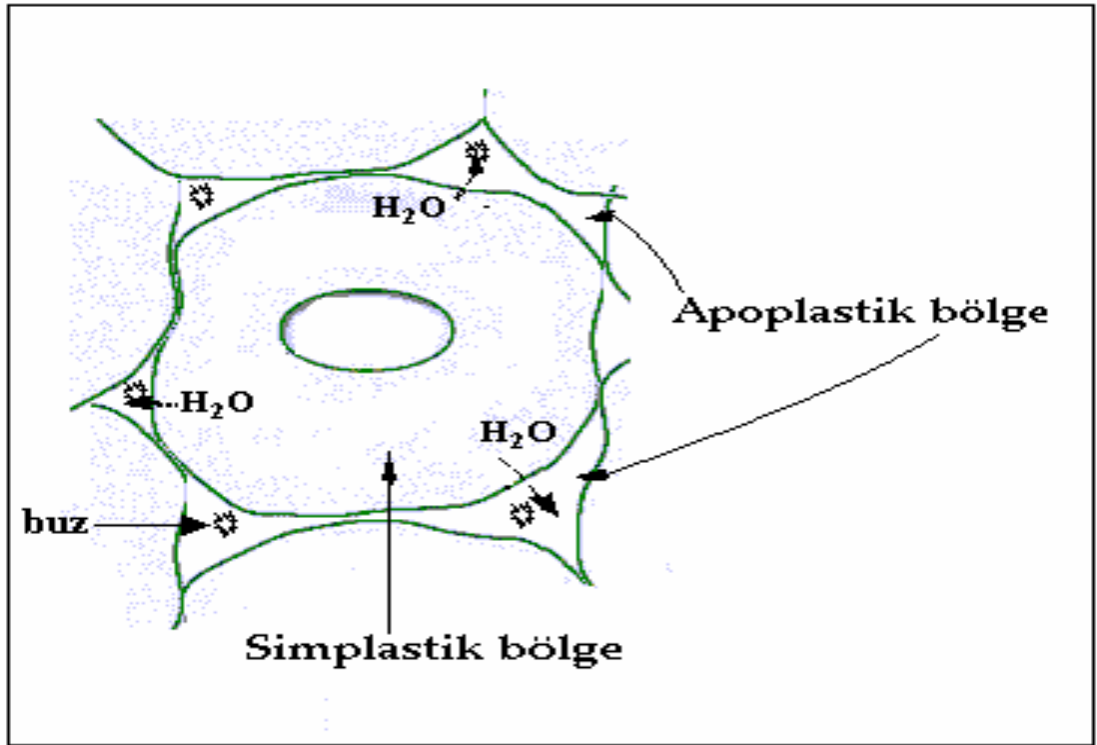
bitki antifriz proteinlerinin (AFP) bitkilerin apoplastik bölgelerinde bulunduğu ve donma noktasını düşürerek bitkinin soğuğa toleranslı olmasını sağladıkları belirlenmiştir (Ewart *et al.* 1999; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşgın 2004).

Bitkiler, donma sıcaklığına maruz kaldıklarında neler olabileceğinin bilinmesi için suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri ile donma olayının iyice bilinmesi gerekmektedir. Sıfır °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 hücrelerde farklı sıcaklıklarda donma ve erime gösterirler. Donma, süper soğuma gösteren bir çözeltide başladıktan sonra çözeltinin tamamı donuncaya kadar devam eder (Hale and Orcutt 1987; 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 (interselular sıvı) ve hücre dışındaki (ekstraselular sıvı) sıvılardan daha yoğun olduklarından dolayı osmotik potansiyelleri daha yüksektir. Bu nedenle hücre içerisinde donma noktası hücre dışı sıvılarına göre daha düşüktür (Hale and Orcutt 1987; Salisbury and Ross 1992).

Eğer çevre sıcaklığı suyun donma noktasının altına düşerse, bitkinin apoplastik bölgelerindeki (ekstraselular) çözeltiler aşırı düzeyde soğumaya başlar. İntraselular 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, su potansiyelinin düşük tutulmasıyla bir süre önlenabilir. Protoplazmanın dehidrasyon miktarı, hücre içerisindeki osmotik potansiyelin düşüşüne bağlı olarak artar. Bu esnada hücre içerisindeki su, hücre dışına (apoplastik bölgeye) pompalanır.



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 tolere edemezler. Çünkü apoplastik bölge donduktan sonra bile buz kristalleri, hücre çeper ve zarlarında dönüşümü olmayan hasara yol açabilir (Hale and Orcut 1987; Griffith *et al.* 1992; Salisbury and Ross 1992; Taşgın 2004).

Soğuk stresini de içine alan çevresel stresler hücrel redoks dengesini bozarak oksidatif zarara ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) fazla miktarda üretilmesine neden olurlar (Bolwell *et al.* 2002; Mittler *et al.* 2002; Asada 2006). Oksidatif stres süresince, ROT'lar bitki hücresinin mitokondri, kloroplast, peroksizom ve nukleus gibi farklı kısımlarında meydana gelerek hücrede zarar ve hatta ölüme bile neden olabilirler. Diğer taraftan, ROT'lar hücre içerisinde redoks sinyali ve antioksidan savunma mekanizmasını harekete geçirmede önemli rol oynarlar (Siddiqui *et al.* 2010). ROT'lar bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok reaktif moleküller olarak tanımlanabilir. Başka moleküllerle kolayca elektron alış-verişine girerek onların yapısını bozan bu moleküllere 'Serbest Radikaller, Oksidan Moleküller ya da Reaktif Oksijen Türleri' adı da verilir. Reaktif oksijenler iki gruba ayrılırlar;

Radikaller: Tek elektron eksikleri nedeniyle başka moleküller ile kolayca elektron alış-verişine giren oksidanlardır. Örneğin; süperoksit radikali, hidroksil radikali (Neill *et al.* 2002a).

Nonradikaller: Elektron eksikleri olmadığı halde başka moleküllerle radikallerden daha zayıf şekilde birleşebilen oksidanlardır. Örneğin; hidrojen peroksit (Neill *et al.* 2002a).

Singlet Oksijen (1O_2): Oksijenin yüksek enerjili formudur. Singlet oksijen, eşleşmiş iki elektron aynı orbitalde veya farklı orbitallerde zıt spinler halinde bulunduklarında oluşur. Eşleşmemiş elektronu bulunmadığı için radikal özelliği yoktur, ancak oksidan özelliği oldukça yüksektir (Desikan *et al.* 2005). Singlet oksijen çok çeşitli yollarla kimyasal veya fotokimyasal olarak üretilebilir. Bitkilerde singlet oksijenin üretildiği en iyi bilinen yol fotokimyasal olup, fazla miktarda ışık enerjisi absorblayan klorofilden oksijene enerji aktarılmasıyla ilgilidir. Yani asıl kaynağı fotosentez reaksiyonlarında elektron transport sistemindeki klorofil pigmentleridir (Foyer *et al.* 1997; Güler 2008). 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. $^1\text{O}_2$ birçok organik molekülle reaksiyona girdiğinden yüksek oranda yıkıcıdır ve canlı organizmada hasara neden olan başlıca oksijen türlerinden biridir. (Cadenas 1989; Durmuş 2003). Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksit radikalini oluşturur ve hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) 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 2003; Mutlu 2005, 2009; Erdal 2010).

Süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$): Moleküler oksijen (O_2) bir elektron alarak kararsız bir yapı olan süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) anyonuna dönüşmektedir. Süperoksit anyonu enzimatik ya da enzimatik olmayan reaksiyonlarla meydana gelebilir. Bu radikal oldukça reaktiftir ve lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin oksidasyonuna da sebep olur. Bu radikalın lipid peroksidasyon, membran hasarı, hücrel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırıklarına sebep olduğu belirtilmiştir (Fridovich 1995; Desikan *et al.* 2005; Asada 2006). Süperoksit radikali 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 (Elnster 1982; Halliwell 1984; Halliwell and Gutteridge 1999). Ayrıca süperoksit anyonu nitrik oksit ile reaksiyona girerek daha az zararlı bir reaktif olan peroksinitriti oluşturur (Delledone *et al.* 2001; Desikan *et al.* 2005).

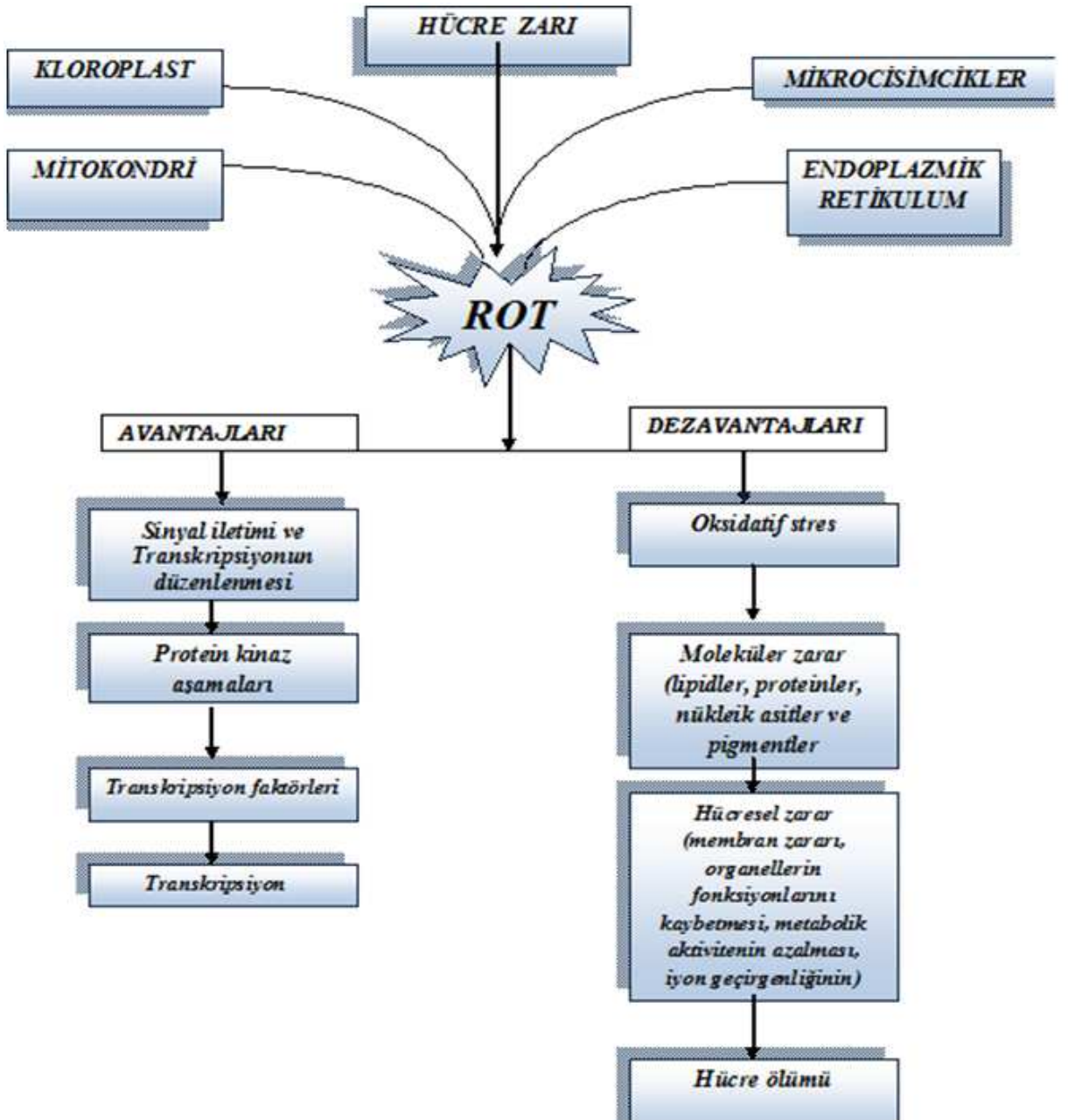
Süperoksit grubuna göre daha az etkili olan hidrojen peroksit (H_2O_2), oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur. Süperoksitin olduğu yerlerde (peroksizomlar, elektron taşıma zinciri, plazma 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 radikalının 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 (Aust *et al.* 1985; Sigel and Sigel 1999; Halliwell 2006). Bu görevi katalaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzimler H_2O ve O_2 gibi ürünlere dönüştürerek yerine getirir. Oksidatif streslere tolerans sağlamada bitkilerin bu enzimlerin hücresel seviyelerini düzenlenmesi oldukça önemlidir (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003a).

Hidroksil radikali ($\cdot OH$): Oksijen radikalleri içerisinde en aktif ve en toksik olanıdır. (Elstner 1982; Baskin and Salem 1997; Sigel and Sigel 1999; Kehrre 2000). Üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun (x-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluştuğu gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilir (Stahl and Sies 2002). Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\cdot OH$, 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 radikalının 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 (Girotti 1985; Nishiyama *et al.* 1998).

Reaktif oksijen türleri (ROT) lipid, protein, karbohidrat ve nükleik asitler gibi hücrelerin temel bileşenleri üzerinde etkili olurlar. Özellikle çift bağların bulunduğu doymamış yağ asitlerini içeren lipidler, ROT'lar ile kolayca reaksiyona girmektedirler (Blokhina *et al.*

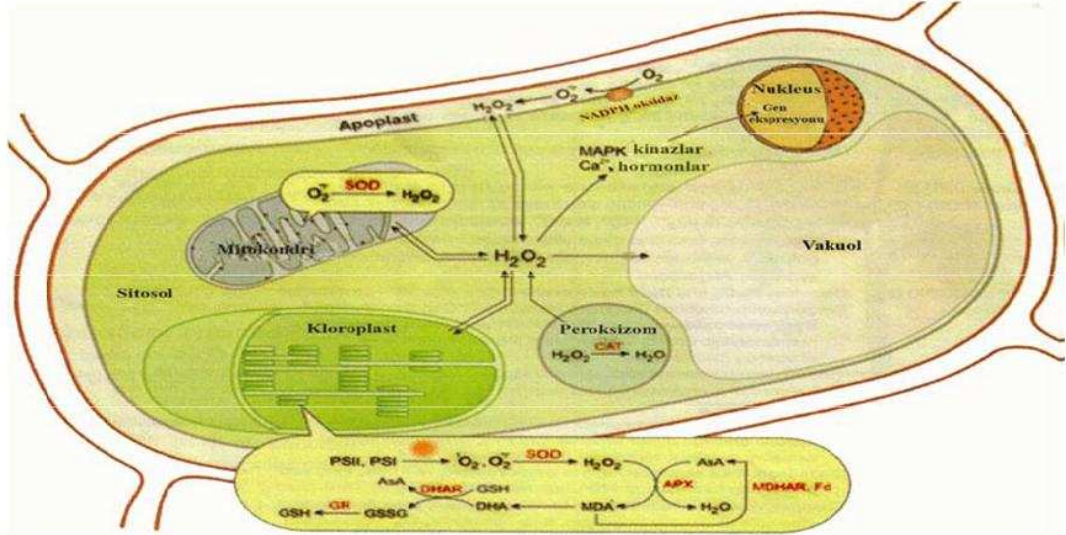
2003; Halliwell 2006; Mittler 2006). Membran yapısı ve fonksiyonu üzerinde ROT'ların etkilerinin en çok araştırılanlarından birisi lipid peroksidasyonudur (Blokhina *et al.* 2003).



Şekil 1.2. Reaktif oksijen türlerinin üretim yerleri ve biyolojik sonuçları (Ahmad *et al.* 2008).

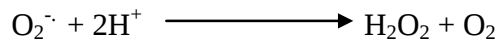
Lipid peroksidasyonu (LPO) doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımıdır. Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. LPO ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Heath and Packer 1968; Girotti 1985; Akkuş 1995; Halliwell and Gutteridge 1999). Biyolojik sistemlerde LPO'yu başlatan serbest radikallerin, süperoksit anyonu ile özellikle hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidinin radikal özelliği kazanmasına neden olmaktadır. 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). Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir. Lipidhidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak reaktif olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehid (MDA) meydana gelir (Heath and Packer 1968; Girotti 1985; Yılmaz and Ozan 2003; Li *et al.* 2006). 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, tiobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu çözeltinin absorbans değerlerinden LPO'nun derecesi saptanmaktadır.

Bitki hücreleri ROT miktarını kontrol etmek ve stres koşullarında hücreleri artan ROT etkisinden korumak için ROT'u temizleyen bazı enzimler ihtiva ederler. Antioksidan enzimler olarak adlandırılan bu enzimler reaktif oksijen türlerini kademeli bir şekilde daha az toksik olan bileşiklere parçalayarak temizlerler. Bu enzimlerin başlıcaları süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidazdır (Halliwell 2006; Ahmad *et al.* 2008).



Şekil 1.3. Bitki hücrelerinde antioksidan savunma sistemleri (Gechev *et al.* 2006; Eryılmaz, 2007).

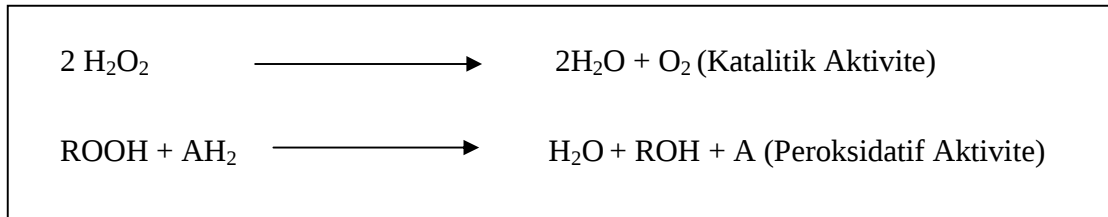
Süperoksid dimutaz (SOD) (E.C.1.15.1.1) enzimi, süperoksid radikalinin ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen metal içeren bir enzimdir (Sairam and Srivastava 2000; Eyidoğan *et al.* 2003; Minibaeva and Gordon 2003).



SOD'un biri sitoplâzmada, diğeri mitokondride olmak üzere iki izoenzimi vardır. Ökaryotlardaki mitokondriyal SOD, karakteristik Mn^{+2} muhtevası ve amino asit dizilişi bakımından birçok bakterininkine benzer. Buna karşılık sitoplazmadaki ise, tamamen farklı yapıya sahiptir ve Cu^{+2} ile Zn^{+2} iyonu ihtiva eder. SOD, süperoksidin parçalanmasını sağlayarak metallerin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonuyla hidroksil radikali oluşum riskini azaltır. ROT'a karşı antioksidan savunma sisteminin ilk hattı olan ve bütün aerobik organizmalarda ve aktifleşmiş oksijen üreten bütün hücre alt yapılarında bulunan bu enzimin aktivitesinin çeşitli streslere cevap olarak arttığı ve bu artışların strese karşı

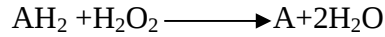
dirençle bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Bowler *et al.* 1991; Van Camp *et al.* 1994; Foyer *et al.* 1995; Apel and Hirt 2004).

Katalaz (CAT) (E.C.1.11.1.6); 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.



En yüksek hızla reaksiyon veren enzimlerden biridir. Bir molekül katalaz, bir saniyede milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü su ve oksijene dönüştürür (Dhindsa *et al.* 1981; Scandalios 1994; Willekens *et al.* 1997). CAT'ın bitki dokusunda H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Patykowski 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 (1O_2) ve hidroksil radikallerinin ($OH^\cdot$) potansiyel kaynağıdır (Scandalios 1993; Chaudiere and Ferrari 1999). CAT kararlı bir enzim değildir. Yüksek ışık yoğunluğu ve strese maruz kalan bitki hücrelerinde oluşan H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarıyla inhibe edilebilir (Streb *et al.* 1993). H_2O_2 'ye olan zayıf afinitesi ve sadece peroksizomlarda bulunması (çok az miktarda mitokondri matriksinde bulunurlar) CAT'ın etkinliğini azaltmaktadır (Asada 1992; Scandalios 1993).

Peroksidaz (POD) (E.C.1.11.1.7); 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). Peroksidazların pek çok fizyolojik olayla ilişkisi olduğu ve metabolizmada aktif bir rol oynadığı belirlenmiştir (Bunkelmann and Trelease 1996; Laloue *et al.* 1997; Erdei *et al.* 2002; Durmuş 2003). Stres altındaki bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Asada 1992). POD, elverişsiz çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve bitki hücresinin en önemli koruyucu enzimlerinden birisidir (Bakardjieva and Christov 1996; Dehon *et al.* 2002). Molekül ağırlıkları 35-100 kDa arasında değişmektedir. POD'lar hidrojen vericisi olarak birçok organik ve inorganik substratı (AH_2) kullanarak H_2O_2 'yi temizlerler. Aşağıdaki reaksiyonu katalizlerler.



Sonuç olarak peroksidazlar hidrojen peroksidi kontrol altında tutarak hücre duvarının yapısına katılmasını sağlarlar. Mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, çeşitli stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenen POD aktivitesi, bu enzimin stres enzimi olarak anılmasına sebep olmuştur (Whetten *et al.* 1998; Amaya *et al.* 1999; Rout *et al.* 2000; Jaleel *et al.* 2008).

Bitkilerin abiyotik strese yanıtında en önemli düzenleyici absisik asit (ABA)'tir (Davies 1995). ABA bitki büyüme ve gelişmesinin düzenlenmesinde rol alan bir hormondur (Neill and Burnet 1999). ABA, 15 karbonlu zayıf bir asit olup ilk olarak 1960'ların başında büyümenin baskılayıcısı olarak belirlenmiştir. Pamuk bitkisinin dökülen meyvesinde ve ışık periyodu ile uyku haline gelmesi için uyarılmış firavun inciri ("sycamore") ağacının yapraklarında gösterilmiştir (Rock 2000; Finkelstein *et al.* 2002). Bitki büyüme ve embriyo olgunlaşması, tohum uyku hali, çimlenme, hücre büyümesi ve uzama gibi gelişimi içine alan ve kuraklık, tuzluluk, soğuk, patojen saldırısı ve ultraviyole ışınlarına karşı çevresel streslere yanıtta düzenleyici olduğu gösterilmiştir (Brocard-Gifford *et al.* 2003; Brocard *et*

al. 2004). Yıllarca büyümenin baskılayıcısı olarak bilinmesine rağmen ABA'nın, genç dokularda da yüksek miktarlarda bulunduğu belirlenmiş ve ABA sentezi yapamayan mutant bitkilerde terleme ve turgor yeteneklerinin kaybolduğu gösterilmiştir. Dışarıdan ABA uygulaması ile normal hücre gelişimi ve büyümesi sağlanarak mutantlardaki bu durum ortadan kaldırılmıştır. (Finkelstein *et al.* 2002; Keskin 2006).

ABA; kuraklık, düşük sıcaklık, yüksek sıcaklık ve tuzluluk gibi abiyotik strese yer alır ve bu stres şartlarına bitkilerin yanıtının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. ABA; O_2^- ve H_2O_2 gibi ROT'ların artmasına neden olur (Jiang and Zhang 2004). Ayrıca ABA enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sisteminin kapasitesini artırır ve antioksidan genlerin ifadesini uyarır (Zhang and Jiang 2002). Bitkiler çevresel strese maruz kaldığı zaman stomaların kapanmasına ve stresle ilgili birçok genin ifadesinin uyarılmasına neden olur (Thompson *et al.* 2000). Son yıllarda, antioksidan savunmanın uyarılmasında ABA'nın rolü olduğuna ilişkin çalışmalar yapılmıştır (Jiang and Zhang 2003; Keleş and Ünyayar 2004). Bitkilerin metabolizmalarının düzenlenmesinde özellikle hücrenin hayatta kalması ve metabolik durgunluğun olduğu durumlarda ABA'in etkisi olmaktadır (Güzel 2006).

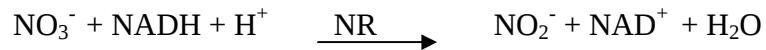
Kuraklık, tuz ve soğuk stresi, ABA'nın biyosentezinin artmasına ve birikimine yol açmakta ve biriken ABA, stresin etkisiyle yıkıma uğratılmaktadır (Ingram and Bartel 1996; Koornneef *et al.* 1998; Cutler and Krochko 1999; Liotenberg *et al.* 1999; Rock 2000; Taylor *et al.* 2000).

ABA, C40 öncül beta karotenden sentezlenir. Kuraklık, soğuk ve tuz gibi çevresel streslerle biyosentezin artması sonucunda ABA birikimi gerçekleşir. Stres koşulu altında bulunmayan bitki hücrelerinde ABA çok düşük oranlarda bulunur (Keskin 2006).

Düşük miktardaki ABA, normal bitki büyümesi için gereklidir. ABA yönünden mutant bitkilerde dışarıdan verilen ABA ile büyümenin yabani tip düzeyine gelebildiği gözlenmiştir (Finkelstein *et al.* 2002).

Canlılar, toprak ve atmosferde inorganik formda bulunan temel ve iz elementlerini gıda kaynağı olarak kullanırlar. Bu gıda kaynaklarından birisi de azottur. Çoğu bitki büyüyebilmek için azotu topraktan nitrat ve amonyum formunda alırlar (Solomonson *et al.* 1990). Bitkiye alınan nitrat iyonlarının bitkide amonyuma indirgenmesi gerekir. Çünkü azotun organik maddelerin yapısına katılmasının yolu amonyumdan geçer. Nitrat indirgenmesinde iş gören anahtar enzim niteliğindeki nitrat redüktaz (NR) molekülü filavin adenin dinükleotid (FAD), Sitokrom (sit.) ve molibden içeren prostetik gruplara sahiptir (Pattanayak and Chatterjee 1999; Lea *et al.* 2004). Birkaç saatlik yarılanma süresine sahip olan enzim (Marschner 1995), yüksek bitkilerin sitoplazmasında lokalize olmuştur ve elektron verici olarak ya nikotin adenin dinükleotid (NADH) veya nikotin adenin dinükleotid fosfat [NAD(P)H]'a ihtiyaç gösterir (Haynes 1986; Solomonson and Barber 1990; Marschner 1995; Campbell 1999).

Absorblanan nitrat (NO_3^-), nitrat redüktaz (NR) ve nitrit redüktaz (NiR) ile amonyuma indirgenir (Solomonson *et al.* 1990). NR (E.C. 1.6.6.1), NADH'dan 2 elektronu alarak nitrati nitrite (NO_2^-) ve NADH'ı da NAD^+ 'ya dönüştürür. Bu reaksiyon aşağıda gösterildiği gibidir (Lea *et al.* 2004).



Bu reaksiyon sitosolde meydana gelmektedir. Daha sonra nitrit sitozolden, yapraklarda kloroplastlara ve köklerde proplastidlere gönderilir. Burada da nitrit, NiR ile amonyuma indirgenir (Solomonson *et al.* 1990; Oral 2003).

NR aynı zamanda bitkilerde içsel olarak üretilen bir sinyal molekül olan nitrik oksit de enzimatik bir kaynağı olarak görev yapmaktadır (Yamasaki and Sakihama 2000; Rockel *et al.* 2002; Zhao *et al.* 2009). NR eksikliği olan mutant soya fasulyesi yapraklarında NO üretiminin olmadığı ancak mutant olmayanlarda ise NO üretimi için anahtar enzim olarak NR'nin indüklendiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada NR aktivitesinin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmış ve bu aktivitenin pH 6.75 de NAD(P)H bağımlı ve siyanüre duyarlı olduğu belirtilmiştir (Dean and Harper 1986).

Uzun yıllardan beri canlılarda varlığı bilinen nitrik oksit (NO: azot monoksit), son yıllarda hem memelilerde hem de bitkilerde anahtar haberci molekül olarak dikkatleri üzerine çekmiştir (Lamattina *et al.* 2003; Wendehenne *et al.* 2004; Unsal and Arısan 2009). 1992 yılında Amerikan Bilim Gelişimi Kuruluşu tarafından ABD'de yılın molekülü seçilmiştir (Neill *et al.* 2003). 1998 yılında ise Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, Ferid Murad isimli araştırmacıların “kardiyovasküler sistemde bir sinyal molekül olarak nitrik oksit” konulu araştırmaları ile fizyoloji ve tıp alanında nobel ödülünü kazanmışlardır (Nobelprize.org 2011). Aynı yıl, NO'nun bitki savunma sinyali olarak da tanımlanmasından sonra, NO ve bitki biyolojisi ile ilgili çalışmalarda kayda değer bir artış olmuştur (Durner and Klerissig 1999; Beligni and Lamattina 2001; Wendehenne *et al.* 2001; Neill *et al.* 2002b, 2003).

NO, normal koşullarda bitki hücrelerinde az miktarda sentezlenip salınmaktadır (Wildt *et al.* 1997). NO sentezi bitki türüne, dokusuna, içinde bulunduğu yetiştirme koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Barroso *et al.* 1999; Pedroso *et al.* 2000a). Bitkilerde NO enzimatik ve enzimatik olmayan iki farklı metabolik yol ile sentezlenmektedir. Bitki hücrelerinde NO

üretim yeri sitozol, nukleus, peroksizom matriksi ve kloroplastlardır (Aytamka 2005). Enzimatik yollardan biri olan ve memelilerdeki nitrik oksit sentaz enzimine (NOS) benzeyen ancak henüz tam olarak tanımlanmamış bir enzim ile bitki hücrelerinde L-argininin katalizlenmesi sonucu NO oluştuğu kabul edilmektedir (Ninneman and Maier 1996; Neill *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2009; Unsal and Arisan 2009). Bitkilerde NOS'un kloroplast ve peroksizomlarda bulunduğu da rapor edilmiştir (Barroso *et al.* 1999; Pedroso *et al.* 2000b). Kuo *et al.* (1995) fare NOS antikollarını kullanarak buğday tohumlarında NOS varlığını göstermişlerdir. Ayrıca bu yöntem kullanılarak bezelye, buğday ve mısır bitkilerinde de NOS varlığı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Sen and Cheema 1995; Riberio *et al.* 1999). Ninneman and Maier (1996) tarafından yüksek bitkilerde işaretlenmiş sitrullin oluşumunun gösterilmesinin yanı sıra, L-NNA (NG-nitro-L-arjinin) ve L-NAME (NW-nitro-L-arjinin metil ester) gibi inhibitörler kullanılarak NOS aktivitesi kanıtlanmıştır. Bütün bu verilere rağmen, bazı bitkilerin yaprak ekstratlarında ve dokunulmamış dokularda NOS inhibitörlerinin, NO sentezi üzerine hiçbir etkisi olmadığını savunan araştırmacılar da bulunmaktadır (Clarke *et al.* 2000; Rockel *et al.* 2002). Diğer bir enzimatik yolda ise yüksek bitkilerde nitrat asimilasyonu için anahtar enzim olan ve nitratın nitrite dönüşümünü katalizleyen nitrat redüktaz (NR), nitritten NO'yu oluşturmaktadır. NR'nin siyanüre duyarlı olduğu, optimum pH 6,75 de nitritten NAD(P)H'ı kullanarak *in vitro* ve *in vivo* koşullarda NO'yu ürettiği kanıtlanmıştır (Harper 1981; Dean and Harper 1986; Yamasaki and Sakihama 2000). NO'nun başka bir enzimatik üretim yolu ise ksantin oksiredüktaz (XOR) enzimi aracılığıyla üretilmesidir (Harrison 2002). XOR bir katalitik reaksiyon oluşturarak serbest radikal üretir. Moleküler oksijen ve NO üretimi özelliği sayesinde XOR, bitki hücrelerinde sinyal moleküllerinin kaynağı olarak önemli bir rol oynar (Corpas *et al.* 2004; Unsal and Arisan 2009). Enzimatik olmayan yolda asidik pH'da askorbat, dehidroaskorbik asit ve NO'yu sentezlemek üzere nitros asitle reaksiyona girer (Weitzberg and Lundberg 1998). Apoplastik alanlarda ve kloroplastlarda meydana geldiği bilinen NO'nun varlığı, enzimatik olmayan yol ile NO₂'nin askorbik asitle (pH: 3-6) kimyasal olarak indirgenmesi sonucu arpa alevron hücrelerinde gösterilmiştir (Henry *et al.* 1997; Horemans *et al.* 2000;

1999; Neill *et al.* 2002a). NO, tek başına yüksek konsantrasyonlarda dahi hücrelere zarar vermez ancak hücrelerde kontrolsüz üretim ile artan NO, süperoksit anyonları ile reaksiyona girerek peroksinitriti meydana getirmesi sonucunda toksik etki göstermektedir (Pryor and Squadrito 1995; Yamasaki *et al.* 1999; Stöhr and Ullrich 2002; Kerkütlüoğlu 2007). NO'nun reseptör molekülleri aktive etmediği, bunun yerine birkaç farklı mekanizma yolu ile hedef moleküllere kovalent olarak bağlanmak suretiyle hücrelerin yaşaması için temel biyokimyasal süreçlerden biri olan mitokondrilerdeki solunumu baskıladığı, demir sülfür içeren enzimlerle ilişkiye girerek bunların etkinliğini engellediği ve DNA' da yıkımlara yol açtığı da bilinmektedir (Van der Viet *et al.* 1996; Stöhr and Ullrich 2002).

Birçok biyolojik süreçte görev alan NO hem bitki savunma mekanizmasında bir sinyal molekül olarak hem de büyüme ve gelişmede hormonal özelliklere sahip bir bileşik olarak rol oynamaktadır (Leshem and Haramaty 1996; Beligni and Lamattina 1997; Delledonne *et al.* 1998; Beligni and Lamattina 1999a). Bitki büyümesi üzerine NO'nun etkilerinde konsantrasyonun son derece önemli olduğu vurgulanmıştır (Anderson and Mansfield 1979; Leshem *et al.* 1997; Pedrosso *et al.* 2000b; Zottini *et al.* 2002). NO'nun yüksek konsantrasyonlarının (40-80 ppm) domates, marul ve bezelye bitkisinde büyümeyi inhibe ettiği, düşük konsantrasyonlarının (0-20 ppm) ise büyümeyi teşvik ettiği ileri sürülmüştür (Hufton *et al.* 1996; Leshem and Haramaty 1996). Eksojen olarak uygulanan NO veya NO dönörlerinin, patojen (Durner *et al.* 1998; Delledonne 2005), ışık (Beligni and Lamattina 2001), yerçekimi (Pedrosa and Durzan 2000) ve oksidatif strese (Beligni and Lamattina 1999b, 2001; Huang *et al.* 2002; Xing *et al.* 2004; Zhao *et al.* 2004; Shi *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2009) karşı bitki cevaplarını etkilemektedir. Stres koşulları altında sinyal iletim yolunda görev alan NO reaktif oksijen türleri ile karşılıklı etkileşim halindedir. NO tarafından lipid peroksidasyonunun inhibisyonu, NO'nun potansiyel antioksidan rolünü işaret etmektedir (Beligni and Lamattina 1999a; Boveris *et al.* 2000; Vranova *et al.* 2002; Siddiqui *et al.* 2010). Eksojen olarak uygulanan NO, antioksidan enzimlerin aktivitelerine etki ederek süperoksit anyonunu elimine eder ve bitkiyi oksidatif zarardan korur (Shi *et al.* 2007).

Son yıllarda bitkilerde varlığı saptanan önemli bir haberci molekül olan NO, pek çok fizyolojik ve biyokimyasal olayda rol oynadığı bilinmesine rağmen, etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır ve bu konuda doyurucu bir açıklama yapılamamıştır. Yapılan literatür incelemelerinde biyotik ve abiyotik stres faktörleri ve NO arasında da bir ilişkinin olduğu bilinmekle birlikte, soğuk stresi ve NO etkileşimi ile ilgili çalışmalar hakkında oldukça sınırlı sayıda kaynak mevcuttur.

İnsanoğlunun kültüre aldığı en eski tarla bitkilerinden biri olan mısır (*Zea mays* L.), dünyada yaygın olarak yetiştirilen Poaceae (Gramineae) familyasından önemli bir tahıl bitkisidir (Kaya 2008). Monokotillerden, bir yıllık, dayanıklı tahıl ve kültür bitkisi olan mısırın radikuladan gelişen ana kök ve çok sayıdaki yan köklerden oluşan iyi gelişmiş, kalın ve bol saçaklı, ağsı yapıda bir kök sistemi vardır. Tahıl bitkileri içerisinde buğday ve arpadan sonra en geniş ekim alanı ve üretime sahip olan mısır 585 bin ha ekim alanı, 2.5 milyon ton üretim ve 425 kg/da tane verimi ile Türkiye tarımında önemli bir yere sahiptir ve özellikle Marmara ve Karadeniz Bölgeleri'nde yaygın olarak yetiştirilmektedir (Süzer 2004). Günümüzde çok sayıda kullanım alanı olan ve önemi giderek artan mısır, yüksek verim alınabilen bir tarla bitkisi olarak diğerlerinden farklılık göstermektedir. Mısır sahip olduğu zengin besin maddeleri nedeniyle hem insan, hem de hayvan beslenmesi bakımından çok değerli ve kullanım çeşitliliği olan bir üründür. Gerek dünyada ve gerekse Türkiye'de bitkisel kökenli proteinlerin yeterli ve ekonomik üretimi için büyük önem taşıyan mısırın tanesinden elde edilen nişasta, glukoz ve mısırozü yağı da ekonomide hammadde olarak kullanılmaktadır (Süzer 2004). Mısır tarımı için en uygun toprak tipi; su tutma ve besin maddesi depolama kapasitesi iyi olan, kolay islenir, iyi drenaj ve havalanma özelliği dolayısıyla milli-killi topraklardır (Süzer 2004). Mısır, fenolik asitler, fitoöstrojenler ve flavonoidler açısından da zengin bir bitkidir (Eryılmaz 2007).

Bu çalışma planlanırken, bitkilerde soğuk stresi cevabında meydana gelen metabolik değişikliklerde haberci molekül olan NO'nun rollerini saptamak ve literatür için yeni ve tamamlayıcı bilgiler elde etmek amaçlanmıştır.

Yukarıdaki literatür bilgisi ışığı altında NO'nun, soğuğa hassas bitkilerin soğuk stresi cevabında koruyucu bir rolünün olabileceği hipotezi ileri sürülmüştür. Bu hipotezi test etmek için düşük sıcaklığa hassas mısır bitkisinin soğuk stresine maruz kaldığında, apoplastik ve hücrel bölgelerinde oluşan cevap ve bu cevabın oluşumunda nitrik oksitinin etkileri çalışılmıştır. Çalışmanın amacına ulaşabilmesi için dışarıdan sodyum nitro prussid (SNP) (NO dönörü) uygulanmış ve uygulanmamış ve daha sonra soğuğa maruz bırakılmış mısır bitkilerinde %donma hasarı, apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktiviteleri, apoplastik ve hücrel antioksidan enzim aktiviteleri, H_2O_2 ve O_2^- miktarları, lipid peroksidasyon seviyesi, NR aktivitesi, içsel NO ve ABA miktarları ile apoplastik ve hücrel proteinlerin SDS-PAGE elektroforez yöntemiyle profillerini belirleme deneyleri yapılmıştır. Çalışmada ayrıca bitkilerin soğuk hasarından korunmasında, NO'nun en etkili olduğu konsantrasyonu ve etki süresi belirlenmiştir. Bu çalışmada, NO'nun apoplastik ve hücrel bölge üzerindeki etkisinin belirlenmesi, soğuğa hassas bitkilerin soğuğa cevap mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Ayrıca, NO'nun soğuk zararından korumada etkili olduğu konsantrasyonu ve etki süresinin belirlenmesi, NO'nun tarla şartlarında uygulanabilirliği üzerine katkı sağlayacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Literatür de düşük sıcaklığın bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerini gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Ancak NO'nun düşük sıcaklığa tolerans sağlamadaki etkisi ile ilgili çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızın bu açıdan literatürdeki önemli bir boşluğu dolduracağını düşünüyoruz.

Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada, soğuğa dayanıklı bitkilerin soğuk stresine karşı tolerans sağlamak için özel mekanizmalar geliştirdikleri çok sayıda araştırmacı tarafından ileri sürülmüştür (Griffith 1997; Hoshino 1999; Ewart 1999; Yu and Griffith 2001; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşgın *et al.* 2006; Mutlu 2009). Kışlık bitkilerde soğuk toleransının artması, düşük sıcaklığa belirgin bir uyum (aklimasyon) periyodundan sonra gelişir. Bu peryod, birçok farklı mekanizmanın yanında, düşük sıcaklıkta sentezi artan proteinlerin birikimini de sağlar. Bu proteinlerin bazıları, donmadan koruyucu kriyoproteinler, kinaz regülatörleri, dehidrin içerenler ve intraselüler olanlardır (Jarillo 1994; Close 1997; Wisniewski 1999; Mutlu 2009). 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; Taşgın *et al.* 2006; Morsy *et al.* 2007). Soğuğa tolerans mekanizmaları olarak değerlendirilen bütün bu cevap mekanizmaları, bitkilerde soğuk stresi esnasında, donma hasarını azaltmaya, bitki apoplastında donmanın kontrol altına alınmasını (buz nükleasyon aktivitesi) ve düşük sıcaklık esnasında bozulan antioksidan sistemin düzenlenmesiyle bitkinin soğuk zararından kurtulmasını amaçlamaktadır. Yukarıda sayılan soğuğa cevap mekanizmaları ile ilgili daha önce yapılan çalışmalar ve bu çalışmalardan elde edilen belirgin sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

Sala (1998), düşük sıcaklığın depolanmış 4 çeşit mandalina türünde donma hasarının tolerant türlere nazaran duyarlı türlerde daha fazla olduğunu belirlemiştir. Chang *et al.*

(2001) *Mung bean* bitkisinin soğuk şartlarda (4°C) bekletilmesi halinde, bekleme süresi uzadıkça donma hasarının arttığını gözlemlemiştir. Kışlık çavdar, karalahana ve kışlık buğday ile yapılan çalışmalarda, bitkiler bir aklimasyon periyodu boyunca düşük sıcaklıklarda yetiştirilmiş ve düşük sıcaklıklara aklime olan bitkilerde, aklimasyon yapılmayan kontrol bitkilerine göre, donma hasarının azaldığı tespit edilmiştir (Marentez *et al.* 1993; Atıcı and Nalbantoğlu 1999a; Taşgın *et al.* 2003).

Literatürde NO'nun bu anlamda uygulamaları ile ilgili bazı çalışmalar bulmak da mümkündür. Soğuğa dayanıklı yabani hardal (*Chorispora bungeana*) süspansiyon kültürünün 25, 4 ve 0 °C sıcaklıklara maruz bırakıldıktan sonra ortama ilave edilen NO'nun, soğuk ile artan iyon geçirgenliğinin azaldığı belirtilmiştir (Liu *et al.* 2010). NO'nun bitkilerde donma hasarı üzerinde etkisini belirleyen herhangi bir çalışma mevcut değildir. Ancak bazı çalışmalarda NO'nun stres şartları altında, membranlarda elektrolit sızıntısını azalttığına dair veriler bulunmaktadır (Beligni and Lamattine 1999a; Laspina *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2009; Wang *et al.* 2011).

Apoplastik bölgede buz nükleasyon aktivitesi üzerine düşük sıcaklığın etkisi ile ilgili literatürde pek çok araştırma mevcuttur. Buz nükleasyon aktivitesi su içinde çözünebilen apoplastik proteinlerin suyun donma noktasını düşürme ve buz oluşumunu kontrol edebilme olarak bilinir (Atıcı and Nalbantoğlu 1999a). Kışlık ve yazlık çavdar ile buğday, kışlık arpa, karalahana ve bezelye yapraklarının apoplastik bölgelerinde (ekstraselular bölge) 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 gibi soğuğa toleranslı oldukları bilinen bitki yapraklarından ekstrakte edilen apoplastik sıvıdaki proteinlerin buz nükleasyon aktivitesini artırdıkları, diğer bir deyimle donma noktasını geciktirdikleri belirlenmiştir (Marentez *et al.* 1993; Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b; Taşgın *et al.* 2003). Özellikle kışlık buğdayda aktivitenin önemli derecede artırıldığı tespit edilmiştir (Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b). Yaptığımız literatür çalışmalarına göre,

NO'nun bitkilerde apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi üzerinde etkisini araştıran herhangi bir çalışma mevcut değildir. Böyle bir çalışma, ilk kez bu tezde araştırılmıştır. Literatürde ayrıca NO'nun bitkilerin apoplast bölgelerinde üretildiğini belirten çalışmalar da mevcuttur. Arpada (*Hordeum vulgare*) alevron tabakasının apoplastlarında enzimatik olmayan yolla NO₂ den NO üretildiği rapor edilmiştir (Bethke *et al.* 2004). Bu durum NO'nun apoplastik bölgedeki proteinler üzerine etkisi olabileceğinin bir göstergesi olabilir.

Bitkilerde hem apoplastik hem de hücrel proteinlerin profillerinin belirlenmesi üzerine çalışmalar mevcuttur. 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 and Duman 2002; Pudney *et al.* 2003; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşkın *et al.* 2006). Soğuğa akline 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 edilmiş ve bunlar doğal elektroforezle 9 banda ayrılmıştır. (Yu and Griffith 2001). Kışlık buğday yaprağına ait apoplastik proteinler SDS-PAGE'de yürütüldüğünde, soğuk şartlarında polipeptidlerin band şiddetinin arttığı gözlenmiştir (Atıcı and Nalbantoğlu 1999b; Taşkın *et al.* 2006). Arpanın düşük sıcaklığa hassas ve dayanıklı iki türünün apoplast bölgesindeki protein profillerinin düşük sıcaklık etkisiyle bazı bandların şiddetinin arttığı belirlenmiştir (Mutlu 2009).

NO'nun hem apoplastik hem de hücrel kısmında düşük sıcaklık altında protein profillerinin nasıl değiştiği ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Ancak tuz stresi altında dışsal olarak uygulanan NO'nun arpanın hücresel protein profillerinde bazı önemli değişiklikler yaptığı belirlenmiştir (Li *et al.* 2008).

Nitrik oksitin (NO) stres şartlarında bitki hücrelerinde içsel olarak arttığına dair bazı çalışmalar mevcuttur. Tuzluluk stresinde içsel olarak arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) peroksizomlarında (Corpas *et al.* 2009) ve UV-B stresi altında *arabidopsis*'te (Meckerness *et al.* 2001; Wang *et al.* 2006) NO miktarının arttığı belirlenmiştir Buna paralel olarak, *arabidopsis*'te soğuk uyumu süresince NR'ye bağımlı NO üretiminin arttığı belirlenmiştir (Zhao *et al.* 2009). Diğer bazı bitkilerle yapılan çalışmalarda da örneğin, kuraklık stresi altındaki bezelye, buğday ve tütünde içsel NO üretiminin arttığı rapor edilmiştir (Leshem and Haramaty 1996; Gould *et al.* 2003; Kolbert *et al.* 2005). Yüksek sıcaklık stresinde de bakla bitkisinde içsel olarak NO miktarının önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Leshem *et al.* 2000). Diğer taraftan, NO'nun stres şartlarında bitki hormonlarından absisik asit (ABA) ile iyi bir kolerasyon sağladığına dair bazı çalışmalar bulunmaktadır. Kuraklık stresi altındaki buğdayda NO tarafından uyarılan ABA üretiminin, stoma kapanmasını sağlayarak kuraklığa karşı tolerans sağlamada etkili olabildiği ileri sürölmüştür (Zhao *et al.* 2001). Aynı şekilde bezelye, domates ve *arabidopsis*'te ABA teşvikli stoma kapanmasında NO'nun sinyal molekül görevini gördüğüne dair çalışmalar da mevcuttur (Desikan *et al.* 2002; Neill *et al.* 2002a).

Literatürde, gerek soğuk stresinin gerekse NO'nun bitkilerdeki antioksidan sistemdeki temel enzimleri etkiledikleri ile ilgili birçok çalışma belirlenmiştir. 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 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 çimi bitkilerinde aylık olarak SOD aktivitesindeki değişimler takip edilmiş ve havaların soğuduğu sonbahar mevsiminde

aktivitenin arttığı tespit edilmiştir (Zhou and Zhao 2004). *Picea abies* -10° C gibi çok düşük sıcaklıklara 45 gün gibi uzunca bir süre maruz bakıldığında, ROT miktarındaki artışa paralel olarak, SOD aktivitesinde önemli derecede bir artış görülmüştür (Kaminska-Rozek and Pukacki 2005). Soğuğa duyarlı olduğu bilinen salatalık ve çeltik 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 dokularda oksidatif stres belirtileri görülmeye başlandığı belirlenmiştir (Milyutina *et al.* 2008). Düşük sıcaklığın hassas ve dayanıklı iki arpa çeşidinde SOD aktivitesini kontrole göre arttırdığı belirlenmiştir (Mutlu 2009). Kavak ağaçlarında yapılan bir çalışmada düşük sıcaklığın SOD aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2007). Literatürde düşük sıcaklığın apoplastik SOD aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili çalışma yok denecek kadar azdır. Mutlu (2009), yaptığı çalışmada düşük sıcaklığın arpanın hassas ve dayanıklı iki çeşidinde de apoplastik SOD aktivitesini düşürdüğü sonucuna ulaşmıştır. 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 da tuz konsantrasyonlarının artmasıyla apoplastik SOD aktivitesinin arttığı belirtilmiştir (Mutlu *et al.* 2009).

Diğer taraftan, Liu *et al.* (2010), yabani hardal süspansiyon kültüründe hem + 4 hem de 0 °C düşük sıcaklıkların SOD aktivitesini artırdığı, bununla beraber kültür ortamına ilave edilen NO'nun aktiviteyi daha da artırdığını belirlemişlerdir. Uchida *et al.* (2002) tuzluluk ve ısı stresi altındaki çeltik ve Shi *et al.* (2007) tuzluluk stresi altındaki salatalıkta NO'nun SOD aktivitesini artırdığını belirtmişlerdir. Ancak Liu *et al.* (2007) tarafından yapılan bir çalışmada da barbunya bitkisine dışsal olarak uygulanan NO'nun tek başına SOD aktivitesini artırırken, tuz stresine maruz bırakılmış barbunya da ise, aktiviteyi düşürdüğünü belirtmişlerdir. Yaptığımız literatür çalışmalarına göre, NO'nun soğuk stresine maruz

kalmış bitkilerde apoplastik SOD aktivitesi üzerindeki etkisini açıklayan herhangi bir çalışma belirlenememiştir.

Literatürde bu anlamda çok çalışılan antioksidan enzimlerden birisi de peroksidazdır (POD). Ladin ağacı yapraklarının apoplastında POD aktivitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Otter *et al.* 1997), ancak kuraklık stresi ve ozon muamelesi uygulandığında, hücrel ve apoplastik POD aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir (Kronfuss *et al.* 1996). Kışlık arpa yapraklarında ise apoplastik POD aktivitesinin hücrel aktiviteye göre oranının %394 gibi yüksek bir değerde olduğu ileri sürülmüştür (Baet *et al.* 2000). Buna mukabil, yüksek ve düşük nitrat uygulamalarında, genç ve olgun buğday bitkilerinin hücrel ve apoplastik POD aktivitesi karşılaştırıldığında, her iki durumda da, hücrel POD aktivitesinin apoplastik POD aktivitesinden yüksek olduğu bulunmuştur (Padu 1999). 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). *Picea ladies* bitkilerinde 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 ileri sürülmüştür (Saruyama *et al.* 1995; Kang *et al.* 2002). *Picea ladies* -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 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). Düşük sıcaklığa dirençleri farklı olan iki çeşit arpa da düşük sıcaklık muamelesiyle her iki çeşitte de POD aktivitesinin bitkinin yaşına göre artış veya düşüş olduğu belirlenmiştir (Mutlu 2009). Yabani hardal süspansiyon kültürünün düşük sıcaklığa maruz bırakılmasıyla POD aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Liu *et al.* 2010).

NO'nun tuzluluk (Shi *et al.* 2007), ağır metal ve ısı stresinde (Uchida *et al.* 2002; Kopyra and Gwozdz 2003; Yu *et al.* 2005; Wang *et al.* 2010), ve UV-B (Zhang *et al.* 2009) streslerine maruz bırakılmış bitkilerde POD aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Liu *et al.* (2007) tarafından yapılan bir çalışmada da barbunya bitkisine dışsal olarak uygulanan NO'nun tek başına POD aktivitesini artırırken, tuz stresine maruz bırakılmış barbunyada ise aktiviteyi düşürdüğünü belirtmiştir. Düşük sıcaklığa maruz bırakılmış yabani hardal süspansiyon kültürünün POD aktivitesi NO'nun etkisiyle daha da arttığı belirlenmiştir (Liu *et al.* 2010). Yaptığımız literatür çalışmalarına göre, NO'nun soğuk stresine maruz kalmış bitkilerde apoplastik POD aktivitesi üzerindeki etkisini açıklayan herhangi bir çalışma belirlenememiştir.

Bitkilerde antioksidan enzim sisteminin önemli diğer bir elamanı olan katalaz (CAT) enziminin aktivitesine etki eden faktörler (tuz, patojen, soğuk, sıcaklık, kuraklık ve su stresi) ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır.

Buğday, arpa, çavdar ve yulaf bitkileri soğuk şartlarda büyütüldüğünde 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 and Öncel 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 çeltik filizlerinde CAT aktivitesindeki artışın donma toleransı ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Saruyama *et al.* 1995; Kang *et al.* 2002). Ayrıca soğuk stresi birçok bitkide, özellikle soğuğa duyarlı genotiplerde, CAT aktivitesinde belirgin bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir (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 (aklimasyon yapılarak) düşük sıcaklıklara maruz bırakıldığında bitkinin kök ve gövdesinde CAT aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Yadeghari *et al.* 2008). Düşük sıcaklığa toleransları farklı olan iki arpa çeşidinde hem hassas hem de dayanıklı çeşitte CAT aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Mutlu 2009). Yabani hardal süspansiyon kültürünün düşük sıcaklığa maruz bırakılması sonucu CAT aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Liu *et al.* 2010).

Bitkilere dışarıdan uygulanan NO'nun tuzluluk (Shi *et al.* 2007; Li *et al.* 2008), ağır metal-ısı (Uchida *et al.* 2002; Koypra and Gwozdzy 2003; Yu *et al.* 2005; Wang *et al.* 2010), kuraklık (Zhao *et al.* 2008) ve soğuk streslerine (Liu *et al.* 2010) maruz bırakılmış bitkilerde CAT aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Liu *et al.* (2007) tarafından yapılan bir çalışmada barbunya bitkisine dışsal olarak uygulanan NO'nun tek başına CAT aktivitesini artırırken tuz stresine maruz bırakılmış barbunya da ise aktiviteyi etkilemediği belirtilmiştir. Yaptığımız literatür çalışmalarına göre, NO'nun soğuk stresine maruz kalmış bitkilerde apoplastik CAT aktivitesi üzerindeki etkisini açıklayan herhangi bir çalışma belirlenmemiştir.

Uzun yıllardan beri insan vücudunda biyokimyasal streslerin belirlenmesinde hidrojen peroksitin (H_2O_2) bir sinyal molekül olarak kullanılması (Halliwell *et al.* 2000) ve oksidatif stresler sırasında miktarının artması, bitkilerle ilgilenen bilim insanları için bitkilerde de bu

molekölün stresin bir işareti olduğu fikrini uyandırmıştır (Cheeseman 2006). Mevcut bilgiler, bitkilerdeki önemli sinyal dizinlerinde H_2O_2 '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 H_2O_2 'nin hücrelerde hızlı bir şekilde metabolize edilmesi ve dokulardaki gerçek seviyesinin ne olduğu ile ilgili belirsizlikler, strese verilen cevap mekanizmalarını anlamayı zorlaştırmaktadır.

Diğer taraftan, bezelyelerle yapılan bir çalışmada dışarıdan 6–8 mM H_2O_2 uygulandığında, bitkide doku hasarlarına ve hücre ölümlerine sebep olduğu gibi SOD (Bhattacharya *et al.* 2004) ile rubisco'nun (Badger *et al.* 1980; Levine *et al.* 1994) inhibisyonunu da neden olduğu görülmüştür. Diğer taraftan canlıların çoğu gibi bitkilerde de H_2O_2 'yi çarpıcı seviyede metabolize eden mekanizmalar mevcuttur. Örneğin 10 mM H_2O_2 ile muamele edilen hücre bu miktarı 10 dakikadan kısa sürede metabolize edebilmektedir (Levine *et al.* 1994).

Yaprak dokusundaki içsel H_2O_2 'nin çevresel streslere cevapta etkili olduğu ile ilgili birçok çalışma da rapor edilmiştir. Örneğin şeftali meyve dokusunda KCN ile CAT enzimi inhibe edildiğinde, H_2O_2 seviyesinin 0.35'den 0.8 μmol 'a çıktığı kaydedilmiştir (Brennan and Frenkel 1977). Serada mangrov (*B. parviflora*) bitkisine hidroponik ortamda tuz verildiğinde, H_2O_2 seviyesinin gram dokuda 0.067 den 0.089 μmol 'a çıktığı belirlenmiştir (Parida and Das 2005). Sera şartlarında ozon stresıyla muamele edilen bir bitkide H_2O_2 seviyesinin gram dokuda 0,03 μmol 'dan 0.06 μmol 'a çıktığı ve özellikle de kloroplastlarda birikiminin olduğu tespit edilmiştir (Chen and Gallie 2004). *Solanum lycopersicum* ile yapılan bir çalışmada normal şartlarda yapraklarının gram dokusunda 0.15 μmol olan H_2O_2 seviyesi *Botrytis cinerea* patojeni ile muamele edilmesiyle 0.2 μmol 'a yükseldiği gösterilmiştir (Patykowski and Urbanek 2003). *Phragmites australis* bitkisi kısa süreli

yüksek sıcaklık (38 °C) stresine maruz bırakıldığında H_2O_2 miktarında önemli bir artış belirlenmiştir (Velikova and Loreto 2005).

Düşük sıcaklıklarda hücre içi H_2O_2 miktarının nasıl etkilendiği ile ilgili çalışmalar da mevcuttur. Norveç ladin ağacı -10 ° 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). Mercimek bitkisi soğuk stresine maruz bırakıldığında, gövde dokusunda H_2O_2 içeriğinin önemli bir şekilde arttığı gözlenmiştir (Öktem *et al.* 2008). Düşük sıcaklığa toleransları farklı olan iki arpa çeşidiyle yapılan çalışmada da düşük sıcaklık muamelesinin hem dayanıklı hem de hassas çeşitte H_2O_2 miktarını düşürdüğü belirlenmiştir (Mutlu 2009). Bu durumun sebebini tüm metabolizmanın yavaşlaması olabileceğini savunan bazı araştırmacılar mevcuttur (Saruyama and Tanida 1995). Yabani hardal süspansiyon kültüründe düşük sıcaklığın H_2O_2 miktarını artırdığı belirlenmiştir (Liu *et al.* 2010).

Hem normal şartlarda hem de abiyotik stres şartlarındaki bitkilerde dışsal olarak uygulanan NO'nun H_2O_2 miktarını azaltlığına dair pek çok çalışma mevcuttur. Tuzluluk (Huaifu *et al.* 2007; Li *et al.* 2008), düşük sıcaklık (Liu *et al.* 2010), ağır metal (Hsu and Kao 2004; Cui *et al.* 2010) gibi abiyotik streslerde artan H_2O_2 miktarının uygulanan NO tarafından azaltıldığı belirtilmiştir. Buna karşılık, kavak kalluslarıyla yapılan bir çalışmada ise besi ortamında büyütülen kalluslarda tuz stresi H_2O_2 miktarında artış sağlamışken besi ortamına uygulanan NO'nun H_2O_2 miktarını daha da artırdığı belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2007).

Stres şartlarında içsel seviyesi artan ve hücrelerde önemli hasarlara neden olan diğer bir ROT süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalidir. Bu molekül, oldukça reaktif olup lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna sebep olur. Tuzluluk stresi altındaki pamuk kalluslarında (Bellaire *et al.* 2000; Vital *et al.* 2008) ve barbunya bitkisinde (Liu *et al.* 2007) tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak $O_2^{\cdot-}$ miktarının arttığı belirlenmiştir.

Salatalık (Jing *et al.* 2009) ve yabani hardal süspansiyon kültürünün (Liu *et al.* 2010) düşük sıcaklığa maruz kalmasıyla $O_2^{\cdot-}$ miktarının arttığı rapor edilmiştir. Arpanın Cd toksitesine maruz kalmasıyla $O_2^{\cdot-}$ miktarının arttığı rapor edilmiştir (Chen *et al.* 2010). Kamış bitkisinin de kuraklık stresi altında $O_2^{\cdot-}$ miktarını arttırdığı rapor edilmiştir (Zhao *et al.* 2008). Yapılan bu çalışmalar abiyotik stres şartlarında $O_2^{\cdot-}$ miktarının arttığını göstermektedir. Bu molekülün artışı önemli hücre hasarlarına neden olmaktadır (Asada 2006).

Stres altında ki bitkilere uygulanan NO'nun; tuzluluk stresi altındaki pamuk kalluslarında (Vital *et al.* 2008), kuraklık stresindeki kamış bitkisinde (Zhao *et al.* 2008), Cd toksitesindeki arpada (Chen *et al.* 2010), düşük sıcaklık stresindeki yabani hardal süspansiyon kültüründe (Liu *et al.* 2010), amonyum toksitesindeki *Hydrilla verticillata* bitkisinde (Wang *et al.* 2011) artan içsel $O_2^{\cdot-}$ miktarını azalttığı rapor edilmiştir. Bu bilgiler, NO'nun stres altındaki bitkilerde $O_2^{\cdot-}$ miktarını azaltarak stres zararından korunmaya önemli bir katkı yaptığını göstermektedir.

Lipid peroksidasyon (LPO), hücre zarı lipidlerinin serbest radikallerle (süperoksid anyonu, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali) etkileşmesi sonucu ortaya çıkar ve sonuçta hücre zarlarının bozulmasına yol açar. Bu peroksidasyonun derecesi, hücre düzeyinde 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 malondialdehid (MDA) miktarındaki artış, hücre zarlarının yapısal bütünlüğünün bozulduğunu gösteren iyi bir indikatördür (Posmyk *et al.* 2005). Yüksek sıcaklığa maruz bırakılmış arpa yapraklarının membran LPO düzeyinde artış belirlenmiştir (Kappen 1981). Bazı ağır metallerin toksik dozlarının bitkilerde lipid peroksidasyonunu 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 (Yaşar *et al.* 2008). Bazı asma (*Vitis vinifera*) çeşitlerine uygulanan

kuraklık stresinin lipid peroksidasyonda önemli derecede artışa sebep olmuştur (Yağmur 2008).

Düşük sıcaklık stresinden kaynaklanan oksidatif stresin hücre zarlarında lipid peroksidasyonuna neden olduğu ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Soğuk stresine maruz bırakılmış kışlık çavdar (*Secale cereale*), tütün (*Nicotiana tabacum*), *Arabidopsis thaliana*, ve patateste (*Solanum tuberosum*) 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 bitkisi soğuk stresine maruz bırakıldığında, kök ve gövde dokusunda MDA içeriğinde kayda değer bir artış kaydedilmiştir (Öktem *et al.* 2008). Arpa ile yapılan çalışmada hem hassas hem de dayanıklı arpada MDA miktarının arttığı rapor edilmiştir (Mutlu 2009). Yabani hardal süspansiyon kültürünün düşük sıcaklığa maruz bırakılması sonucu MDA miktarının arttığı rapor edilmiştir (Liu *et al.* 2010).

Stres durumlarında artan MDA miktarının dolayısıyla lipid peroksidasyon seviyesinin uygulanan NO uygulaması ile azaldığına dair literatürde bazı çalışmalar mevcuttur. Soğuk stresi (Liu *et al.* 2010), tuz stresi (Shi *et al.* 2007; Li *et al.* 2008), su stresi (Zhao *et al.* 2008; Arasimowicz-Jelonek *et al.* 2009), nikel fazlalığı (Kazemi *et al.* 2010), Cd fazlalığı (Singh *et al.* 2008), arsenik fazlalığı (Singh *et al.* 2009), yüksek sıcaklık stresi (Song *et al.* 2006) gibi streslerde artan MDA miktarının, dışsal uygulanan NO tarafından azaltıldığı belirtilmiştir.

Nitrat redüktaz (NR), nitrat indirgenmesinde iş gören anahtar bir enzimdir (Shaner and Boyer 1976). NR ayrıca NADPH' a bağımlı bir yolla nitrit (NO₂)' den NO üretimine de aracılık eder (Dean and Harper 1986; Yamasaki *et al.* 1999; Rockel *et al.* 2002; Zhao *et al.* 2009). Fasulye yapraklarında yapılan bir çalışmada tuz ve azot gübresinin artan

konsantrasyonu ile NR aktivitesinin de arttığı gösterilmiştir (Yousef *et al.* 1999). NaCl'nin pamuk ve fasulye yapraklarında NR aktivitesini azalttığı belirlenmiştir (Gouia *et al.* 1994). Mısır bitkisi ile yapılan bir çalışmada su stresinin NR aktivitesini düşürdüğü tespit edilmiştir (Foyer *et al.* 1998). NR aktivitesi ışığa bağımlı olarak genelde karanlıkta inhibe olduğu, ışıktaki ise aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Deng *et al.* 1990; Ogawa *et al.* 2000). Kışlık buğday bitkisiyle yapılan bir çalışmada soğuk stresinin NR aktivitesinin düşmesine neden olduğu belirtilmiştir (Yaneva *et al.* 1996). Düşük sıcaklığın ıspanak bitkisinde NR aktivitesinin hem karanlıkta hem de ışıktaki azalttığı belirlenmiştir (Oral 2003). Domates bitkisinde düşük sıcaklık NR aktivitesini artırdığı belirtilmiştir (Tucker and Ort 2002). Arabidopsisin (*Arabidopsis thaliana*) soğuk uyumu süresince NR aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir ve NR etkisiyle üretilen NO'nun arabidopsiste soğuğa uyum ve donma toleransında önemli bir role sahip olduğu belirlenmiştir (Zhao *et al.* 2009).

Bitkilerde NO'un hormonların biyolojik etkilerine aracılık ettiği bilinmektedir (Neill *et al.* 2002a). Sitokininin farklı bitkilerde NO sentezini teşvik ettiği gösterilmiştir ve muhtemelen NO sitokinin ile teşvik edilmiş programlanmış hücre ölümü (PHÖ; Programmed Cell Death= PCD) olayında rol oynamaktadır (Neill *et al.* 2003). Oksin salatalık köklerinde NO sentezini teşvik etmektedir. SNP ve SNAP gibi NO vericilerinin konsantrasyona bağlı olarak salatalık eksplantlarında adventif kök gelişimini teşvik ettiği, hatta IAA (Indol-3-Asetik Asit) ile birlikte uygulandığında cevapta bir artışa neden olduğu Pagnussat *et al.* (2002, 2003) tarafından gösterilmiştir. Bitki dokularının olgunlaşma ve senesens sürecinde NO ve etilen arasında antagonistik bir ilişki de olduğu belirtilmiştir (Leshem *et al.* 1998; Lamattina *et al.* 2003).

ABA'nın soğuk stresi etkisiyle pek çok bitkisel dokuda arttığını belirten çalışmalar mevcuttur (Daie and Campbell 1981; Chen *et al.* 1983; Vernieri *et al.* 1991). Soğuk stresiyle artan ABA miktarının stres zararını iyileştirme ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Wilkinson and Davies 2002). Kuraklık stresine cevapta stoma kapanmasında bekçi hücrelerin ABA sinyal yoluna NO'nun aracılık ettiği belirlenmiştir.

ABA teşvikli stoma kapanması için *Arabidopsis*, *Vicia faba* gibi bitkilerde NO sentezlenir ve bu sentezlenen NO'nun kaynağının da NR olduğu belirtilmiştir (Neill *et al.* 2002; Desikan *et al.* 2002; Garcia-Mata and Lamattina 2001). Ancak başka bir çalışmada da arabidopsis süspansiyon kültüründe ABA'nın NO sentezi üzerinde etkisinin olmadığını belirtilmiştir (Tun *et al.* 2001).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

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
HPLC	: Agilent Technologies
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 Eppendorf
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1
Homojenizatör	: Wiggen Hauser D- 500
Çalkalayıcı	: Gallenkamp
Vakum pompası	: Edwards, İngiltere
Elektroforez	: Owl Separation Systems P10DS

3.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları

Çalışmada kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Fluka 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. 100 μM Sodyum nitroprusid(SNP) çözeltisi: 0.0297 g SNP 900 mL saf suda çözölmüş, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti SNP nin diğer konsantrasyonları için stok çözelti olarak ta kullanılmıştır.
3. 1 μM SNP çözeltisi: stok çözeltiden 10 mL alınmış üzerine 990 mL saf su eklenerek hazırlanmıştır.
4. 0.1 μM SNP çözeltisi: stok çözeltiden 1 mL alınmış üzerine 999 mL saf su eklenerek hazırlanmıştır.
5. %5 lik TCA(trikloroasetik asit) (Lipid peroksidasyon aktivitesi homojenat çözeltisi) : 100 mL saf su içersine 5 g TCA ilave edilir. TCA tam olarak çözünene kadar karıştırılarak hazırlanır.
6. %0.5 lik TBA (tiobarbutirik asit) (Lipid peroksidasyon aktivitesi reaksiyon çözeltisi): 100 mL saf su içine 20 gram TCA çözölür ve içersine 0.5 g TBA ilave edilir ve iyice karıştırılarak hazırlanır.
7. %5'lik $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ (titanyum disülfat çözeltisi) (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 1 gram $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ 20 mL saf suda çözölerek hazırlamıştır.
8. %19'luk NH_4OH (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 4.16 mL NH_3 20 mL saf suda çözölmesiyle hazırlanmıştır.

9. 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.

10. 65 mM K_2HPO_4 , pH: 7.8 (Süperoksit anyonu miktarının belirlenmesinde kullanılan tampon): 1,132 g K_2HPO_4 70 mL saf su da çözölmüş pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

11. 10 mM Hydroxilamine (Süperoksit anyonu miktarının ölçölmesinde kullanılır): 0,0069 g Hydroxilamine alınmış 10 ml saf suda çözdürölerek hazırlanmıştır.

12. 17 mM amonyum benzono sülfonik asit (ABSA) (Süperoksit anyonu miktarının ölçölmesinde kullanılır): 0,1472 g alınmış ve 50 ml saf suda çözüdüölerek hazırlanmıştır.

13. 17 mM 1-Naftilamine (Süperoksit anyonu miktarının ölçölmesinde kullanılır): 0,243 g 1- Naftilamine alınmış 10 ml asetonda çözülmüş ve son hacmi saf su ile 100 ml ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

14. 20 mM Askorbik asit + 20 mM CaCl_2 çözültisi (Total apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu için kullanılan çözülti): 7,4 g askorbik asit ve 5,28 g CaCl_2 bir miktar saf suda çözülmüş ve hacim saf su ile 2 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

15. 0.1 M KH_2PO_4 (pH: 7.0), %1 PVP, 1mM EDTA (Hücresele antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu): 2.72 g KH_2PO_4 180 mL saf suda çözülmüş, 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.

16. 103.5 mM KH_2PO_4 , pH: 7.5 (Katalaz aktivitesi ölçölümünde kullanılan tampon): 1.4 g KH_2PO_4 , 80 mL saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

17. 40 mM H_2O_2 çözültisi (Katalaz aktivitesi ölçölümünde kullanılan substrat çözültisi): 408 μL % 30'luk H_2O_2 hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

18. 5 mM H_2O_2 çözültisi (Katalaz aktivitesi ölçölümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan): 41 μL %30'luk H_2O_2 hacmi saf su ile 100mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

- 19.** 0.1 M Na_2HPO_4 , pH: 5.5 (Peroxidazın 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.
- 20.** Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi: 54 μL quaiöl ve 15 μL 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.
- 21.** 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8) (SOD için tampon çözelti): 1.7 g KH_2PO_4 200 mL saf suda çözölmüş, pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra ve hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.
- 22.** 13 mM metionin çözeltisi (SOD reaksiyon karışımı için): 0.586 g metionin alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250 mL 50mM KH_2PO_4 tamponu içeresine ilave edilerek çözölür.
- 23.** 63 μM NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür (SOD reaksiyon karışımı için): 0.0128 g NBT alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250 mL 50mM KH_2PO_4 tamponu içeresine ilave edilerek çözölür.
- 24.** 0.1 mM EDTA-Etilen Diamin Tetra Asetik asit (SOD reaksiyon karışımı için): 0.073 g EDTA alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250mL 50mM KH_2PO_4 tamponu içeresine ilave edilerek çözölür.
- 25.** 13 μM riboflavin (SOD aktivitesi için 2. çözelti): 0.019 g riboflavin, 500 mL saf suda çözölmüş, 3 mL'lik reaksiyon karışımının 13 μM riboflavin içermesi için 390 μL riboflavin alınmıştır.
- 26.** 0.1 M Tris-HCl pH: 7.5, 5 μM FAD, 1 mM sistein, 1 mM EDTA (NR aktivitesi için homojenat tamponu): 0.605 g Tris, 2 μg FAD, 9 mg sistein, 0.015 g EDTA 40 mL saf su içinde çözölmüş 1 N HCl ile pH: 7.5'e kadar titre edildikten sonra toplam hacim 50 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 27.** 100 mM KH_2PO_4 , pH: 7.8, 1 mM EDTA, 10 mM KNO_3 , 0.3 mM NADH (NR aktivitesi için kullanılan aktivite tamponu): 0.272 g KH_2PO_4 , 56 mg EDTA, 0.02 g KNO_3 , 4 mg NADH 10 mL saf suda çözöldü. 1 N NaOH ile pH: 7.8'e kadar titre edildikten sonra toplam hacim saf su ile 20 mL'ye tamamlanarak günlük olarak hazırlanmıştır.

- 28.** 1 M Baryum asetat (NR aktivitesinde kullanılan çözelti): 2.56 g baryum asetat'ın 10 mL saf suda çözünmesiyle hazırlanmıştır.
- 29.** %1'lik Sülfanilamid (NR aktivitesinde kullanılan çözelti): 0.5 g sülfanilamid'in 50 mL 2 N HCl içinde çözünmesiyle hazırlandı.
- 30.** %0.02'lik N-1-Naftiletilediamnidihidroklörür (NED) (NR aktivitesinde kullanılan çözelti): 0.02 g N-1-Naftiletilediamnidihidroklörür'ün 100 mL saf suda çözülmesiyle hazırlandı.
- 31.** 50 μ M'lık NaNO_2 çözeltisi (Süperoksit anyonu, NR aktivitesi ve içsel NO için; standart grafik hazırlamak için kullanılan çözelti). 0.35 mg NaNO_2 'in 100 mL saf suda çözülmesiyle hazırlandı.
- 32.** 50 Mm asetik asit (%4 Zinc diasetat içeren) pH: 3.6, (içsel NO miktarının ölçülmesinde kullanılan tampon çözelti): 0,298 mL asetik asit ve 4 g Zinc diasetat alınmış 80 mL saf suda pH: 3.6 ayarlandıktan sonra son hacim 100 mL ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 33.** Griess reaktifinin hazırlanması (%0,1'lik NED ve %1' lik Sülfanilamid) (içsel NO miktarında kullanılan reaktif çözelti): %5'lik orto-fosforik asitten 13.5 mL alınmış üzerine 1 g Sülfanilamid eklenerek hacmi 100 mL'ye saf su ile tamamlanmış ve en son 0.1 g NED eklenerek olarak hazırlanmıştır.
- 34.** 1 M Tris-HCl (pH:6.8) (Elektroforezde jel hazırlamak için kullanılan tampon): 12.1 g Tris bir miktar saf suda çözüldükten sonra pH'sı 6.8'e ayarlanmış ve toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- 35.** 1 M Tris-HCl (pH: 8.8) (Elektroforezde jel hazırlamak için kullanılan tampon): 12.1 g Tris bir miktar saf suda çözüldükten sonra pH'sı 8.8'e ayarlanmış ve toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- 36.** %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.
- 37.** %30'luk akrilamid- %0.8'lik bis-akrilamid çözeltisi (Elektroforez ayırma ve yağma jellerinin hazırlanmasında kullanılan): 30 g akrilamid ve 0.8 g bis-akrilamid saf su ile iyice

çözöldükten toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmış, kullanım dışında renkli şişede 4 °C'de saklanmıştır.

38. 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.

39. %0.1'lik brom timol mavisini: 0.1 g indikatör boya, 16 ml 0.1 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra su ile hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

40. SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu: 0.65 mL 1 M Tris-HCl pH: 6.8, 3 mL %10'luk SDS, 1 mL %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.

41. 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.

42. 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 bununla 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.

43. 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.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi

Araştırmamızda bölgemizde de ekimi yapılan soğuga hassas bir bitki olan mısır (*Zea mays* L. cv. Arifiye-2) kullanılmıştır. Tohumlar Sakarya Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir. Mısır bitkisine ait tohumlar, ekimden önce etanol (%96) ile kısa süreli hızlıca yıkandı ve %5'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dk. yüzey sterilizasyonuna tabi tutuldu. Daha sonra 5 kez saf su ile yıkanarak, oda şartlarında saf su içerisinde 6 saat şişmeye bırakıldı. Her saksıya saf su ile şişirilmiş tohumlar eşit miktarda ekildi. Bitkiler iklim dolabında kontrol şartlarında (25/22 °C) sıcaklık ve 16/8 saat ışık-karanlık periyodunda (20.000 lüks, %70 nem) 28 gün süreyle büyütüldü. Her saksı, kesileceğı güne kadar, günlük eşit miktarda sulandı. 10. gün bitkilerin bir kısmına farklı (0.0, 0.1, 1 ve 100 µM) Sodium nitroprossüd (SNP), (NO vericisi), konsantrasyonları uygulandı. Bu uygulamadan sonra, kontroldeki SNP'li ve SNP'siz bitkiler kesim tarihlerinden 2 gün önce soğuk şartlara (10/7°C) transfer edildi. Kontrol, düşük sıcaklık ve düşük sıcaklık + SNP'li bitki yaprakları 14, 21 ve 28 günlük olduklarında kesildi. Apoplastik ekstraksiyon ve donma hasarı deneyleri için taze kesilmiş yapraklar hemen kullanıldı. Diğer deneyler için ise geriye kalan yapraklar sıvı azotta dondurulduktan sonra -20 ve -80°C derin donduruculara bırakıldı.

3.3.2. Donma hasarının (%) belirlenmesi

Kontrol, soğuk ve SNP muameleli bitki yapraklarında %donma hasarı ölçülerek, NO'nun yapraklarda donma hasarını engellemedeki rolü belirlendi. Bu deney aşğıdaki şekilde yapılır. 20 deney tüpünün her birine 0,1 g taze yaprak örneğı konuldu. Tüpler -20 °C'ye kadar ayarlanabilen bir su banyosuna (donmayı önlemek için, su ile karışık alkol içerir)

topluca yerleştirildi. Bütün tüpler, -1 den -16 °C'ye kadar her bir derecede 10 dk. tutuldu ve her bir dereceden sonra banyosundan 4 tüp alındı. Banyodan alınan her bir tüpün içine 4 ml saf su konulup ve bu tüpler 4 °C'de 24 saat bekletildi. Daha sonra tüplerin içerisindeki dondurulmuş yaprağın çözülmesiyle saf suya geçen iyon miktarı, bir elektrik kondüktivimetresi ile ölçüldü. Değerler % donma hasarına çevrildi (Griffith *et al.* 1992; Taşğın *et al.* 2003).

3.3.3. Buz Nükleasyon Aktivitesinin Belirlenmesi

Kontrol, soğuk ve SNP muameleli bitki yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesine etkisi ölçülerek, apoplastik proteinlerin ve NO'nun donma toleransındaki rolü belirlenir. Bu deney aşağıdaki şekilde yapıldı Apoplastik proteinler eppendroff tüplerde 1 ml saf su içinde çözüldü. Daha sonra, bu tüpler topluca sıcaklığı, -20 °C'ye kadar ayarlanabilen bir su banyosuna (donmayı önlemek için, su ile karışık alkol içerir) konuldu. Sıcaklık -1 °C'den başlayarak 10 dakika aralıklarla 0.2'şer derece düşürüldü. Her bir tüpün içindeki protein çözeltisinin donma noktası belirlendi. Saf suyun donma derecesi kontrol olarak kabul edildi. Saf suyun donma noktası ile protein çözeltisinin donma noktaları arasındaki fark, buz nükleasyon aktivitesi olarak kabul edildi (Griffith *et al.* 1992; Taşğın *et al.* 2003).

3.3.4. Apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu

Apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu için, bitki yaprakları bir bisturiyle yaklaşık 1 cm uzunlukta dikkatlice kesilerek oluşturulan yaprak kesitleri (7 g), en az 6 kez bol su ile iyice yıkandı. Bu işlemle yaprakların kesilen bölgelerinden gelebilecek hücrel protein kontaminasyonu önlenmiş oldu (Hon *et al.* 1994; Atıcı ve Nalbatoğlu 1999a,b). Hazırlanan 7 g yaprak kesiti, içerisinde 20 mM askorbik asit ve 20 mM CaCl₂ çözeltisi bulunan vakumlanabilir bir desikatöre yerleştirilir ve desikatör bir vakum pompası ile 30 dakika

vakumlanır. Vakumlanan yapraklar 20 mL'lik enjektörlere dikkatlice yerleştirildikten sonra, enjektörler birer santrifüj tüpüne konulur ve 2000 $\times g$ 'de 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüjlemenin bitiminde, tüplerin dip kısmında biriken apoplastik ekstrakt, apoplastik proteinlerin elde edilmesi için kullanılır (Atıcı and Nalbatoğlu 1999a,b; Taşğın *et al.* 2003).

Apoplastik proteinlerin izolasyonu için, apoplastik ekstraktlara hacimlerinin 1,5 katı soğuk (-20 °C) aseton ilave edilir ve karışım -20 °C'de 1 gece bekletilir. İkinci gün, örnekler 3500 $\times g$ 'de 20 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra apoplastik protein peleti elde edilir. Pelet, önce %96'lık sonra %70'lik etanol ile birer kez dikkatlice yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Asetonu uzaklaştırılmış pelet apoplastik enzim ve buz nükleasyon aktivitelerinin belirleneceği zamana kadar -20 °C'de saklanır (Griffith *et al.* 1992; Hon *et al.* 1994; Atıcı and Nalbantoglu 1999a,b; Taşğın *et al.* 2003).

Enzim aktivitesi ölçümü yapılacağı zaman, apoplastik protein peletleri, 1 mL 0,2 M (pH: 7.5) sodyum fosfat tamponu içinde iyice çözülmüş ve apoplastik antioksidan enzim aktiviteleri ölçümü için hazır hale getirilmiştir.

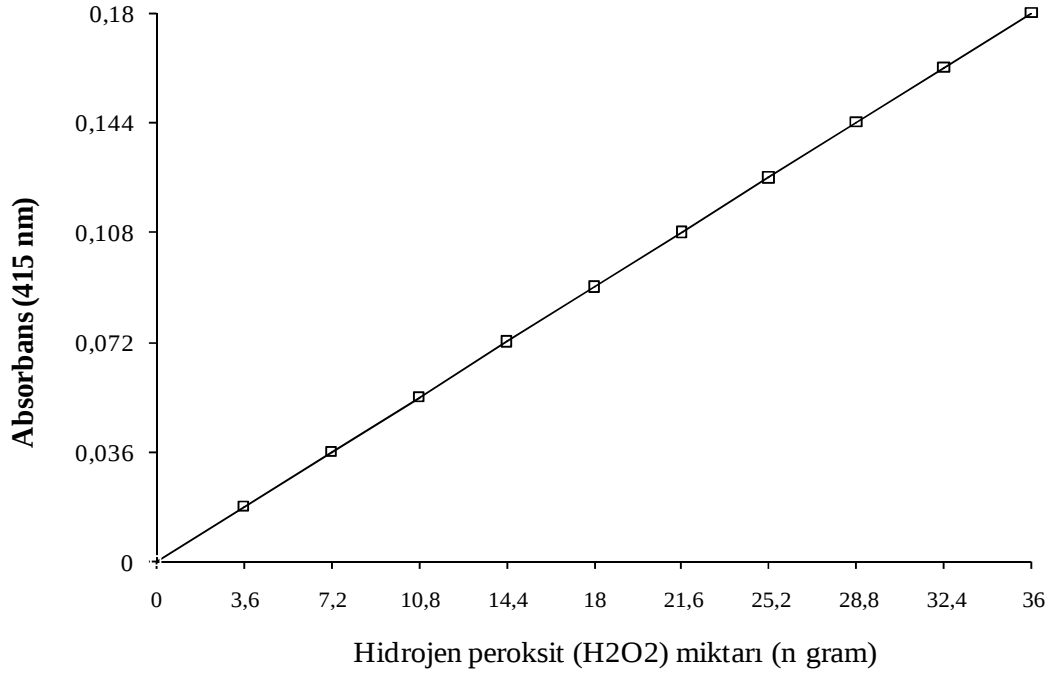
3.3.5. Hücresel proteinlerin ekstraksiyonu

Hücresel proteinlerin ekstraksiyonu için, yapraklardan 0.5 g alınıp soğuk bir havan içine konulmuş ve üzerine sıvı azot ilave edilerek toz haline gelinceye kadar öğütülür. 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 edilir ve karışım bir santrifüj tüpüne aktararak 15000 $\times g$ 'de ve +4°C'de 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen süpernatant hücresel antioksidan enzimlerin aktivite ölçümleri için kullanılır (Angelini and Federico 1989; Angelini *et al.* 1990) .

3.3.6. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi

Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi için; 0.5 gram yaprak alınarak 10 mL soğuk aseton içinde homojenize edildikten sonra homojenat 10.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilir. Daha sonra elde edilen süpernatantın 1.5 mL'si, sırasıyla 0.15 mL %5'lik Ti(SO₄)₂ (titanyum disülfat) ve 0.3 mL %19'luk NH₄OH (amonyum hidroksit) ile karıştırılır. Çökelek oluşuktan sonra karışım 10.000 x g'de 10 dakika daha santrifüj edilir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet 3 mL 2 M'lık H₂SO₄ (sülfürik asit) içinde çözülür ve 415 nm'de absorbanı ölçülerek kaydedilir. Bu ortalama absorbanı değerleri, daha önceden hazırlanmış standart grafik yardımıyla nanogram cinsinden H₂O₂ miktarına dönüştürülür. Sonuçlar g yaprak başına düşen H₂O₂ miktarı (ngram /g yaprak) olarak sunulur (He *et al.* 2005).

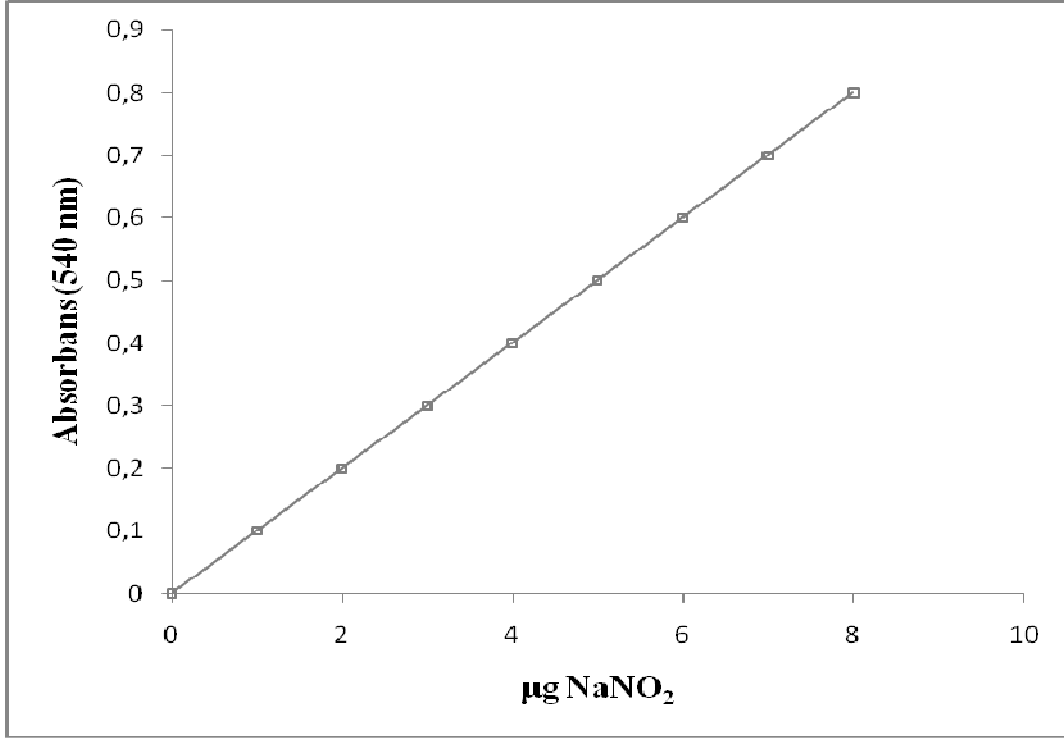
H₂O₂ miktarını belirlemede kullanılan H₂O₂ standardı için, %35'lik H₂O₂ çözeltisinden hazırlanan 3 mM'lık stok çözeltiden eppendorff tüplerine sırasıyla; 3.6, 7.2, 10.8, 14.4, 18, 21.6, 25.2, 28.8, 32.4 ve 36 nanogram olacak şekilde konulur. Tüpün hacmi aseton ile 1.5 mL'ye tamamlanır ve her tüpe 0.15 mL %5'lik Ti(SO₄)₂ ve 0.3mL %19'luk NH₄OH ilave edilir. Çökelek oluşuktan sonra karışım 10.000 x g'de 5 dakika daha santrifüj edilir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet 3 mL 2 M'lık H₂SO₄ içinde çözülür ve kuvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 415 nm'de absorbanı köre karşı okunur. Absorbanı değerlerine karşılık gelen nanogram H₂O₂ değerleri kullanarak standart grafik elde edilir.



Şekil 3.1. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik.

3.3.7. Süperoksit anyon miktarının belirlenmesi

0.5 g yaprak sıvı azot ile toz haline getirildikten sonra üzerine 2 mL 65 mM (pH: 7.8) fosfat tamponu ile homojenize edilir. Homojenat 5000 x g' de 10 dk. ve + 4 °C de santrifüj edilir. Süpernatantan 1 mL, 10 mM hydroxilamin'den 0.1 mL ve aynı fosfat tamponundan 0.9 mL alınır karıştırılır ve 25°C' de 20 dk. inkübe edilir. İnkübasyona bırakılan karışımın 1 mL'si alınır üzerine 1 mL 17 mM aminobenzene sülfonik asit ve 1 mL 17 mM 1-naftilamin eklenir ve tekrardan 25°C de 20 dk. inkübe edildikten sonra spektrofotometre de 530 nm'de ölçülür. Sonuçlar NaNO₂ standart grafiğine bakılarak değerlendirilir (Eltner and Heupel 1976).



Şekil 3.2. O_2^- , NR ve içsel NO miktarlarını belirlemede kullanılan standart grafik.

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 $10.000 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj edilir. Tüpün süpernatant kısmından 4 mL alınarak üzerine 1 mL %0.5 lik TBA çözeltisi ilave edilir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika inkübe edilir ve reaksiyon tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durdurulur. Örnekler tekrar $10000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısmı alınarak absorbansı 532 nm de okunur ve daha sonra 600 nm deki non-spesifik absorbsiyon için absorbans değeri belirlenir.

Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm'de belirlenen değeri çıkarılır ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/g): $[(A_{532}-$

$A600/155000] \times 10^6$ formülüyle hesaplanır. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde verilir (Ananieva *et al.* 2002).

3.3.9. Apoplastik ve hücrel antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Kontrol, soğuk ve NO muameleli bitki yapraklarından elde edilen apoplastik proteinler içindeki antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz) aktiviteleri ölçülerek, apoplastik ve hücrel antioksidan enzimlerin ve NO'nun reaktif oksijen türlerini uzaklaştırmadaki rolü belirlenecektir. Ayrıca yukarıda belirtildiği gibi elde edilen apoplastik proteinler fosfat tamponunda (pH:6.5) çözülerek spektrofotometrik yöntemlerle enzimlerin aktiviteleri belirlenecektir. Her bir antioksidan enzim için kullanılan kimyasallar ve yöntemler farklıdır.

3.3.9.a. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanır. Reaksiyon karışımı (3 mL); 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 63 μ M NBT, 13 μ M riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 3 mL spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2,58 mL alınmış ve üzerine 30 μ L enzim ekstraktı pipetlenmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 13 μ M'lık riboflavin çözeltisinden 390 μ L 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 (Agarwal and Pandey 2004).

3.3.9.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

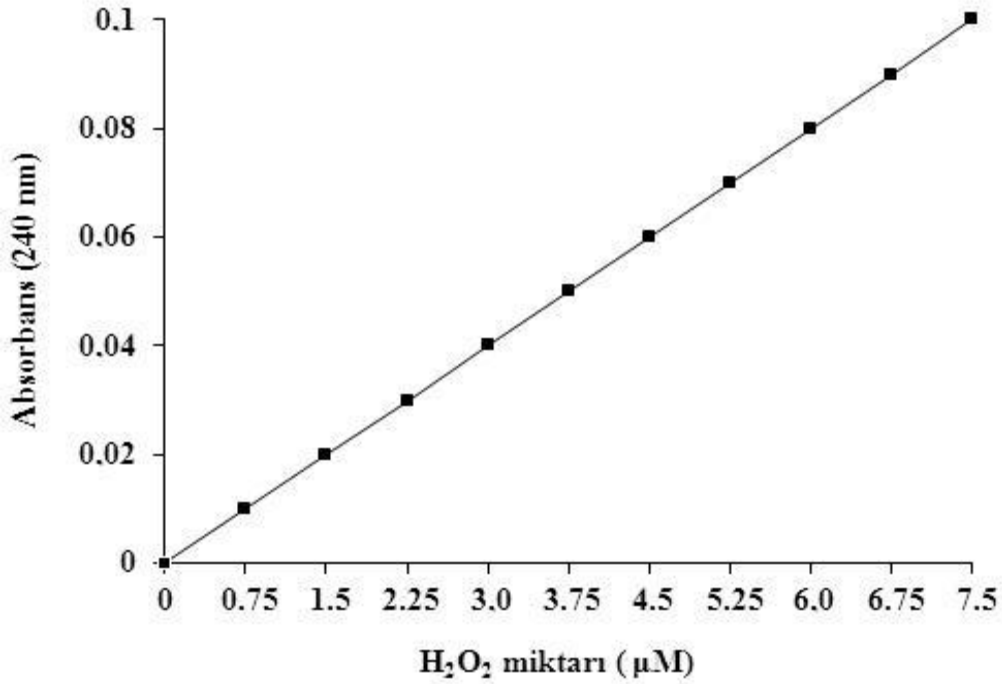
Peroksidaz (POD) aktivite tayini, guaikol ve H_2O_2 'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır. Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 100 mL 0.1 M, NaH_2PO_4 (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol ve 5mM H_2O_2 içeren substrat çözeltisinden 3 mL konulduktan sonra, üzerine 10 μ L 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 abs artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulmuştur (Yee *et al.* 2002).

3.3.9.c. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için Gong *et al.* (2001) uyguladığı metot kullanılır. Bu metot, katalazın ortamdaki H_2O_2 'nin oksijen ve suya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans değişiminin 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır.

Önce reaksiyonda azalan H_2O_2 miktarını belirlemek için standart grafik hazırlanır. Standart grafik hazırlamak için, 5 mM H_2O_2 çözeltisinden 3 mL'lik spektrofotometre tüplerine sırasıyla; 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 mL konulmuş, tüplerin hacimleri saf su ile 1.5 mL'ye tamamlanmış ve her tüpe 1.47 mL 103.5 mM KH_2PO_4 ve 30 μ L su ilave edilmiştir. Spektrofotometrede 240 nm'de absorbans köre karşı okunmuş ve absorbans değerlerine karşılık gelen μ M 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 μ L enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Spektrofotometrede 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbans okunmuş ve absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanmıştır. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla μ mol cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürülmüştür. 25 °C'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 μ mol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulmuştur.



Şekil 3.3. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik.

3.3.10. Nitrat redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

NR aktivitesi tayini için kullanılan bu yöntem, hemen hemen bu enzimi inceleyen tüm araştırmacılar tarafından kullanılır. NR aktivitesi tayin yönteminin esası şöyledir; enzim

susbtratu olan NO_3^- 'ı NO_2^- 'e dönüştürür. Oluşan NO_2^- kimyasal reaktiflerle renkli bir kompleks madde verir. Renkli maddenin spektrofotometrik olarak 540 nm' de ölçülen absorbansı NR aktivitesi olarak kabul edilir (15 dakikada $1\mu\text{g}$ NO_2^- 'i oluşturan enzim 1 enzim ünitesi) (Nakagawa *et al.* 1984).

Tüm bitki gruplarının yapraklarından aktivite homojenatı elde edilir. Homojenattaki NO_2^- miktarını belirlemede faydalanılacak olan standart grafiği önceden hazırlanır. NR akivitesini belirlemek için reaksiyon tüpüne 0.2 mL homojenat çözeltisi ve 0.8 mL aktivite tamponu ilave edilir. Bu karışım 30 °C' deki su banyosunada 20 dakika inkübe edilir. 20 dakikanın sonunda reaksiyon tüpündeki karışımın üzerine 0.1 mL baryum asetat ve 1.9 mL %96'lık etanol ilave edilip karıştırıldıktan sonra reaksiyon karışımı 4 °C'de 5 dakika bekletilir. 5 dakika sonunda 2300 x g'de 5 dakika santrifüjlenir. Santrifüj işleminden sonra tüpten süpernatant alınır. Süpernatantın üzerine 1 mL %0,02'lik N-1-naftiletilendiamindihidroklorür ve %1'lik sülfanilamid çözeltileri ilave edilip 15 dakika bekletilir. 15 dakikanın sonunda oluşan pembe renkli çözeltinin spektrofotometrik olarak 540 nm de absorbansı köre karşı okunur.

Aynı zaman diliminde kesilen örneklerden her birinden üçer tekerrür yapılarak absorbans ortalamaları belirlendi. Bu ortalama absorbans değerleri kullanılarak standart grafik yardımıyla g yaprak başına μg cinsinden NaNO_2^- miktarları yani NR aktiviteleri hesaplanır.

3.3.11. İçsel NO miktarının belirlenmesi

0.5 g yaprak sıvı azotta toz haline getirilir ve üzerine 3 mL 50 mM soğuk asetik asit (pH: 3.6 ve %4 Zinc diacetate içeren) tamponu eklenerek homojenize edilir. Homojenat 10000 x g de 10 dk ve +4°C de santrifüj edilir. Süpernatant alınır ve geriye kalan pelet 1 mL aynı tampon ile yıkanır santrifüj edilip süpernatantı alınır ve önce alınan süpernatant ile birleştirilir. Birleştirilen süpernatantın üzerine 0.1 g aktif karbon eklenir ve karıştırılır.

Karışım filtrelendir ve süzüntüden 1 mL alınır üzerine 1 mL Griess reaktifi eklenip oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılır. Karışımın absorbans değeri spektrofotometre de 540 nm de belirlenir. İçsel NO miktarı için NaNO_2 standart grafiğine bakılır ve hesaplaması yapılır (Hu *et al.* 2003).

3.3.12. ABA hormon analizi

Hormon analiz yönteminde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanıldı. Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri Kuraishi *et al.* (1991) ile Battal and Tileklioğlu (2001) metotlarına göre yapıldı. Derin dondurucuya alınmış olan taze bitki materyallerinden 1 g alınarak, sıvı azotta toz haline getirildi ve %80'lik soğuk metanolde homojenize edilerek süzüldü. Önce rotary evedoratorunda metanol uçuruldu ve 4 ml KH_2PO_4 (pH: 8) tamponuna alınan ekstrakt Polivinilpolipiridon (PVPP)' den geçirildi. Ekstrakt Whatman no:1 ile süzülerek PVPP' den ayrıldı. Süzülen kısım sep-pak C18 kartüjünden geçirildi, sonra kartüj bünyesinde kalan hormon %80 lik metanolle çözülerek küçük viallere alındı ve HPLC analizleri için kullanıldı.

3.3.13. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi

Bu araştırmada yapraklardan elde edilen apoplastik ve hücrel proteinlerdeki değişim, Laemmli tarafından anlatıldığı şekilde elektroforezle kontrol edilir (Laemmli 1970). Proteinler 100 μL numune tamponu içinde çözüldükten sonra elektroforeze hazırlanır. Elektroforez için %3-12 kesikli sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeli hazırlanır.

Ayrırma jelini hazırlamak için, bir behere %30'luk akrilamid - %0.8'lik bis akrilamid çözeltisinden 4.4 mL alınır ve üzerine sırasıyla 1 M'lık Tris-HCl (pH:8.8)'den 5 mL, %10'luk SDS'den 0.2 mL, %1.5'lik amonyum persülfat'tan 50 μL ve 3.13 mL saf su

konularak karıştırılır. Bu karışımın üzerine en son 10 µL %5'lik TEMED eklenerek hızlıca pipetlenir.

Yığma jelini hazırlamak için, bir behere %30'luk akrilamid - %0,8'lik bis akrilamid çözeltisinden 0.44 mL alınır ve üzerine sırasıyla 1 M'lık Tris-HCl (pH:6.8)'den 0.41 mL, %10'luk SDS'den 30 µL, %1.5'luk amonyum persülfattan 20 µL ve 2.45 mL saf su konularak karıştırılır. Bu karışımın üzerine 5 µL % 5'lik TEMED ilave edilir.

Elektroforez işlemi aşağıdaki şekilde yapılır. Elektroforez cam tabakaları önce saf su ve sonra alkol ile yıkanır. Plakaları birleştiren aralık koruyucu mikalara, sızmayı önlemek için vazelin sürülüp iki cam plaka arasına lastik şeritler konularak camlar birleştirilir. Daha sonra plastik elektroforez torbalarına konulan cam plakalar kısıkaçlar ile tutturularak jel hazırlama cihazına monte edilir. Ayırma jeli hazırlandıktan hemen sonra ince bir pipet yardımıyla pipetlenir. Bunun üzerine jelin üstünün pürüzsüz olması için hemen izopropil alkol den bir miktar dökülür. Ayırma jeli katılaşınca kadar yaklaşık iki saat beklenir. Katılaşma sonrası jelin üzerindeki izopropil dökülerek tekrar jelin üzeri saf su ile doldurulup, serin bir yerde 1 gece bekletilir. İkinci gün yığma jeli hazırlanır ve ayırma jelinin üzerine dökülüp tarak yerleştirilir ve yaklaşık 2-3 saat sonra tarak jelden dikkatli bir şekilde çıkarılır. Hazırlanan plakaların kuyuları önce saf su ile sonra yürütme tamponu ile yıkanıp, elektroforez tankına yerleştirilir (Taşgın 2004).

Protein numuneleri, toplam hacim 50 µL olacak şekilde tüplerde hazırlanıp 3 dakika kaynar suda inkübe edilir ve oda sıcaklığına kadar soğutulur. Numuneler bir mikroyenjektörle jelin kuyularına tatbik edilir. Molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerde 50 µL tamponda çözülerek numunelerle birlikte jele yüklenir. Tank kapağı kapatılarak elektroforez tankının alt ve üst kısmına yeterince yürütme tamponu konulur ve elektrik bağlantıları yapılır. Daha sonra numuneler ayırma jelinin hizasına kadar 80 voltta yürütülür. Ayırma jelinden sonra 160 voltta yaklaşık 2 saat yürütmeye devam edilir. Yürütme işlemi bittiğinde akım kesilerek jel, camlar arasından dikkatlice çıkarılır ve sabitleme çözeltisinde hafif tempoda 45 dakika

alkalanır. Yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere özel kabına konulur. Daha sonra, jel boyama çözeltisine alınır ve iki saat tekrar çalkalanır. Daha sonra boyama çözeltisinden alınarak protein bantları iyice görülünceye kadar yıkama çözeltisinde yıkanır. Belirli zaman periyotlarında değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalanır. Yıkama özeltisi aktif karbondan geçirilerek tekrar kullanılır. Jel, yıkama çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekilir (Taşğın 2004).

4. BULGULAR

Araştırmamızda soğuşa hassas bir bitki olan mısır (*Zea mays* L. cv. Arifiye-2) kullanılmıştır. Bitkiler iklim dolabında kontrol şartlarında (25/22 °C) sıcaklık ve 16/8 saat ışık-karanlık periyodunda (20.000 lüks, %70 nem) 28 gün süreyle büyütülmüştür. 10. gün bitki yapraklarına 0.0, 0.1, 1 ve 100 µM SNP (NO vericisi) uygulanmıştır. Bu uygulamadan sonra, kontroldeki SNP'li ve SNP'siz bitkiler kesim tarihlerinden (14, 21 ve 28. günler) 2 gün önce soğuk şartlara 10/7 °C (bu sıcaklık ön denemelerle belirlenmiştir) transfer edilmiştir. Kontrol, düşük sıcaklık ve düşük sıcaklık + SNP'li bitki yaprakları 14, 21 ve 28 gün olduklarında kesilerek, % donma hasarı, apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktiviteleri, apoplastik ve hücrel antioksidan enzim aktiviteleri, H₂O₂ ve O₂⁻ miktarlarını, LPO seviyesini, NR enzim aktivitesi, içsel NO ve ABA miktarını, apoplastik ve hücrel proteinlerin SDS-PAGE elektroforez yöntemiyle profillerini belirleme deneyleri yapılmıştır.

Bulgular çizelgelerde ayrıntılı olarak gösterilmiş ve farklılıkların daha iyi anlaşılabilmesi için grafiklerle de desteklenmiştir. Öncelikle düşük sıcaklığın kontrol grubuna göre daha sonra ise SNP uygulamalarının düşük sıcaklığa göre yaptığı değişimler ayrıntılı olarak karşılaştırılmıştır. Böylelikle hem düşük sıcaklığın hem de düşük sıcaklık öncesi uygulanan NO'nun strese karşı rolünü açık bir şekilde istatistiksel olarak ortaya konulmuştur.

4.1. % Donma hasarı sonuçları

Tüm günlerde bitki yapraklarından elde edilen sonuçlara bakıldığında; düşük sıcaklık uygulaması kontrole göre donma hasarını artırmış ve donma daha erken derecelerde başlamıştır. Düşük sıcaklık öncesi uygulanan SNP ise konsantrasyona ve stresin meydana geldiği zamana bağlı olarak % donma hasarını ve donma noktasını etkilemiştir.

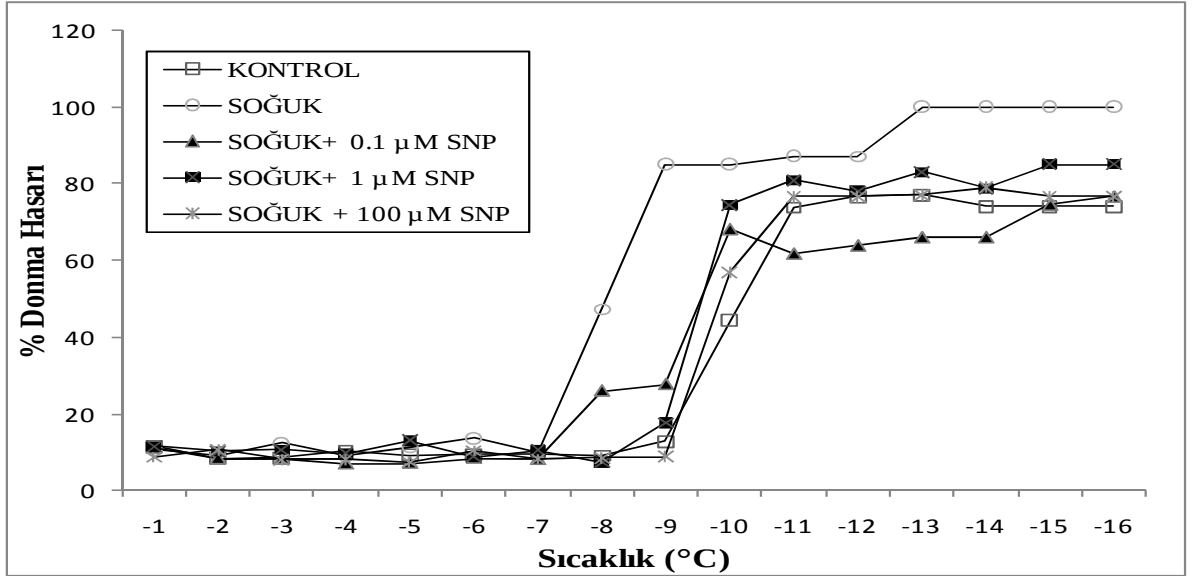
14 günlük mısır yaprakların da; düşük sıcaklığa göre SNP'nin tüm konsantrasyonları hem donma hasarını azaltmış hem de donma noktalarını geciktirmişlerdir. Tek başına düşük sıcaklık -9°C de donma hasarı %85 iken aynı derecede 0.1, 1, 100 μM SNP'ler de ise hasar sırasıyla %28, %18 ve %9 olmuştur (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1). Uygulanan SNP'ler sadece donma hasarını değil aynı zamanda donma noktalarını da geciktirmiştir. Düşük sıcaklık uygulamasında -9°C de hasar %50'nin üzerine çıkarken 0.1, 1, 100 μM SNP'ler de ise -10°C de bu değere ulaşılmıştır (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1.).

21 günlük mısır yaprakların da; düşük sıcaklığa göre SNP'nin tüm konsantrasyonları hem donma hasarını azaltmış hem de donma noktalarını geciktirmişlerdir. Tek başına düşük sıcaklık -9°C de donma hasarı %73 iken aynı derecede 0.1, 1, 100 μM SNP'ler de ise hasar sırasıyla %20, %22 ve %15 olmuştur (Çizelge 4.1.2. ve Şekil 4.1.2.). Uygulanan SNP'ler sadece donma hasarını değil aynı zamanda donma noktalarını da geciktirmiştir. Düşük sıcaklık uygulamasında -9°C de hasar %50'nin üzerine çıkarken 0.1, 1, 100 μM SNP'ler de ise -10°C de bu değere ulaşılmıştır (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2).

28 günlük mısır yaprakların da; düşük sıcaklığa göre SNP'nin tüm konsantrasyonları hem donma hasarını hem de donma noktalarını geciktirme üzerinde herhangi bir etki olmamıştır. Tek başına düşük sıcaklık -8°C de donma hasarı %53 iken aynı derecede 0.1, 1, 100 μM SNP'ler de ise hasar sırasıyla %93, %81 ve %78 olmuştur (Çizelge 4.1.3. ve Şekil 4.1.3.). Düşük sıcaklık uygulamasında -8°C de hasar %50'nin üzerine çıkarken 0.1, 1, 100 μM SNP'ler de ise -7°C de bu değere ulaşılmıştır (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3).

Çizelge 4.1. 25/22°C 'de büyütülen mısır fidelerine 10. gün sodyum nitroprussid (SNP) uygulanmış ve kesimden 2 gün önce soğuğa (10/7°C) transfer edildikten sonra **14. günde** kesilen yapraklardan elde edilen % donma hasarı değerleri.

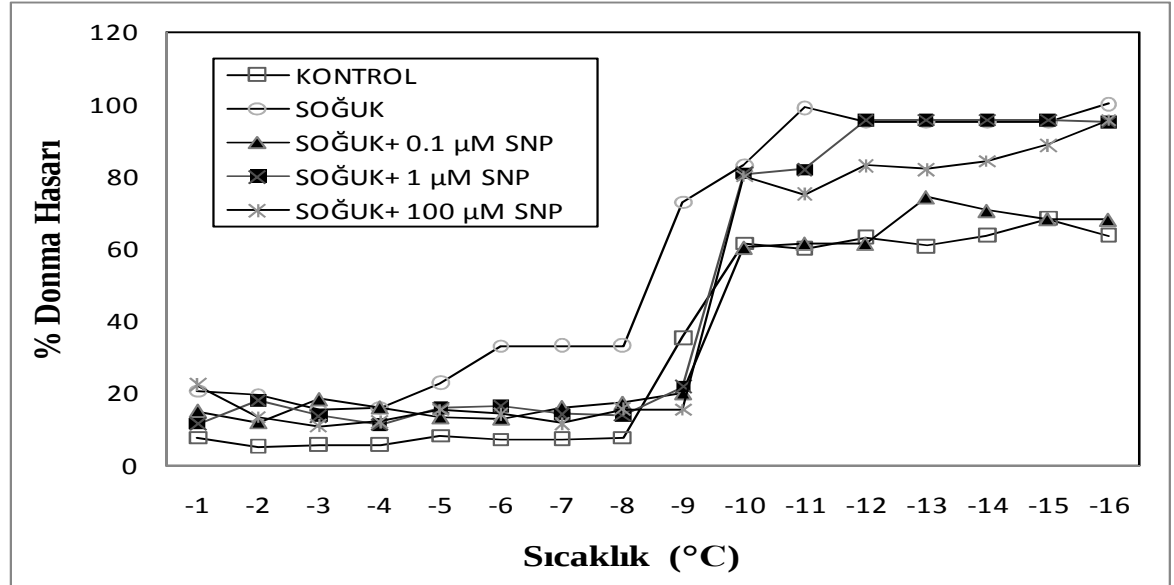
Sıcaklık ° C	İyon iletkenliği (µS/cm)					%Donma Hasarı				
	Kontrol	Soğuk	0.1 µM SNP	1 µM SNP	100 µM SNP	Kontrol	Soğuk	0.1 µM SNP	1 µM SNP	100 µM SNP
-1	54	50	52	54	41	11	11	11	11	9
-2	38	43	39	48	50	8	9	8	10	11
-3	42	58	39	50	38	9	12	8	11	8
-4	47	42	32,5	45,3	38	10	9	7	10	8
-5	38	53	33,5	61,3	35	9	11	7	13	7
-6	45	64	39,5	41,5	49	9	14	8	9	10
-7	45	46	38	49,5	39	10	10	8	11	8
-8	37	222	122	34,5	40	9	47	26	7	9
-9	70	400	130	83	41,5	13	85	28	18	9
-10	181	335	320	350	267,5	44	85	68	74	57
-11	349	410	290	380	360	74	87	62	81	77
-12	360	393	300	320	360	77	87	64	78	77
-13	280	470	310	390	300	77	100	66	83	77
-14	300	380	280	370	390	74	100	66	79	79
-15	340	390	350	400	360	74	100	74	85	77
-16	300	370	360	400	360	74	100	77	85	77



Şekil 4.1. 14. günde kesilen yapraklardan elde edilen % donma hasarı değerleri.

Çizelge 4.2. 25/22°C 'de büyütülen mısır fidelerine 10. gün sodyum nitroprussid (SNP) uygulanmış ve kesimden 2 gün önce soğuğa (10/7°C) transfer edildikten sonra **21. günde** kesilen yapraklardan elde edilen % donma hasarı değerleri.

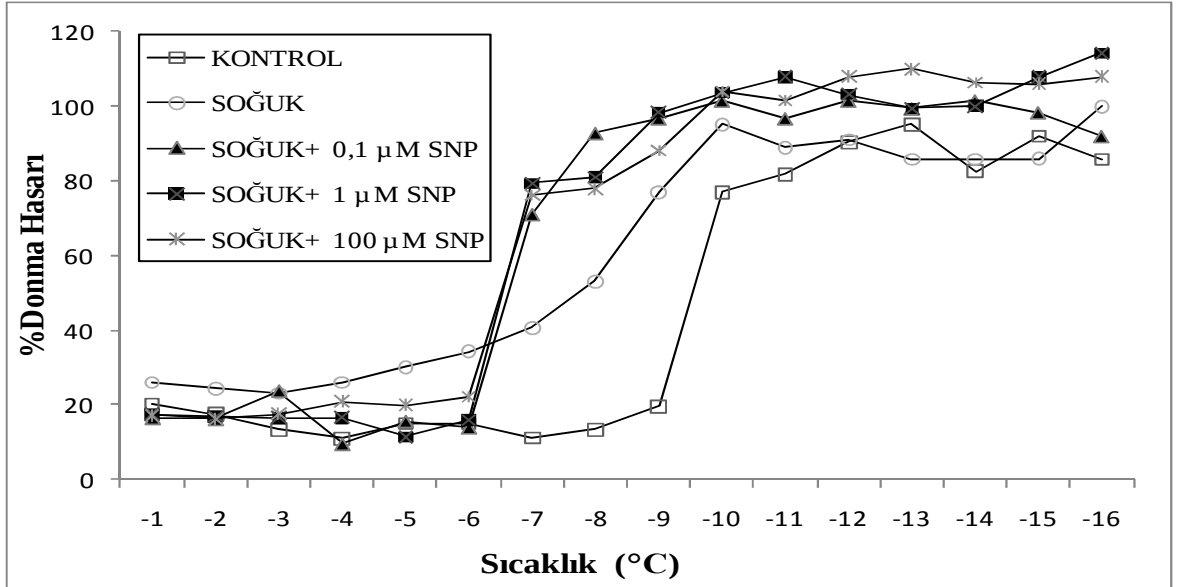
Sıcaklık ° C	iyon iletkenliği (µS/cm)					%Donma Hasarı				
	Kontrol	Soğuk	0.1 µM SNP	1 µM SNP	100 µM SNP	Kontrol	Soğuk	0.1 µM SNP	1 µM SNP	100 µM SNP
-1	33	90	66	50	98	8	20	15	11	22
-2	23	85	52	79	58	5	19	12	18	13
-3	25	67	80	60	48	6	15	18	14	11
-4	25	70	70	49	53	6	16	16	11	12
-5	35	100	58	69	67	8	23	13	16	15
-6	31	145	57	72	62	7	33	13	16	14
-7	32	120	71	62	51	7	33	16	14	11
-8	33	125	76	61	68	8	33	17	14	15
-9	156	320	88	96	68	35	73	20	22	15
-10	270	365	265	355	420	61	83	60	81	80
-11	245	435	270	360	330	60	99	61	82	75
-12	290	395	270	420	365	63	95	61	95	83
-13	267	360	327	420	360	61	95	74	95	82
-14	280	370	310	420	370	64	95	70	95	84
-15	300	370	300	420	390	68	95	68	95	89
-16	280	440	280	450	420	64	100	68	95	95



Şekil 4.2. 21. günde kesilen yapraklardan elde edilen % donma hasarı değerleri.

Çizelge 4.3. 25/22°C 'de büyütülen mısır fidelerine 10. gün sodyum nitroprussid (SNP) uygulanmış ve kesimden 2 gün önce soğuğa (10/7°C) transfer edildikten sonra **28. günde** kesilen yapraklardan elde edilen % donma hasarı değerleri.

Sıcaklık ° C	iyon iletkenliği (µS/cm)					%Donma Hasarı				
	Kontrol	Soğuk	0.1 µM SNP	1 µM SNP	100 µM SNP	Kontrol	Soğuk	0.1 µM SNP	1 µM SNP	100 µM SNP
-1	63	82	52	55	54	20	26	17	17	17
-2	55	77	51	53	51	17	24	16	17	16
-3	42	73	75	52	55	13	23	24	17	17
-4	35	82	30	52	66	11	26	10	17	21
-5	47	95	49	36	63	15	30	16	11	20
-6	47	108	44	50	70	15	34	14	16	22
-7	35	128	224	250	240	11	41	71	79	76
-8	42	167	293	225	182	13	53	93	81	78
-9	62	243	305	310	278	20	77	97	98	88
-10	243	300	320	327	328	77	95	102	104	104
-11	258	280	305	340	320	82	89	97	108	102
-12	285	287	320	325	340	90	91	102	103	108
-13	300	270	313	313	420	95	86	99	99	110
-14	260	270	320	390	335	83	86	102	100	106
-15	290	200	310	340	300	92	86	98	108	106
-16	270	315	290	360	340	86	100	92	114	108



Şekil 4.3. 28. günde kesilen yapraklardan elde edilen % donma hasarı değerleri.

4.2. Buz nükleasyon aktivitesi sonuçları

Aktivite, 14, 21 ve 28. günlerde soğuk ve soğuk+SNP uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir. Uygulamanın yapıldığı tüm günlerde düşük sıcaklık apoplastik bölgedeki proteinlerin buz nükleasyon aktivitelerini kontrol grubuna göre önemli oranlarda düşürmüştür. 14, 21 ve 28 günlük bitkilerde buz nükleasyon aktivitesi kontrollerine sırasıyla %13, %15, %8 olarak azaltarak donma noktalarını da 1.1, 1.5 ve 0.6°C olarak düşürmüştür (Çizelge 4.4., 4.5., 4.6 Şekil 4.4., 4.5., 4.6).

14 günlük mısır yapraklarında düşük sıcaklığa göre soğuk+SNP uygulamalarında konsantrasyona bağlı olarak buz nükleasyon aktivitesinde artış meydana gelmiştir. 0.1 µM SNP uygulaması tek başına düşük sıcaklığa göre aktiviteyi %10,8 oranında artırarak donma noktasını da 0.8°C geciktirmiştir. 1 µM SNP uygulaması tek başına düşük sıcaklığa göre aktiviteyi %12,16 oranında artırarak donma noktasını da 0.9°C geciktirmiştir. 100 µM SNP uygulaması ise tek başına düşük sıcaklığa göre aktiviteyi %48,6 oranında önemli ($P<0.05$) derecede artırarak donma noktasını da 3.6°C geciktirmiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4).

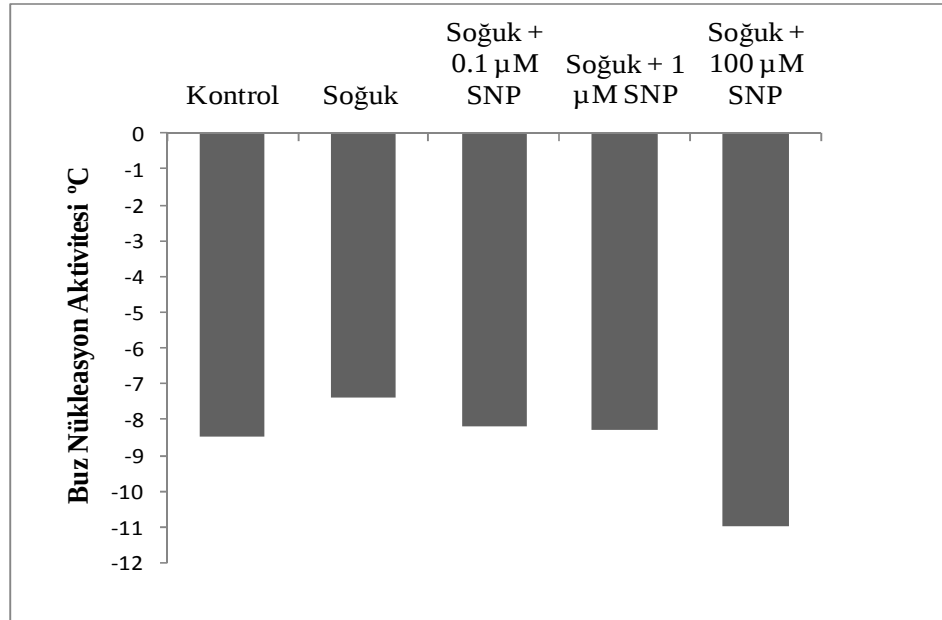
21 günlük mısır yapraklarında da düşük sıcaklığa göre soğuk+SNP uygulamalarında konsantrasyona bağlı olarak buz nükleasyon aktivitesinde önemli ($P<0.05$) oranlarda artış meydana gelmiştir. 0.1 µM SNP uygulaması tek başın düşük sıcaklığa göre aktiviteyi %5 oranında artırarak donma noktasını da 0.4°C geciktirmiştir. 1 µM SNP uygulaması tek başına düşük sıcaklığa göre aktiviteyi %24 olarak önemli ($P<0.05$) bir oranda artırarak donma noktasını da 1.9°C geciktirmiştir. 100 µM SNP uygulaması ise tek başına düşük sıcaklığa göre aktiviteyi %6 oranında azaltarak donma noktasını da 0.5°C düşürmüştür (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5).

28 günlük mısır yapraklarında düşük sıcaklığa göre soğuk+SNP uygulamalarında konsantrasyona bağlı olarak buz nükleasyon aktivitesinde değişiklikler meydana gelmiştir.

0.1 ve 1 μM SNP uygulamaları tek başına düşük sıcaklığa göre aktivite ve donma noktasını geciktirme üzerinde herhangi bir etki gösterememişlerdir. 100 μM SNP uygulaması tek başına düşük sıcaklığa göre aktiviteyi önemli ($P<0.05$) bir oranda %13 oranında artırarak donma noktasını da 0.8°C geciktirmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6).

Çizelge 4.4. 14 günlük mısır yapraklarından elde edilen apoplastik **buz nükleasyon** aktivitesi değerleri. Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

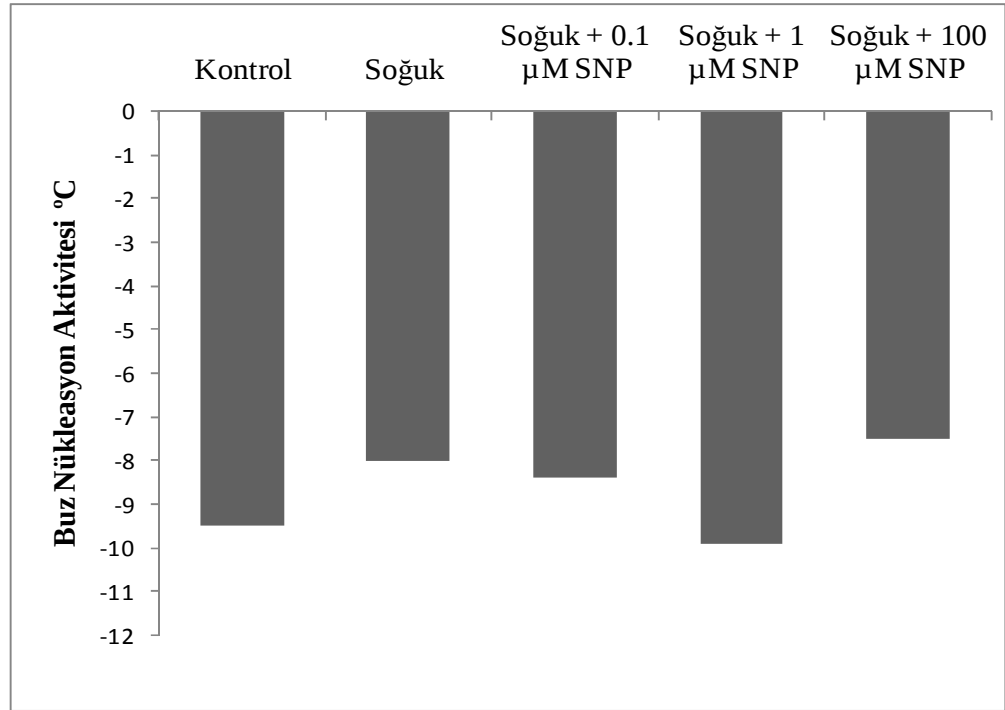
	14 günlük ($^\circ\text{C}$)
Kontrol	-8,5 ^b
Soğuk	-7,4 ^c
Soğuk + 0,1 μM SNP	-8,2 ^{bc}
Soğuk + 1 μM SNP	-8,3 ^{bc}
Soğuk + 100 μM SNP	-11 ^a



Şekil 4.4. 14. günde kesilen yapraklardan elde edilen apoplastik buz nükleasyon değerleri.

Çizelge 4.5. 21 günlük mısır yapraklarından elde edilen apoplastik **buz nükleasyon** aktivitesi değerleri. Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$)

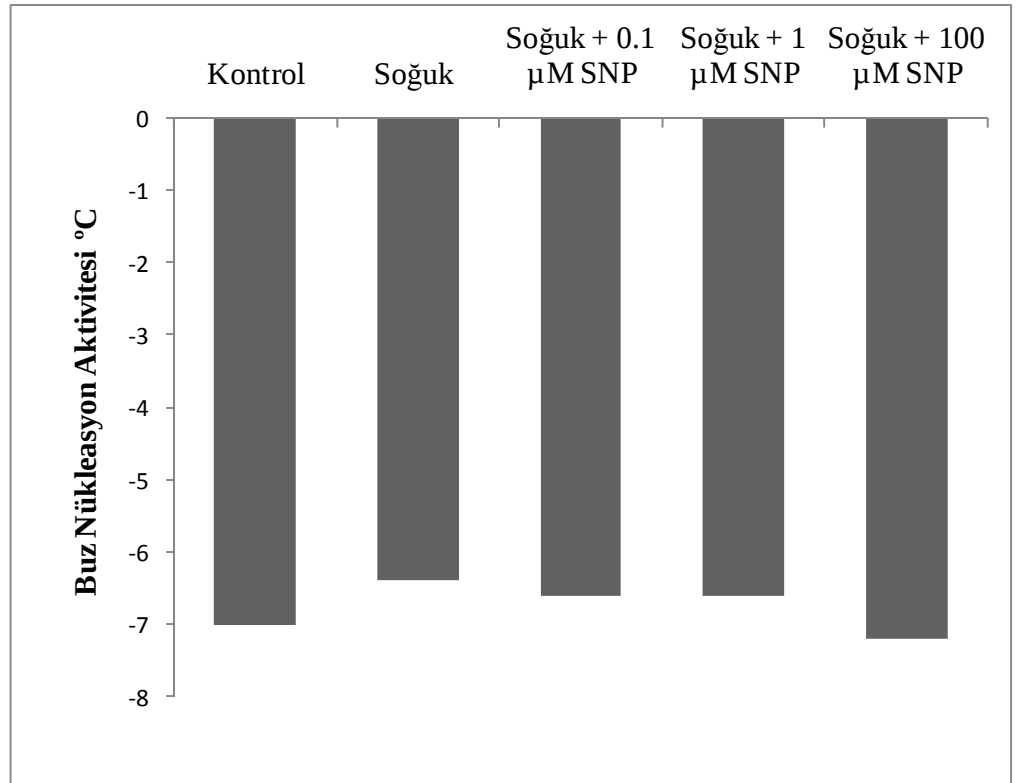
	21 günlük (° C)
Kontrol	-9,5 ^{ab}
Soğuk	-8 ^c
Soğuk + 0,1 µM SNP	-8,4 ^{bc}
Soğuk + 1 µM SNP	-9,9 ^a
Soğuk + 100 µM SNP	-7,5 ^c



Şekil 4.5. 21. günde kesilen yapraklardan elde edilen apoplastik buz nükleasyon değerleri.

Çizelge 4.6. 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen apoplastik **buz nükleasyon** aktivitesi değerleri. Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

	28 günlük (° C)
Kontrol	-7 ^{ab}
Soğuk	-6,4 ^c
Soğuk + 0,1 µM SNP	-6,6 ^c
Soğuk + 1 µM SNP	-6,6 ^c
Soğuk + 100 µM SNP	-7,2 ^a



Şekil 4.6. 28. günde kesilen yapraklardan elde edilen apoplastik buz nükleasyon değerleri.

4.3. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarı sonuçları

Düşük sıcaklık uygulaması tüm günlerde kontrollerine göre mısır bitkisinin yapraklarının H₂O₂ miktarlarında önemli artışlara neden oldu. 14, 21 ve 28 günlük kontrol bitkilerinde H₂O₂ miktarları sırasıyla 46.4, 54.2 ve 41.6 ng.g⁻¹ olarak ölçülürken, bu değerler düşük sıcaklık uygulamalarıyla sırasıyla 62.8, 101 ve 42.4 ng.g⁻¹'a kadar arttı (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7).

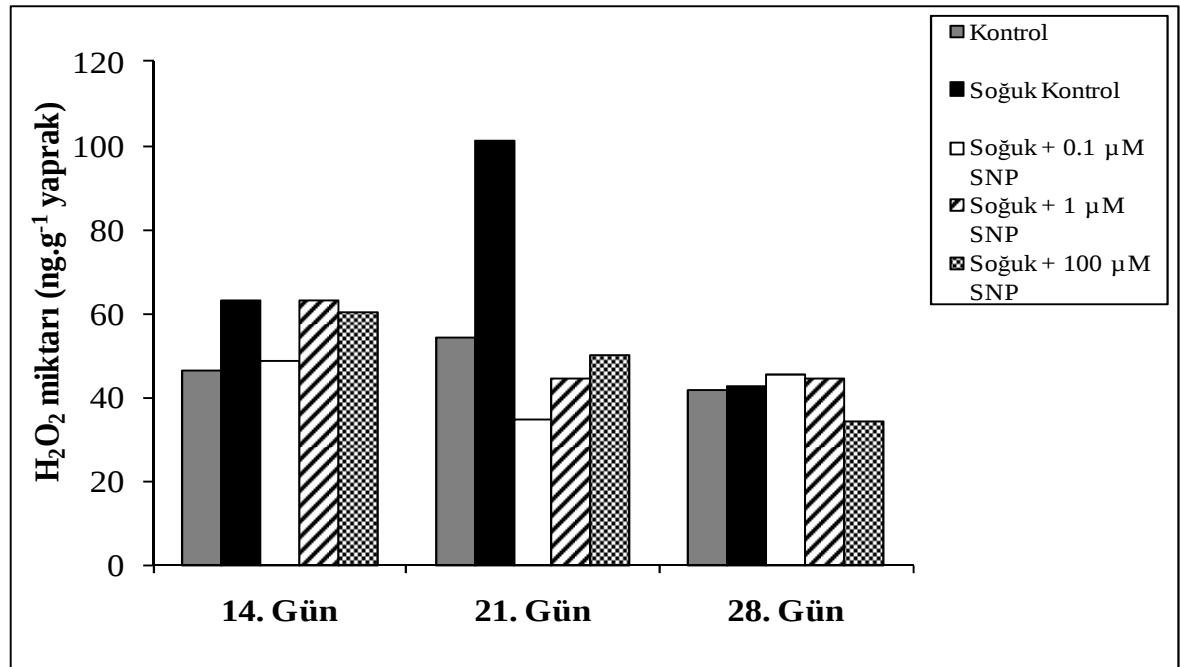
14 günlük bitkilerde düşük sıcaklık öncesi uygulanan SNP konsantrasyonları farklı oranlarda H₂O₂ miktarlarını etkilemiştir. 0.1 µM SNP tek başına düşük sıcaklığa göre H₂O₂ miktarını önemli (P<0.05) bir oranda %23 olarak düşürdü. 1 ve 100 µM SNP konsantrasyonları ise düşük sıcaklığa göre H₂O₂ miktarları üzerinde etkili (P>0.05) olmamıştır (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7).

21 günlük bitkilerde düşük sıcaklığa göre SNP'nin tüm konsantrasyonları H₂O₂ miktarını önemli (P<0.05) oranlarda düşürdü. 0.1 µM SNP düşük sıcaklığa göre H₂O₂ miktarını önemli oranda %65 olarak düşürdü ve düşük sıcaklıkta 101 ng.g⁻¹'a kadar artan H₂O₂ miktarını 34.8 ng.g⁻¹'a kadar düşürdü. 1 µM SNP düşük sıcaklığa göre H₂O₂ miktarını önemli (P<0.05) oranda %56 olarak düşürdü ve düşük sıcaklıkta 101 ng.g⁻¹'a kadar artan H₂O₂ miktarını 44.2 ng.g⁻¹'a kadar düşürdü. 100 µM SNP ise düşük sıcaklığa göre H₂O₂ miktarını önemli (P<0.05) oranda %50 olarak düşürdü ve düşük sıcaklıkta 101 ng.g⁻¹'a kadar artan H₂O₂ miktarını 50 ng.g⁻¹'a kadar düşürdü (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7).

28 günlük mısır yapraklarında düşük sıcaklık uygulaması kontrol bitkilerine göre H₂O₂ miktarında önemli bir değişiklik meydana gelmemiştir (P>0.05). Aynı şekilde 0.1 ve 1 µM uygulamalarında tek başına düşük sıcaklığa maruz kalan yaprakların H₂O₂ miktarlarında önemli bir değişiklik olmamıştır. Ancak 100 µM SNP ise düşük sıcaklığa göre önemli (P<0.05) oranda %20 olarak H₂O₂ miktarını düşürmüştür (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7)

Çizelge 4.7. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen **hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarı** değerleri ($ng.g^{-1}$ yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

	14.Gün	21.Gün	28. Gün
Kontrol	46.4 ^b	54.2 ^b	41.6 ^a
Soğuk	62.8 ^a	101 ^a	42.4 ^a
Soğuk + 0.1 μM SNP	48.4 ^b	34.8 ^d	45.4 ^a
Soğuk + 1 μM SNP	62.8 ^a	44.2 ^c	44.2 ^a
Soğuk + 100 μM SNP	60.2 ^a	50 ^b	34.2 ^b



Şekil 4.7. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen **hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarı** değerleri ($ng.g^{-1}$ yaprak).

4.4. Süperoksit anyonu (O_2^-) miktarı sonuçları

Düşük sıcaklık uygulaması tüm günlerde kontrollerine göre mısır bitkisinin yapraklarının O_2^- miktarlarında önemli artışlara neden oldu. 14, 21 ve 28 günlük kontrol bitkilerinde O_2^- miktarları sırasıyla 5.71, 4.78 ve 5.01 $\mu\text{g/g}$ olarak ölçülürken, bu değerler düşük sıcaklık uygulamalarıyla sırasıyla 6.63, 5.74 ve 6.2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ 'a kadar arttı (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8).

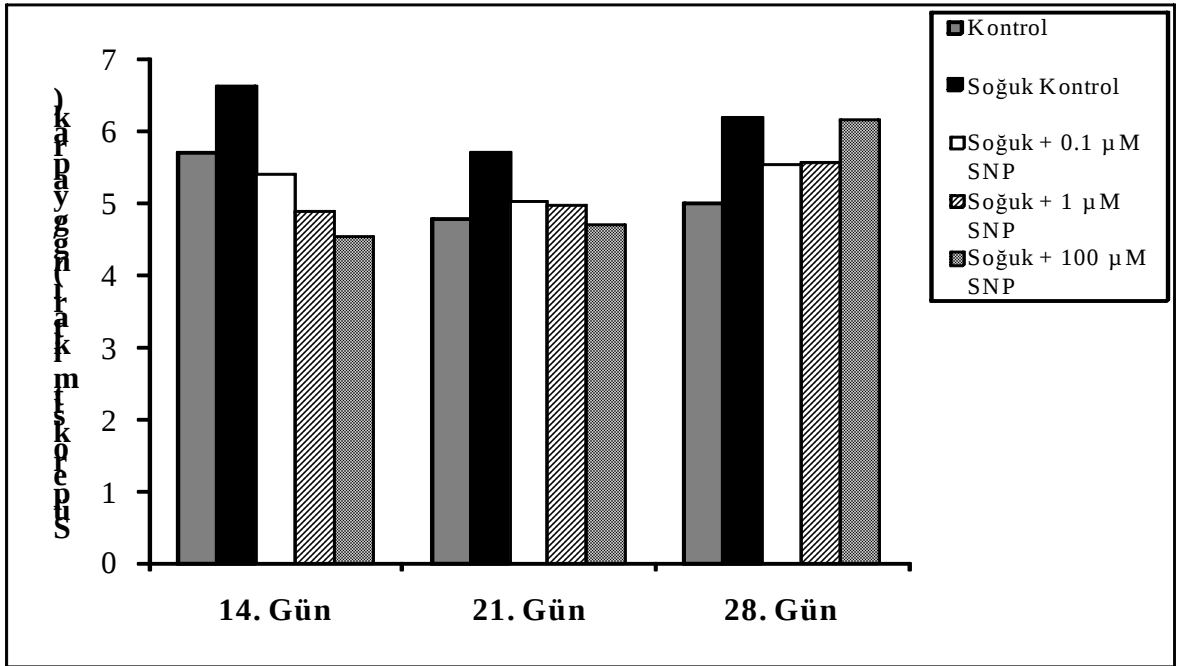
14 günlük bitkilerde düşük sıcaklık öncesi uygulanan SNP konsantrasyonları farklı oranlarda O_2^- miktarlarını etkilemiştir. 0.1, 1 ve 100 μM SNP uygulamaları tek başına düşük sıcaklık uygulamasına göre O_2^- miktarını önemli ($P<0.05$) oranlarda sırasıyla %18, %26 ve %31 olarak düşürdü. Düşük sıcaklık uygulamasıyla 6.63 $\mu\text{g.g}^{-1}$ olarak belirlenen O_2^- miktarı 0.1, 1 ve 100 μM SNP uygulamaları ile sırasıyla 5.4, 4.91 ve 4.54 $\mu\text{g.g}^{-1}$ 'a kadar azaldığı belirlendi (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8).

21 günlük bitkilerde düşük sıcaklığa göre SNP'nin tüm konsantrasyonları O_2^- miktarını önemli ($P<0.05$) oranlarda düşürdü. 0.1, 1 ve 100 μM SNP uygulamaları tek başına düşük sıcaklık uygulamasına göre O_2^- miktarını önemli ($P<0.05$) oranlarda sırasıyla %12, %15 ve %15 olarak düşürdü. Düşük sıcaklık uygulamasıyla 5.74 $\mu\text{g.g}^{-1}$ olarak belirlenen O_2^- miktarı 0.1, 1 ve 100 μM SNP uygulamaları ile sırasıyla 5.02, 4.89 ve 4.86 $\mu\text{g.g}^{-1}$ 'a kadar azaldığı belirlendi (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8).

28 günlük mısır yapraklarında da aynı şekilde SNP'nin tüm konsantrasyonları O_2^- miktarını önemli ($P<0.05$) oranlarda düşürdü. 0.1 ve 1 μM SNP uygulamaları tek başına düşük sıcaklık uygulamasına göre O_2^- miktarını önemli ($P<0.05$) oranlarda sırasıyla %10 ve %11 olarak düşürdü. Düşük sıcaklık uygulamasıyla 6.20 $\mu\text{g.g}^{-1}$ olarak belirlenen O_2^- miktarı 0.1 ve 1 μM SNP uygulamaları ile MDA miktarı sırasıyla 5.54 ve 5.58 $\mu\text{g.g}^{-1}$ 'a kadar azaldığı belirlendi. 100 μM SNP uygulaması ise MDA üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8).

Çizelge 4.8. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen **süperoksit anyonu** miktarı değerleri ($\mu\text{g.g}^{-1}$ yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

	14.Gün	21.Gün	28. Gün
Kontrol	5.71 ^b	4.78 ^b	5.01 ^c
Soğuk	6.63 ^a	5.74 ^a	6.20 ^a
Soğuk + 0.1 μM SNP	5.40 ^{bc}	5.02 ^b	5.54 ^b
Soğuk + 1 μM SNP	4.91 ^{cd}	4.89 ^b	5.58 ^b
Soğuk + 100 μM SNP	4.54 ^d	4.86 ^b	6.18 ^a



Şekil 4.8. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen **süperoksit anyonu** miktarı değerleri ($\mu\text{g.g}^{-1}$ yaprak).

4.5. Lipid peroksidasyon seviyesi (MDA miktarı) sonuçları

Düşük sıcaklık uygulaması tüm günlerde kontrollerine göre mısır bitkisinin yapraklarının MDA miktarlarında önemli artışlara neden oldu. 14, 21 ve 28 günlük kontrol bitkilerinde MDA miktarları sırasıyla 1.14, 1.64 ve 2.53 nmol.g⁻¹ olarak ölçülürken, bu değerler düşük sıcaklık uygulamalarıyla sırasıyla 1.75, 2.02 ve 2.75 nmol.g⁻¹'ye kadar arttı (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.9).

14 günlük bitkilerde düşük sıcaklık öncesi uygulanan SNP konsantrasyonları farklı oranlarda MDA miktarlarını etkilemiştir. 0.1µM SNP uygulaması tek başına düşük sıcaklık uygulamasına göre MDA miktarını önemli (P<0.05) bir oranda %20 olarak düşürdü. Düşük sıcaklık uygulamasıyla 1.74 nmol.g⁻¹olarak belirlenen MDA miktarı 0.1 µM SNP uygulaması ile sırasıyla 1.4 nmol.g⁻¹'ye kadar azaldığı belirlendi. 1 ve 100 µM SNP uygulamaları ise düşük sıcaklığa göre yaprak MDA miktarı üzerinde etkili olmamıştır (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.9).

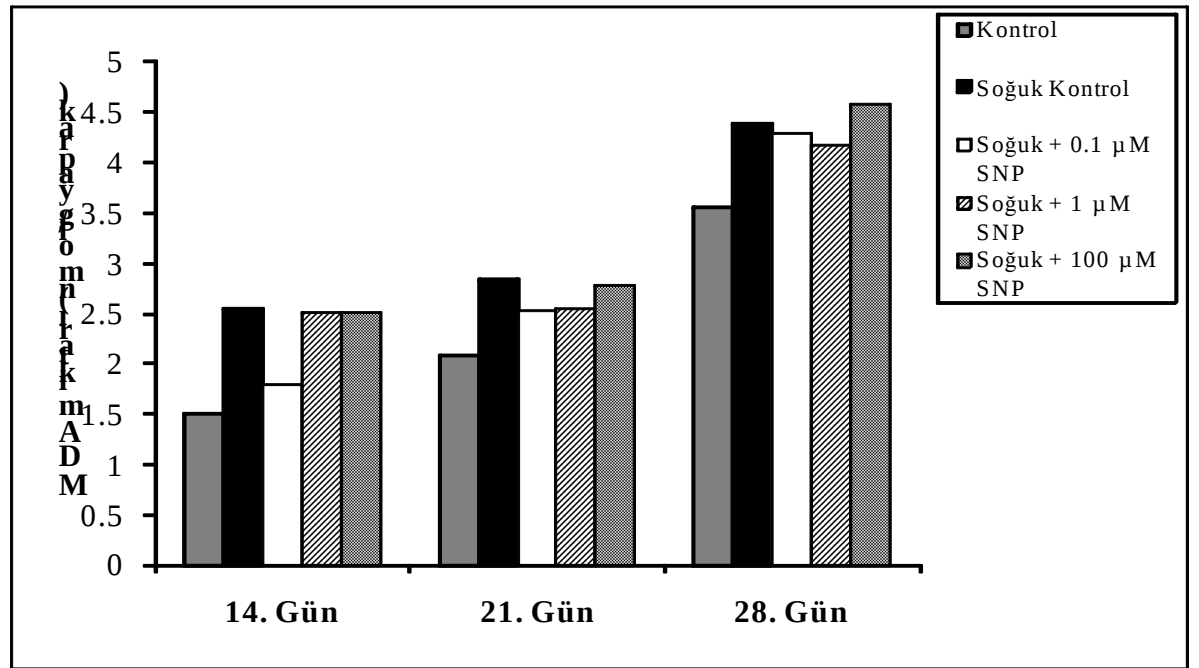
21 günlük bitkilerde düşük sıcaklık öncesi uygulanan SNP konsantrasyonları farklı oranlarda MDA miktarlarını etkilemiştir. 0.1 ve 1 µM SNP uygulamaları tek başına düşük sıcaklık uygulamasına göre MDA miktarını sırasıyla %8.4 ve %7.9 olarak düşürdü. Düşük sıcaklık uygulamasıyla 2.02 nmol.g⁻¹ olarak belirlenen MDA miktarı 0.1 ve 1 µM SNP uygulamaları ile sırasıyla 1.85 ve 1.86 nmol.g⁻¹'ye kadar azaldığı belirlendi (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.5). 100 µM SNP uygulamaları ise düşük sıcaklığa göre yaprak MDA miktarı üzerinde etkili olmamıştır (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.9)

28 günlük mısır yapraklarında da aynı şekilde SNP'nin 0.1 ve 1 µM konsantrasyonları MDA miktarını az da olsa düşürmüştür. 100 µM SNP uygulaması ise tek başına düşük sıcaklık uygulamasına göre MDA miktarını oranda artırmıştır. Düşük sıcaklık uygulamasıyla 4.39 nmol.g⁻¹olarak belirlenen MDA miktarı 0.1, 1 ve 100 µM SNP

uygulamaları ile sırasıyla 4.29, 4.17 ve 4.59 nmol.g⁻¹ olarak belirlendi (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.9).

Çizelge 4.9. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen **Malondialdetid (MDA)** miktarı değerleri (nmol.g⁻¹ yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir (P>0.05).

	14.Gün	21.Gün	28. Gün
Kontrol	1.5 ^c	2.08 ^c	3.56 ^e
Soğuk	2.55 ^a	2.83 ^a	4.39 ^b
Soğuk + 0.1 µM SNP	1.79 ^b	2.53 ^b	4.29 ^c
Soğuk + 1 µM SNP	2.51 ^a	2.55 ^b	4.17 ^d
Soğuk + 100 µM SNP	2.51 ^a	2.79 ^a	4.59 ^a



Şekil 4.9. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen **Malondialdetid (MDA)** miktarı değerleri (nmol.g⁻¹ yaprak).

4.6. Apoplastik antioksidant enzim aktiviteri sonuçları

4.6.1. Apoplastik SOD enzim aktivitesi

Apoplastik SOD aktivitesi 14, 21 ve 28 günlük mısır bitkisi yapraklarında hem soğuk hemde soğuk + SNP uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.10).

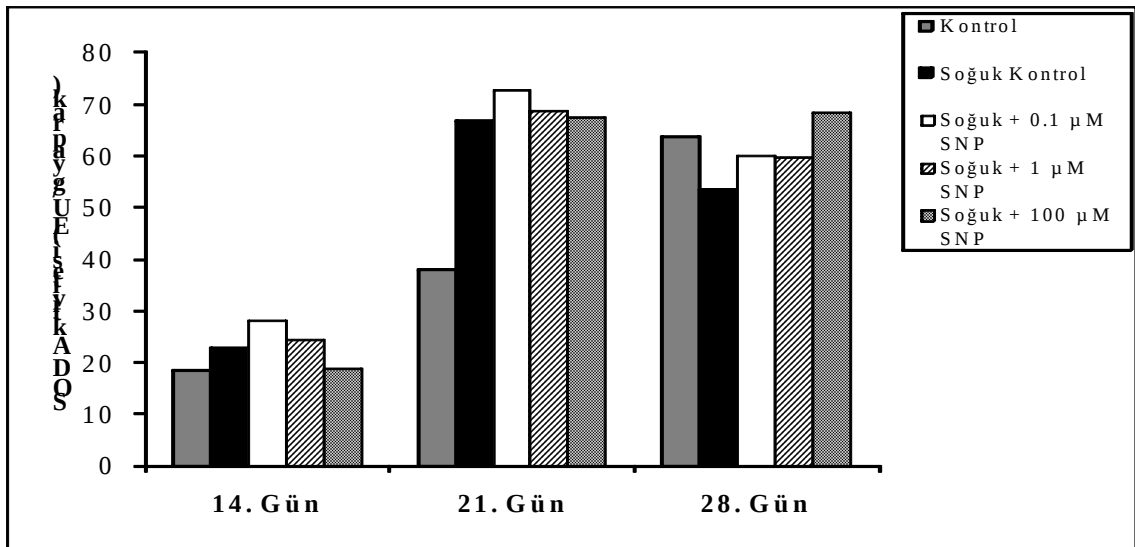
14 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre apoplastik SOD aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki apoplastik SOD aktivitesi 18.37 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %76'lık bir artışla 22.8 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 0.1 ve $1 \mu\text{M}$ SNP uygulamaları ise düşük sıcaklık ile artan apoplastik SOD aktivitesini daha da arttırdığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile apoplastik SOD aktivitesi 22.8 EU.g^{-1} iken bu değer 0.1 μM SNP için %23'lük artışla 28.07 EU.g^{-1} , 1 μM SNP için %6.7'lik artışla 24.33 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 100 μM SNP uygulaması ise düşük sıcaklığa göre aktivite üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.10).

21 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre apoplastik SOD aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki apoplastik SOD aktivitesi 38 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %24'lük önemli ($P < 0.05$) bir artışla 66.86 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 0.1 μM SNP uygulaması düşük sıcaklık ile artan apoplastik SOD aktivitesini daha da arttırdığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile apoplastik SOD aktivitesi 66.86 EU.g^{-1} iken bu değer 0.1 μM SNP için %10'luk artışla 73 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 1 ve 100 μM SNP uygulamaları ise düşük sıcaklığa göre aktivite üzerinde etkili olamadıkları belirlenmiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.10).

28 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre apoplastik SOD aktivitesinde önemli bir düşüşe neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki apoplastik SOD aktivitesi 63.8 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %16'lık önemli ($P < 0.05$) bir düşüşle 53.59 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 0.1, 1 ve $100 \mu\text{M}$ SNP uygulamaları düşük sıcaklık ile azalan apoplastik SOD aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile apoplastik SOD aktivitesi 53.59 EU.g^{-1} iken bu değer 0.1 μM SNP için %12'lik artışla 59.89 EU.g^{-1} , 1 μM SNP için % 11'lik artışla 59.55 EU.g^{-1} ve $100 \mu\text{M}$ SNP içinde %27'lik bir artışla 68.4 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.10)

Çizelge 4.10. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen apoplastik **süperoksit dismutaz (SOD)** enzim aktivitesi değerleri (EU.g^{-1}). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P > 0.05$).

	14.Gün	21.Gün	28. Gün
Kontrol	18,37 ^b	38 ^c	63,8 ^{ab}
Soğuk	22,8 ^{ab}	66,86 ^b	53,59 ^b
Soğuk + 0.1 μM SNP	28,07 ^a	73 ^a	59,89 ^{ab}
Soğuk + 1 μM SNP	24,33 ^{ab}	69 ^{ab}	59,55 ^{ab}
Soğuk + 100 μM SNP	18,71 ^b	67,37 ^b	68,4 ^a



Şekil 4.10. 25/22°C 'de büyütülen mısır fidelerine 10. gün sodyum nitroprussid (SNP) uygulanmış ve kesimden 2 gün önce soğuğa (10/7°C) transfer edildikten sonra **14, 21 ve 28. günlerde** kesilen yapraklardan elde edilen **apoplastik SOD** enzim aktivitesi değerleri.

4.6.2. Apoplastik POD enzim aktivitesi

14 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre apoplastik POD aktivitesinde önemli bir azalışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki apoplastik POD aktivitesi 6024 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %36'lık düşüşle 3836 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 0.1 ve 1 μM SNP uygulamaları ise düşük sıcaklık ile azalan apoplastik POD aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile apoplastik POD aktivitesi 3836 EU.g^{-1} iken bu değer 0.1 μM SNP için %100'lük çok önemli bir artışla 7818 EU.g^{-1} , 1 μM SNP için %48'lik artışla 5713 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 100 μM SNP uygulaması ise düşük sıcaklığa göre aktivite üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.11).

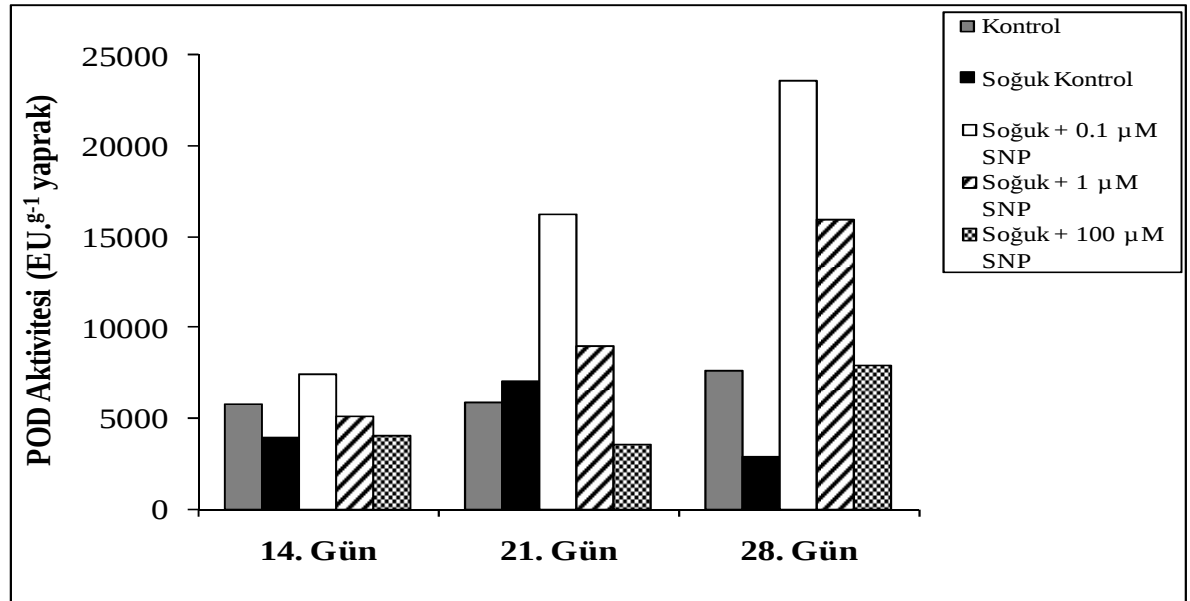
21 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre apoplastik POD aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki apoplastik POD aktivitesi 5826 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %21'lik önemli ($P<0.05$) bir artışla 7050 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 0.1 ve 1 μM SNP uygulamaları ise düşük sıcaklık ile artan apoplastik POD aktivitesini daha da arttırdığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile apoplastik POD aktivitesi 7050 EU.g^{-1} iken bu değer 0.1 μM SNP için %129'luk önemli bir artışla 16183 EU.g^{-1} , 1 μM SNP için %27'lik artışla 8980 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 100 μM SNP uygulamaları ise düşük sıcaklığa göre %50'lik bir azalışla aktiviteyi düşürdüğü belirlenmiştir (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.11).

28 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre apoplastik POD aktivitesinde önemli bir düşüşe neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki apoplastik POD aktivitesi 7620 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %62'lik önemli ($P<0.05$) bir düşüşle 2893 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 0.1, 1 ve 100 μM SNP uygulamaları düşük sıcaklık ile azalan apoplastik POD aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile apoplastik POD aktivitesi 2893 EU.g^{-1} iken bu değer 0.1 μM SNP için %

700'lik artışla 23580 EU.g⁻¹, 1 µM SNP için %450'lik artışla 15943 EU.g⁻¹ ve 100 µM SNP içinde %174'lik bir artışla 7940 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.11).

Çizelge 4.11. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen apoplastik **peroksidaz (POD) enzim** aktivitesi değerleri (EU.g⁻¹ yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir (P>0.05).

	14.Gün	21.Gün	28. Gün
Kontrol	6024 ^b	5826 ^d	7620 ^c
Soğuk	3836 ^c	7050 ^c	2893 ^d
Soğuk + 0.1 µM SNP	7818 ^a	16183 ^a	23580 ^a
Soğuk + 1 µM SNP	5713 ^b	8980 ^b	15943 ^b
Soğuk + 100 µM SNP	3836 ^c	3563 ^e	7940 ^c



Şekil 4.11. 25/22 °C 'de büyütülen mısır fidelerine 10. gün sodyum nitroprussid (SNP) uygulanmış ve kesimden 2 gün önce soğuğa (10/7°C) transfer edildikten sonra **14, 21 ve 28. günlerde** kesilen yapraklardan elde edilen **apoplastik POD enzim** aktivitesi değerleri.

4.7. Hücresel antioksidan enzim sonuçları

4.7.1. Hücresel SOD enzim aktivitesi

Hücresel SOD aktivitesi 14, 21 ve 28 günlük mısır bitkisi yapraklarında hem soğuk hem de soğuk + SNP uygulamalarından önemli ($P<0.05$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.12).

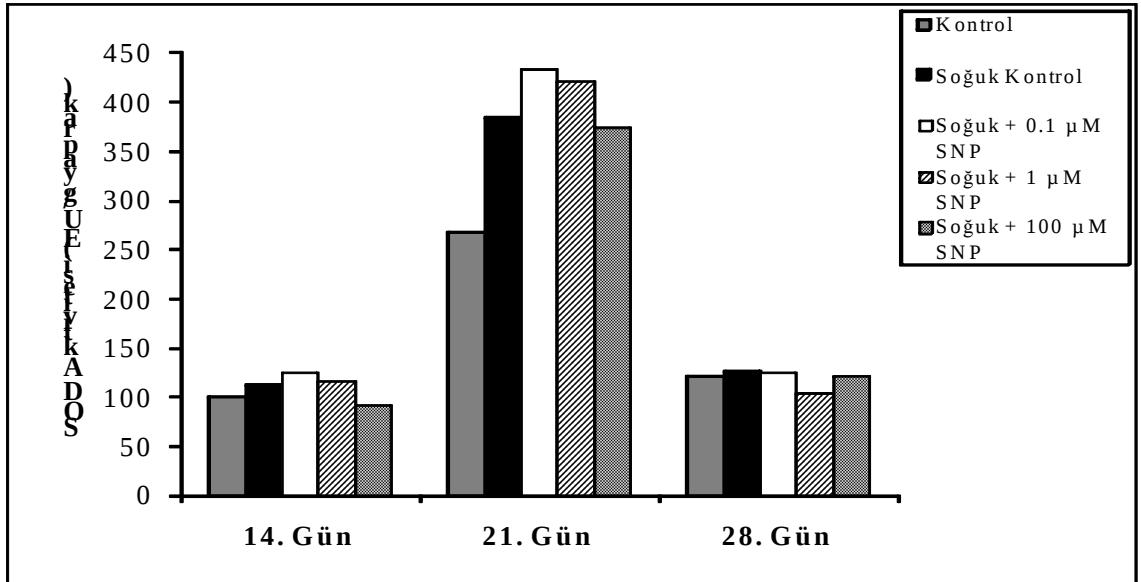
14 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre hücresel SOD aktivitesinde artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücresel SOD aktivitesi 100 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %12'lik bir artışla 112 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. $0.1 \mu\text{M}$ SNP uygulaması düşük sıcaklık ile artan hücresel SOD aktivitesini daha da arttırdığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile hücresel SOD aktivitesi 112 EU/g iken bu değer $0.1 \mu\text{M}$ SNP için %10'luk artışla 125 EU.g^{-1} olarak belirlendi. $1 \mu\text{M}$ SNP düşük sıcaklığa göre hücresel SOD aktivitesi üzerinde etkili olmamıştır. $100 \mu\text{M}$ SNP uygulaması ise düşük sıcaklığa göre aktivite üzerinde %17'lik bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.12).

21 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre hücresel SOD aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücresel SOD aktivitesi 268 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %44'lük önemli ($P<0.05$) bir artışla 385 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 0.1 ve $1 \mu\text{M}$ SNP uygulaması düşük sıcaklık ile artan hücresel SOD aktivitesini daha da arttırdığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile hücresel SOD aktivitesi 385 EU.g^{-1} iken bu değer $0.1 \mu\text{M}$ SNP için %12'lik artışla 434 EU.g^{-1} , $1 \mu\text{M}$ SNP için %10'luk artışla 422 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. $100 \mu\text{M}$ SNP uygulaması ise düşük sıcaklığa göre aktivite üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.12).

28 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre hücrel SOD aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücrel SOD aktivitesi 122 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer ($P>0.05$) 126 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 0.1 ve 100 μM SNP uygulamaları düşük sıcaklığa göre hücrel SOD aktivitesi üzerinde etkili olmadıkları belirlenmiştir. Ancak 1 μM SNP düşük sıcaklığa göre %18'lik bir azalışla hücrel SOD aktivitesi 103 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.12).

Çizelge 4.12. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen **hücrel süperoksit dismutaz (SOD)** enzim aktivitesi değerleri (EU.g^{-1} yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

	14.Gün	21.Gün	28. Gün
Kontrol	100 ^c	268 ^d	122 ^a
Soğuk	112 ^{ab}	385 ^{bc}	126 ^a
Soğuk + 0.1 μM SNP	125 ^a	434 ^a	124 ^a
Soğuk + 1 μM SNP	116 ^a	422 ^{ab}	103 ^b
Soğuk + 100 μM SNP	92 ^c	374 ^c	122 ^a



Şekil 4.12. 25/22 °C 'de büyütülen mısır fidelerine 10. gün sodyum nitroprussid (SNP) uygulanmış ve kesimden 2 gün önce soğuğa (10/7°C) transfer edildikten sonra **14, 21 ve 28. günlerde** kesilen yapraklardan elde edilen **hücrel SOD** enzim aktivitesi değerleri.

4.7.2. Hücresel POD enzim aktivitesi

14 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre hücresel POD aktivitesinde düşüşe neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücresel POD aktivitesi 31200 EU/g iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %25'lik bir azalışla 23450 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. 0.1 ve 1 µM SNP uygulamaları düşük sıcaklık ile azalan hücresel POD aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile hücresel POD aktivitesi 23450 EU.g⁻¹ iken bu değer 0.1 µM SNP için %23'lük artışla 30550 EU.g⁻¹, 1 µM SNP için %62'lik önemli (P<0.05) bir artışla 38000 olarak belirlenmiştir. 100 µM SNP uygulaması ise düşük sıcaklığa göre aktivite üzerinde %50'lik bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.13).

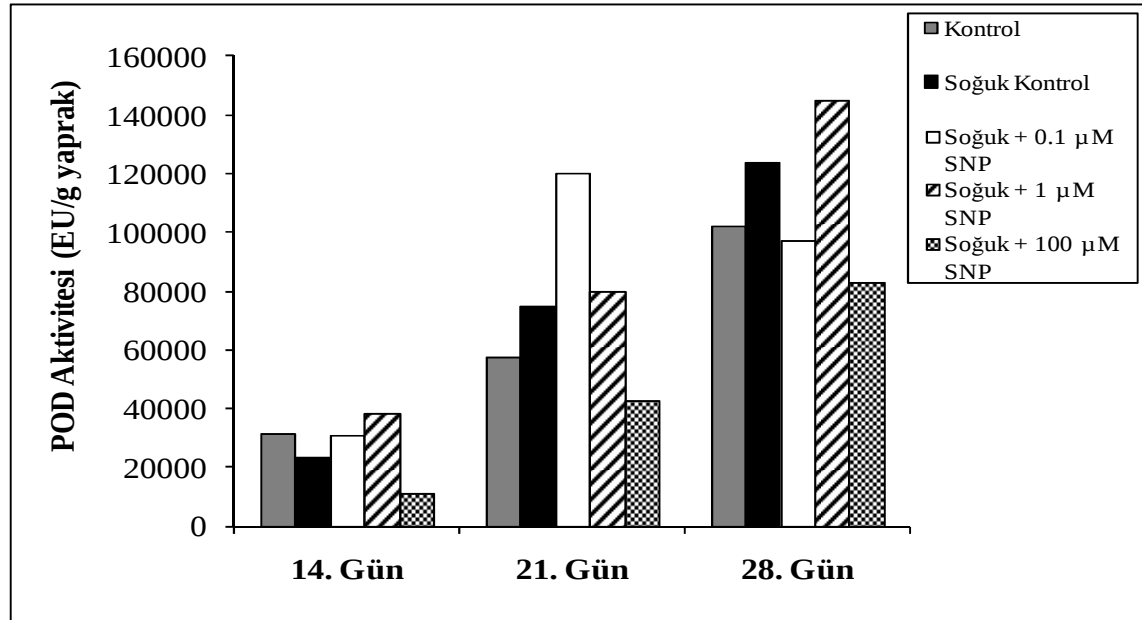
21 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre hücresel POD aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücresel POD aktivitesi 57650 EU.g⁻¹ iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %29'luk önemli (P<0.05) bir artışla 74800 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. 0.1 ve 1 µM SNP uygulaması düşük sıcaklık ile artan hücresel POD aktivitesini daha da arttırdığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile hücresel POD aktivitesi 74800 EU.g⁻¹ iken bu değer 0.1 µM SNP için %60'lık önemli (P<0.05) bir artışla 119869 EU.g⁻¹, 1 µM SNP için %6.4'lük artışla 79600 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. 100 µM SNP uygulaması ise düşük sıcaklığa göre aktivite üzerinde %40'lık bir azalışla hücresel POD aktivitesi 42600 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.13).

28 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre hücresel POD aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücresel POD aktivitesi 102050 EU.g⁻¹ iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %21'lik önemli (P<0.05) bir artışla 123800 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. 1 µM SNP düşük sıcaklığa göre %16'lık bir artışla 144550 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. Ancak 0.1 ve 100 µM SNP

uygulamaları düşük sıcaklığa göre hücrel POD aktivitesi üzerinde bir azalmaya neden oldukları belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile hücrel POD aktivitesi 123800 EU.g^{-1} iken bu değer $0.1 \mu\text{M}$ SNP için %21'lik azalma ile 96900 EU.g^{-1} , $100 \mu\text{M}$ SNP için %32'lik önemli ($P<0.05$) bir azalmayla 83100 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.13).

Çizelge 4.13. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen **hücrel peroksidaz (POD) enzim** aktivitesi değerleri (EU.g^{-1} yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

	14.Gün	21.Gün	28. Gün
Kontrol	31200 ^b	57650 ^c	102050 ^c
Soğuk	23450 ^c	74800 ^b	123800 ^b
Soğuk + $0.1 \mu\text{M}$ SNP	30550 ^b	119860 ^a	96900 ^c
Soğuk + $1 \mu\text{M}$ SNP	38000 ^a	79600 ^b	144550 ^a
Soğuk + $100 \mu\text{M}$ SNP	11050 ^d	42600 ^c	83100 ^d



Şekil 4.13. 25/22 °C 'de büyütülen mısır fidelerine 10. gün sodyum nitroprussid (SNP) uygulanmış ve kesimden 2 gün önce soğuğa (10/7°C) transfer edildikten sonra **14, 21 ve 28. günlerde** kesilen yapraklardan elde edilen **hücrel POD enzim** aktivitesi değerler.

4.7.3. Hücresel CAT enzim aktivitesi

Hücresel CAT aktivitesi 14, 21 ve 28 günlük mısır bitkisi yapraklarında hem soğuk hem de soğuk + SNP uygulamalarından önemli ($P<0.05$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.14).

14 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre hücresel CAT aktivitesinde artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücresel CAT aktivitesi 243 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %35'lik bir azalışla 330 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 0.1, 1 ve 100 μM SNP uygulamaları düşük sıcaklık ile artan hücresel CAT aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile hücresel CAT aktivitesi 330 EU.g^{-1} iken bu değer 0.1, 1 ve 100 μM SNP için %35'lik önemli ($P<0.05$) bir azalışla sırasıyla 240, 247 ve 235 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.14).

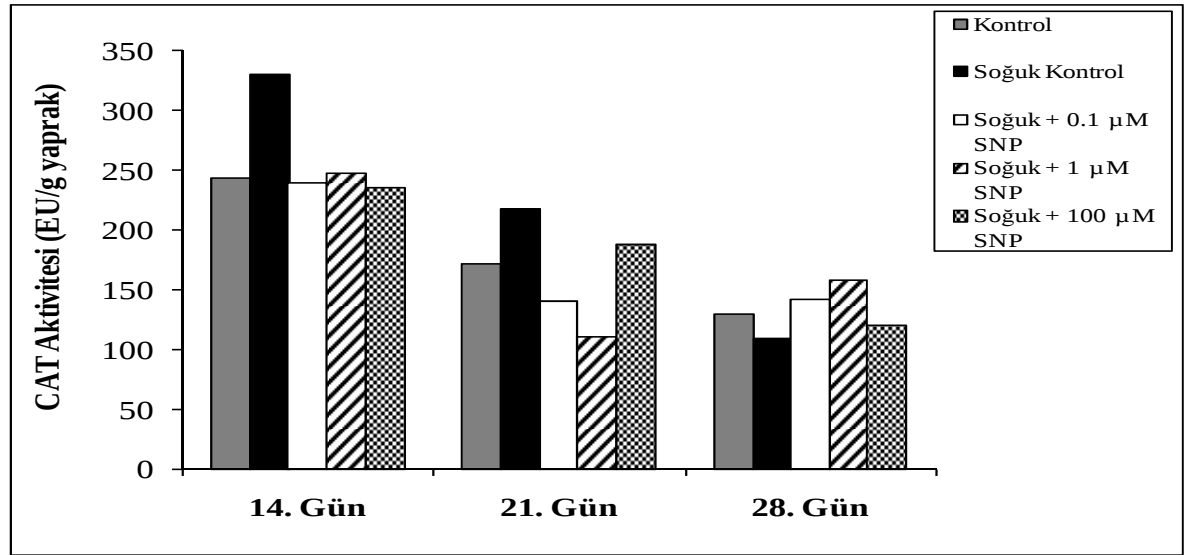
21 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre hücresel CAT aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarında ki hücresel CAT aktivitesi 172 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %26'lık önemli ($P<0.05$) bir artışla 218 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 0.1, 1 ve 100 μM SNP uygulamaları düşük sıcaklık ile artan hücresel CAT aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile hücresel CAT aktivitesi 218 EU.g^{-1} iken bu değer 0.1 μM SNP için %60'lık önemli ($P<0.05$) bir azalışla 140 EU.g^{-1} , 1 μM SNP için %6.4'lük azalışla 110 EU.g^{-1} ve 100 μM SNP uygulaması ise % 13'lük bir azalışla 188 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.14).

28 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre hücresel CAT aktivitesinde önemli bir düşüşe neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücresel CAT aktivitesi 129 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %18'lik önemli ($P<0.05$) bir düşüşle 109 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 0.1, 1 ve 100 μM SNP uygulamaları düşük

sıcaklık ile azalan hücreselel CAT aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile hücreselel CAT aktivitesi 109 EU.g^{-1} iken bu değer $0.1 \mu\text{M}$ SNP için %31'lik önemli ($P<0.05$) bir artışla 142 EU.g^{-1} , $1 \mu\text{M}$ SNP için %44'lük önemli ($P<0.05$) bir artışla 158 EU.g^{-1} ve $100 \mu\text{M}$ SNP uygulaması ise düşük sıcaklığa göre aktivite üzerinde %10'luk artışla 120 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.14).

Çizelge 4.14. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen **hücreselel katalaz (CAT) enzim** aktivitesi değerleri (EU.g^{-1} yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

	14.Gün	21.Gün	28. Gün
Kontrol	243 ^b	172 ^c	129 ^c
Soğuk	330 ^a	218 ^a	109 ^d
Soğuk + $0.1 \mu\text{M}$ SNP	240 ^b	140 ^d	142 ^b
Soğuk + $1 \mu\text{M}$ SNP	247 ^b	110 ^e	158 ^a
Soğuk + $100 \mu\text{M}$ SNP	235 ^b	188 ^b	120 ^c



Şekil 4.14. 25/22 °C 'de büyütülen mısır fidelerine 10. gün sodyum nitroprussid (SNP) uygulanmış ve kesimden 2 gün önce soğuğa ($10/7^{\circ}\text{C}$) transfer edildikten sonra **14, 21 ve 28. günlerde** kesilen yapraklardan elde edilen **hücreselel CAT enzim** aktivitesi değerleri.

4.8. Nitrat redüktaz (NR) enzim sonuçları

NR enzim aktivitesi 14, 21 ve 28 günlük mısır bitkisi yapraklarında hem soğuk hem de soğuk + SNP uygulamalarından önemli ($P<0.05$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.15).

14 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre NR aktivitesinde önemli derecede bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki NR aktivitesi 92.84 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %36'lık bir artışla 126.5 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 0.1, 1 ve $100 \text{ }\mu\text{M}$ SNP uygulamaları düşük sıcaklık ile artan NR aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile NR aktivitesi 126.5 EU.g^{-1} iken bu değer 0.1, 1 ve $100 \text{ }\mu\text{M}$ SNP için sırasıyla %27, %24 ve %13'lük önemli ($P<0.05$) bir azalışlarla yine sırasıyla 91.84 , 95.12 ve 109.43 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.15).

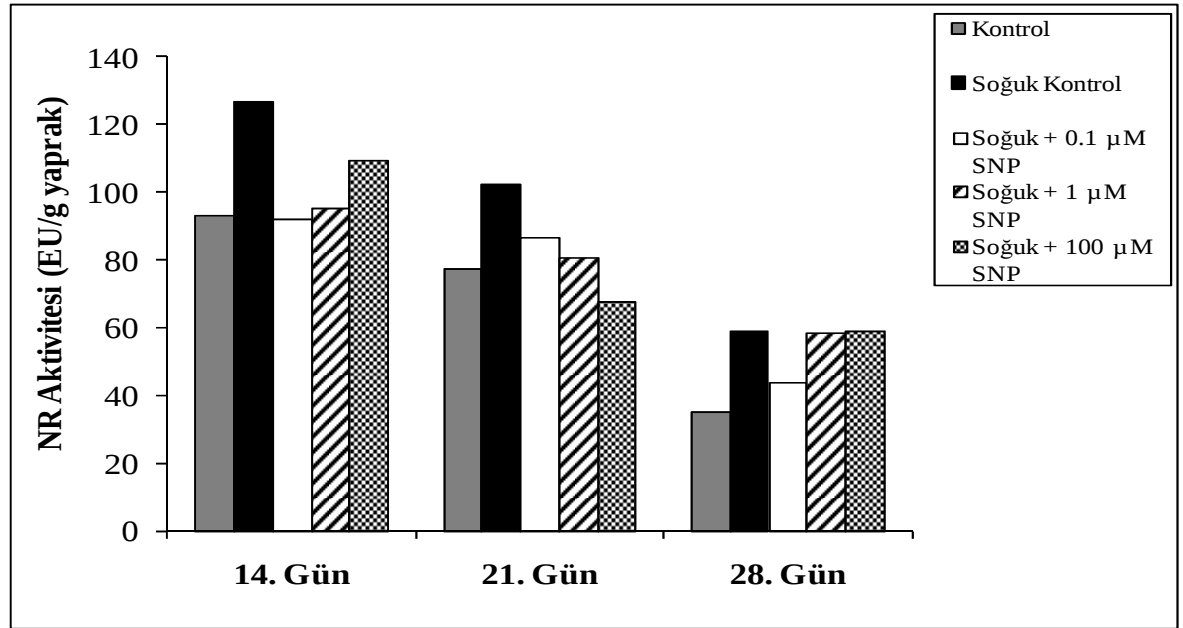
21 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre NR aktivitesinde önemli derecede bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki NR aktivitesi 77.24 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %32'lik bir artışla 102.44 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 0.1, 1 ve $100 \text{ }\mu\text{M}$ SNP uygulamaları düşük sıcaklık ile artan NR aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile NR aktivitesi 102.44 EU.g^{-1} iken bu değer 0.1, 1 ve $100 \text{ }\mu\text{M}$ SNP için sırasıyla %15, %21 ve %33'lük önemli ($P<0.05$) azalışlarla yine sırasıyla 86.34 , 80.81 ve 67.48 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.15).

28 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık kontrole göre NR aktivitesinde önemli derecede bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki NR aktivitesi 34.96 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %68'lik bir artışla 59.02 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. $0.1 \text{ }\mu\text{M}$ SNP uygulaması düşük sıcaklık ile artan NR aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile NR aktivitesi 59.02 EU.g^{-1} iken bu değer $0.1 \text{ }\mu\text{M}$ SNP için

%26'lık önemli ($P<0.05$) bir azalışla 43.58 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 1 ve $100 \text{ } \mu\text{M}$ SNP ise düşük sıcaklığa göre NR aktivitesinde bir değişik yapmadıkları belirlenmiştir (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.15).

Çizelge 4.15. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen **nitrat redüktaz (NR) enzim** aktivitesi değerleri (EU.g^{-1} yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

	14.Gün	21.Gün	28. Gün
Kontrol	92,84 ^d	77,24 ^d	34,96 ^c
Soğuk	126,50 ^a	102,44 ^a	59,02 ^a
Soğuk + 0.1 μM SNP	91,87 ^d	86,34 ^b	43,58 ^b
Soğuk + 1 μM SNP	95,12 ^c	80,81 ^c	58,37 ^a
Soğuk + 100 μM SNP	109,43 ^b	67,48 ^e	58,86 ^a



Şekil 4.15. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen **nitrat redüktaz (NR) enzim** aktivitesi değerleri (EU/g yaprak).

4.9. içsel NO miktarı sonuçları

Bitki yaprağında içsel olarak üretilen NO; 14, 21 ve 28 günlük mısır bitkisi yapraklarında hem soğuk hem de soğuk + SNP uygulamalarından önemli ($P<0.05$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.16).

14 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık uygulaması kontrole göre içsel NO miktarında önemli derecede bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki NO miktarı $1.72 \mu\text{g.g}^{-1}$ iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %10'luk bir artışla $1.89 \mu\text{g.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. 0.1, 1 ve 100 μM SNP uygulamaları düşük sıcaklık ile artan NO miktarını azalttığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile NO miktarı $1.89 \mu\text{g.g}^{-1}$ iken bu değer 0.1, 1 ve 100 μM SNP için sırasıyla %33, %22 ve %17'lik önemli ($P<0.05$) azalışlarla yine sırasıyla 1.25 , 1.37 ve $1.51 \mu\text{g.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.16).

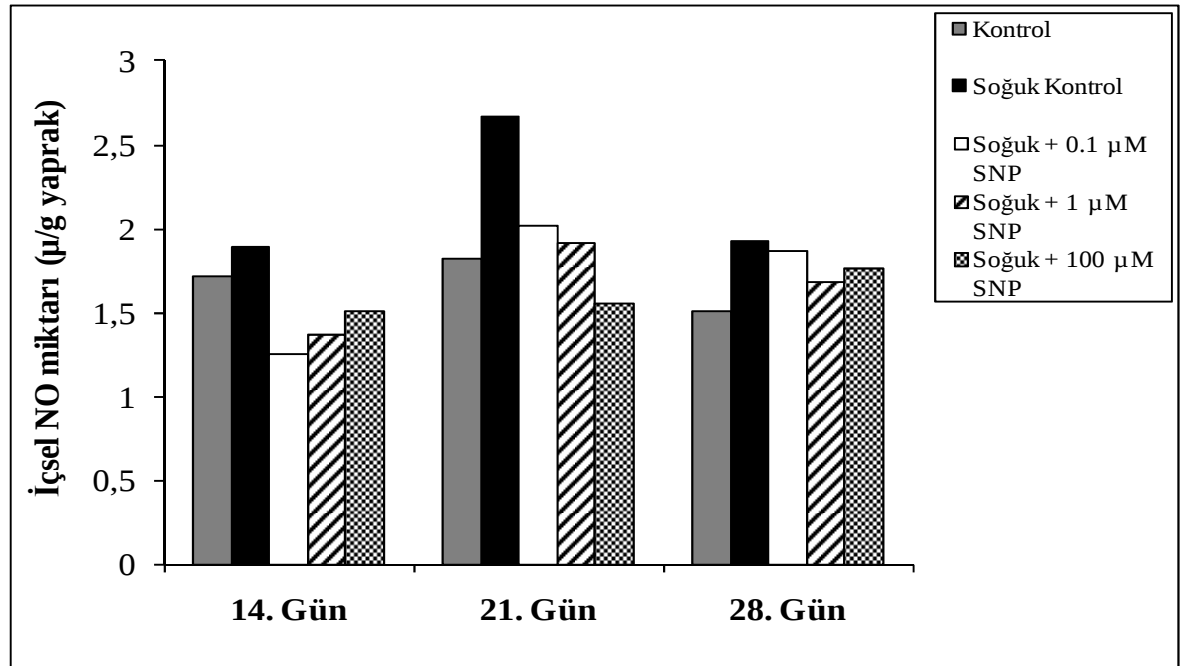
21 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık uygulaması kontrole göre içsel NO miktarında önemli derecede bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki NO miktarı $1.82 \mu\text{g.g}^{-1}$ iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer % 46'luk bir artışla $2.67 \mu\text{g.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. 0.1, 1 ve 100 μM SNP uygulamaları düşük sıcaklık ile artan NO miktarını azalttığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile NO miktarı $2.67 \mu\text{g.g}^{-1}$ iken bu değer 0.1, 1 ve 100 μM SNP için sırasıyla %24, %28 ve %41'lik önemli ($P<0.05$) azalışlarla yine sırasıyla 2.02 , 1.91 ve $1.55 \mu\text{g.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.16).

28 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklık uygulaması kontrole göre içsel NO miktarında önemli derecede bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki NO miktarı $1.51 \mu\text{g.g}^{-1}$ iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %27'lik bir artışla $1.92 \mu\text{g.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. 0.1 μM SNP uygulaması ile düşük sıcaklıkla sonucu NO miktarında bir değişiklik olmamıştır. 1 ve 100 μM SNP uygulamaları düşük sıcaklık ile artan NO miktarını azalttığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile NO miktarı $1.92 \mu\text{g.g}^{-1}$ iken bu değer 1

ve 100 μM SNP için sırasıyla %12 ve %8'lik önemli ($P<0.05$) azalışlarla sırasıyla 1.68 ve 1.76 $\mu\text{g.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.16).

Çizelge 4.16. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen **içsel nitrik oksit (NO)** miktarı değerleri ($\mu\text{g.g}^{-1}$ yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

	14.Gün	21.Gün	28. Gün
Kontrol	1,72 ^b	1,82 ^c	1,51 ^c
Soğuk	1,89 ^a	2,67 ^a	1,92 ^a
Soğuk + 0.1 μM SNP	1,25 ^e	2,02 ^b	1,87 ^a
Soğuk + 1 μM SNP	1,37 ^d	1,91 ^{bc}	1,68 ^b
Soğuk + 100 μM SNP	1,51 ^c	1,55 ^d	1,76 ^{ab}



Şekil 4.16. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen **içsel nitrik oksit (NO)** miktarı değerleri ($\mu\text{g.g}^{-1}$ yaprak).

4.10. ABA hormon sonuçları

Bitkisel hormonlardan olan ABA seviyesi hem düşük sıcaklıktan hem de uygulanan SNP den oldukça etkilenmiştir (Çizelge 4.17 ve Şekil 4.17.).

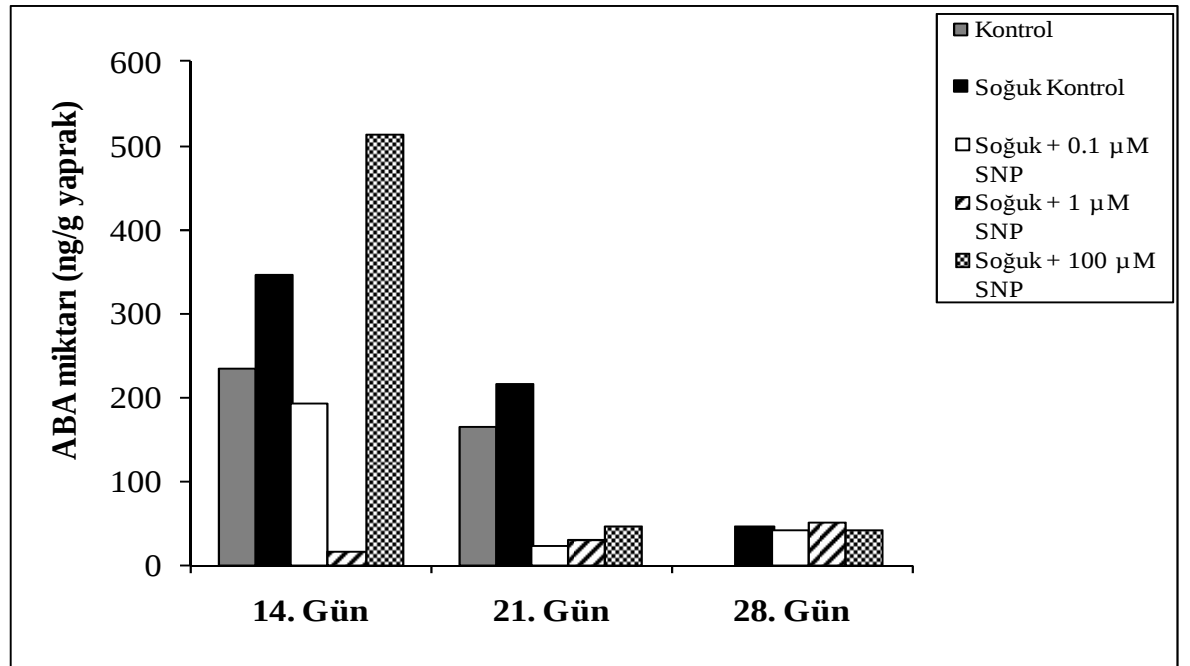
14 günlük bitkilerde düşük sıcaklık ile ABA seviyesi kontrole göre önemli oranda artmıştır. Kontrol de 234.05 ng.g^{-1} olan ABA miktarı düşük sıcaklık ile %47 oranının da artarak 345.65 ng.g^{-1} seviyesine ulaşmıştır. Düşük sıcaklıktan önce uygulanan 0.1 ve $1 \mu\text{M}$ SNP konsantrasyonları ise ABA seviyelerini önemli oranlarda düşürmesine rağmen $100 \mu\text{M}$ SNP uygulaması da önemli seviyede artırmıştır. Tek başına düşük sıcaklık uygulamasıyla 345.65 ng.g^{-1} seviyelerine çıkan ABA miktarı düşük sıcaklık + SNP (0.1, 1 ve $100 \mu\text{M}$) uygulamalarıyla sırasıyla 192.86, 16.29 ve 513.5 ng.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.17 ve Şekil 4.17.).

21 günlük bitkilerde düşük sıcaklık ile ABA seviyesi kontrole göre önemli oranda artmıştır. Kontrol de 165.51 ng.g^{-1} olan ABA miktarı düşük sıcaklık ile %29 oranının da artarak 215.16 ng.g^{-1} seviyesine ulaşmıştır. Düşük sıcaklıktan önce uygulanan SNP konsantrasyonları ise ABA seviyelerini önemli oranlarda düşürmüştür. Tek başına düşük sıcaklık uygulamasıyla 215.16 ng.g^{-1} seviyelerine çıkan ABA miktarı düşük sıcaklık + SNP (0.1, 1 ve $100 \mu\text{M}$) uygulamalarıyla sırasıyla 23.96, 30.87 ve 45.50 ng.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.17 ve Şekil 4.17.).

21 günlük bitkilerde ABA seviyesi kontrolbitkilerinde belirlenemiştir. ABA miktarı düşük sıcaklık ile 45.20 ng.g^{-1} seviyesine ulaşmıştır. Düşük sıcaklıktan önce uygulanan SNP konsantrasyonları ise ABA seviyelerini etkilemiştir. Tek başına düşük sıcaklık uygulamasıyla 45.20 ng.g^{-1} seviyelerine çıkan ABA miktarı düşük sıcaklık + SNP (0.1, 1 ve $100 \mu\text{M}$) uygulamalarıyla sırasıyla 40.57, 50.78 ve 41.14 ng.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.17 ve Şekil 4.17.).

Çizelge 4.17. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen **absisik asit (ABA)** miktarı değerleri (ng/g yaprak). Bir sütun içindeki aynı harfleri bulunduran gruplar arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$).

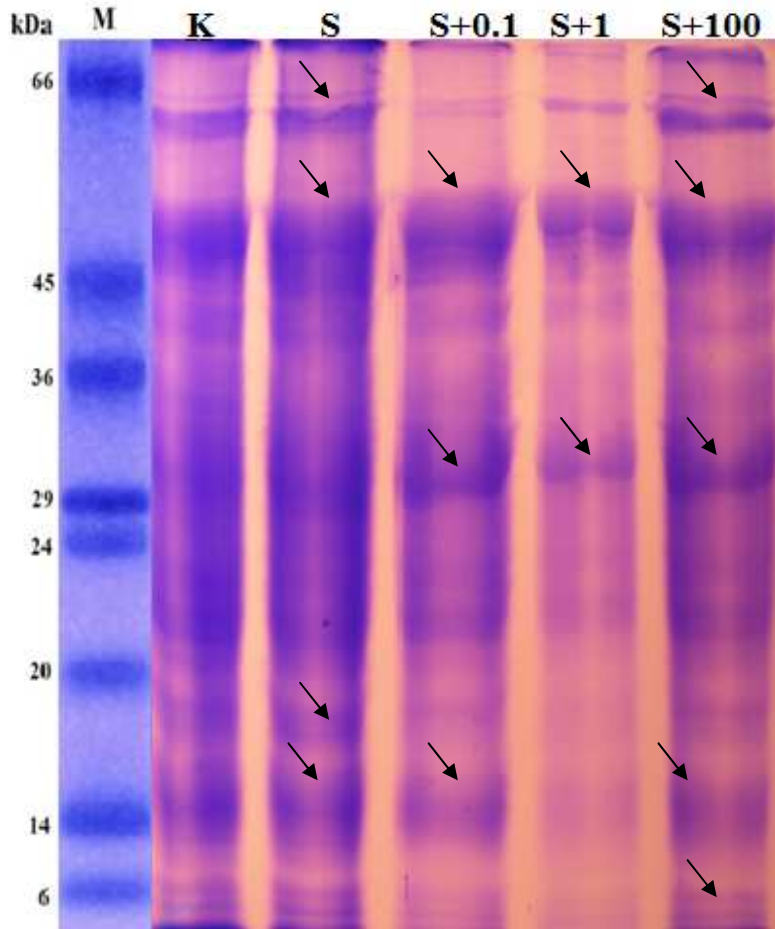
	14.Gün	21.Gün	28. Gün
Kontrol	234.05	165.51	00.0
Soğuk	345.65	215.16	45.20
Soğuk + 0.1 μ M SNP	192.86	23.96	40.57
Soğuk + 1 μ M SNP	16.29	30.87	50.78
Soğuk + 100 μ M SNP	513.5	45.50	41.14



Şekil 4.17. 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen **absisik asit (ABA)** hormonu miktarı değerleri (ng/g yaprak).

4.11. SDS PAGE sonuçları

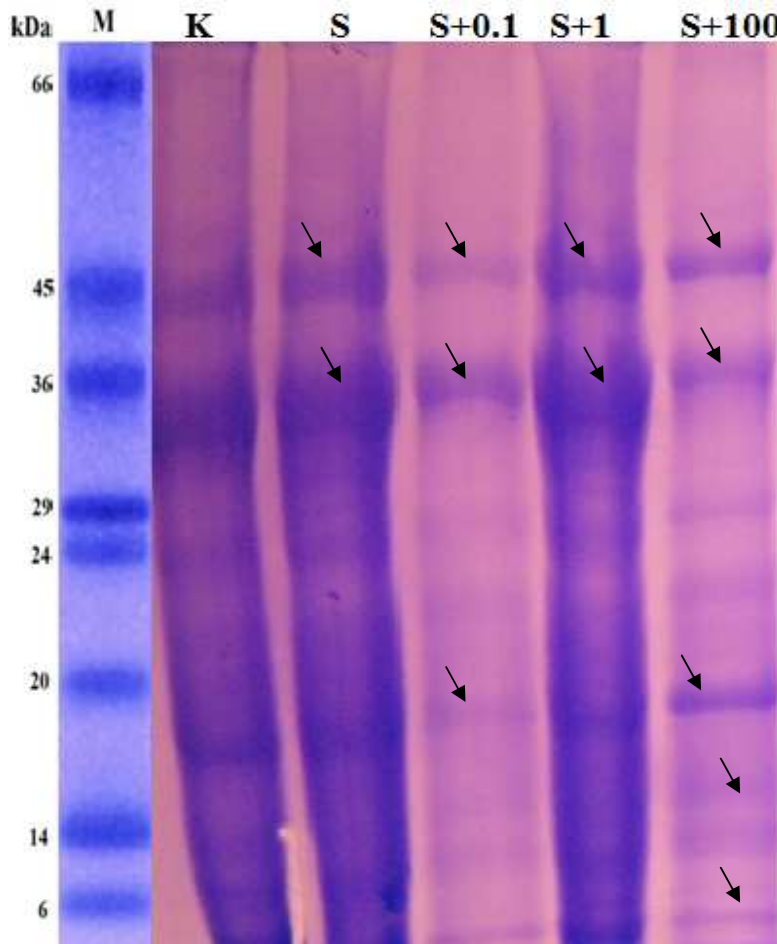
4.11.1. Hücresel protein profillerin SDS-PAGE sonuçları



Şekil 4.18. 14 günlük mısır yapraklarından elde edilen Hücresel proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı.

Şekil 4.18’de mısırın 14 günlük yapraklarının hücresel kısmından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Özellikle 45-66 kDa

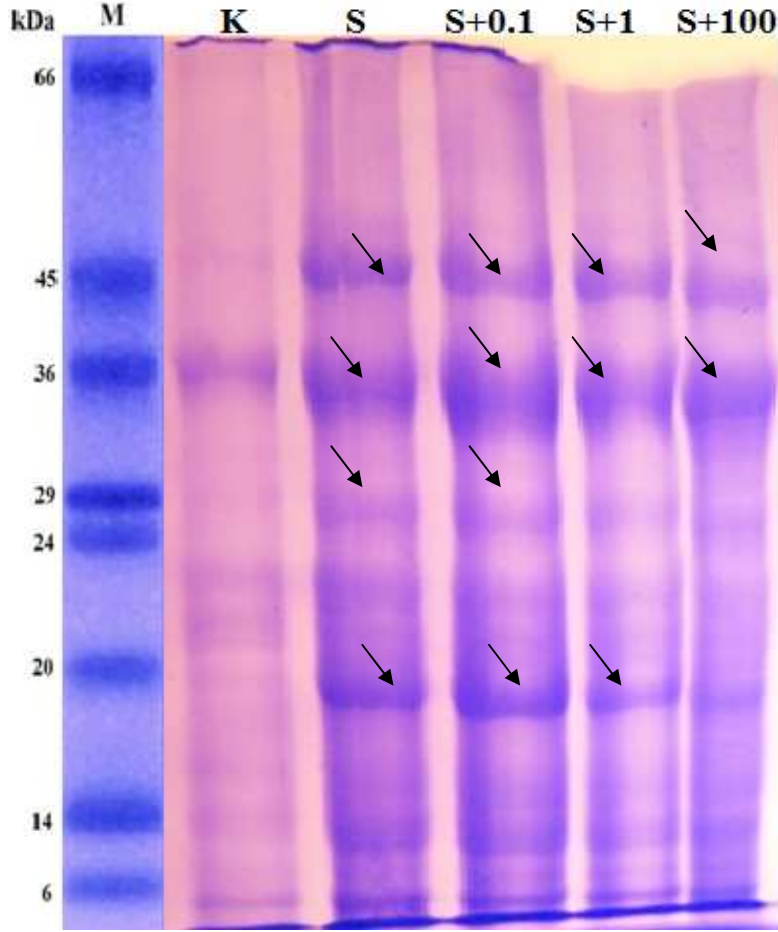
arsındaki polipeptidlerin şiddetinde belirgin bir artış göze çarpmaktadır. Bu bölgedeki polipeptidin hem düşük sıcaklıkta hem de düşük sıcaklık + SNP uygulamalarında belirgin bir şekilde ifadesi artmıştır. Düşük sıcaklık ile hücresel kısımda yeni polipeptitlerin oluştuğunu ve SNP ile de bu polipeptitlerin oluştuğu görülmektedir. 29-36 kDa arasında SNP konsantrasyonlarının yeni bir polipeptid sentezi yaptıkları görülmektedir. Özellikle 100 μ M SNP hem düşük sıcaklık ile oluşan bantların şiddetini artırmış hem de yeni bantların oluşumunu da sağlamıştır.



Şekil 4.19. 21 günlük mısır yapraklarından elde edilen Hücresel proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı.

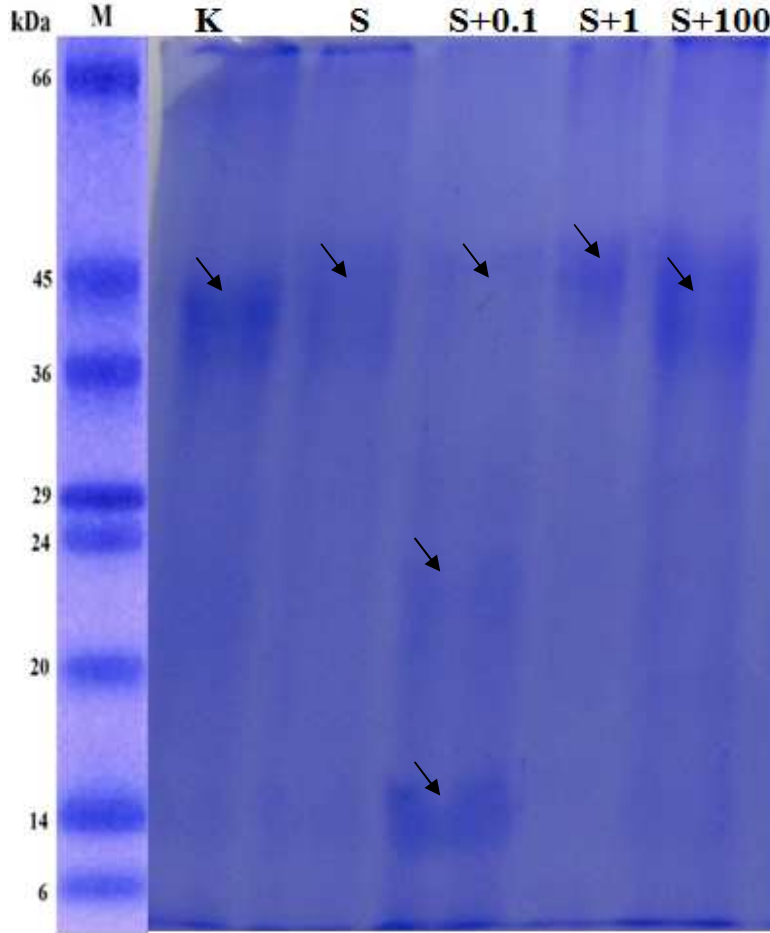
Şekil 4.19’de mısırın 21 günlük yapraklarının hücresel kısmından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. 21 günlükler de ise özellikle yaklaşık 36-45 kDa arasındaki polipeptidlerin şiddetinde belirgin bir artış göze çarpmaktadır. Bu bölgedeki polipeptidin hem düşük sıcaklıkta hem de düşük sıcaklık + SNP uygulamalarında belirgin bir şekilde ifadesi de artmıştır. Düşük sıcaklık ile hücresel kısımda yeni polipeptitlerin oluştuğunu ve SNP ile de bu polipeptitlerin oluştuğu görülmektedir. 29-36 kDa arasında SNP’nin 1 μ M konsantrasyonunun tek başına düşük sıcaklık ile artan bir polipeptidin ifadesini daha da artırdığı görülmektedir. Özellikle 100 μ M SNP 14 günlüklerde olduğu gibi hem düşük sıcaklık ile oluşan bantların şiddetini artırmış hem de yeni bantların oluşumunu da sağlamıştır.

Şekil 4.20’de mısırın 28 günlük yapraklarının hücresel kısmından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 45 kDa arasında olduğu görülmektedir. 28 günlüklerde de yaklaşık 36-45 kDa arasındaki polipeptidlerin şiddetinde belirgin bir artış göze çarpmaktadır. Bu bölgedeki polipeptidin hem düşük sıcaklıkta hem de düşük sıcaklık + SNP uygulamalarında belirgin bir şekilde ifadesi de artmıştır. Düşük sıcaklık ile hücresel kısımda yeni polipeptitlerin oluştuğunu ve düşük sıcaklık + SNP ile de bu polipeptitlerin oluştuğu görülmektedir. 14-20 kDa arasında düşük sıcaklık etkisiyle şiddeti artan polipeptid bandının SNP konsantrasyonları ile şiddetinin azaldığı görülmektedir. 28 günlük bitkilerde yaklaşık 29 kDa’luk bölgede hem düşük sıcaklık hem de düşük sıcaklık + SNP uygulamalarında yeni bir polipeptid bantın oluştuğu görülmektedir.



Şekil 4.20. 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen Hücresel proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı.

4.11.1. Apoplast protein profillerinin SDS-PAGE sonuçları



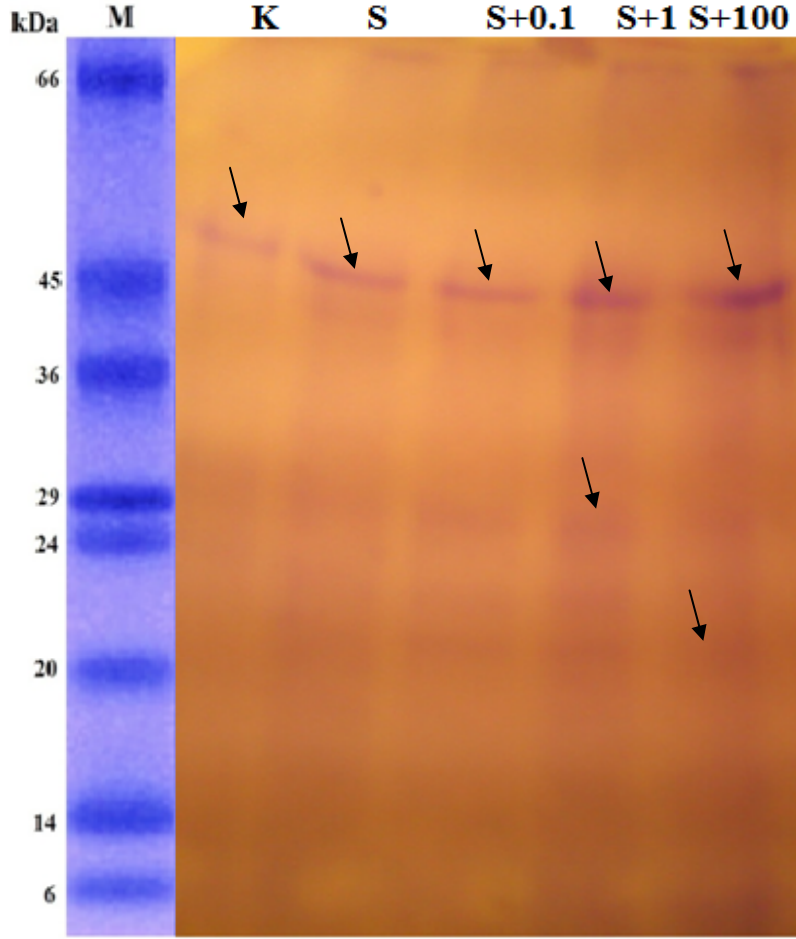
Şekil 4.21. 14 günlük mısır yapraklarından elde edilen apoplast proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi fotoğrafı.

Şekil 4.20' de 14 günlük mısır yapraklarının apoplast bölgelerinden elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 14 ile 45 kDa arasında olduğu görülmektedir. Yaklaşık 45 kDa seviyesinde görülmekte olan polipeptidin şiddetini kontrole göre düşük sıcaklık düşürürken SNP uygulamaları ise artırmıştır. Özellikle düşük sıcaklık + 0.1 μ M SNP uygulaması

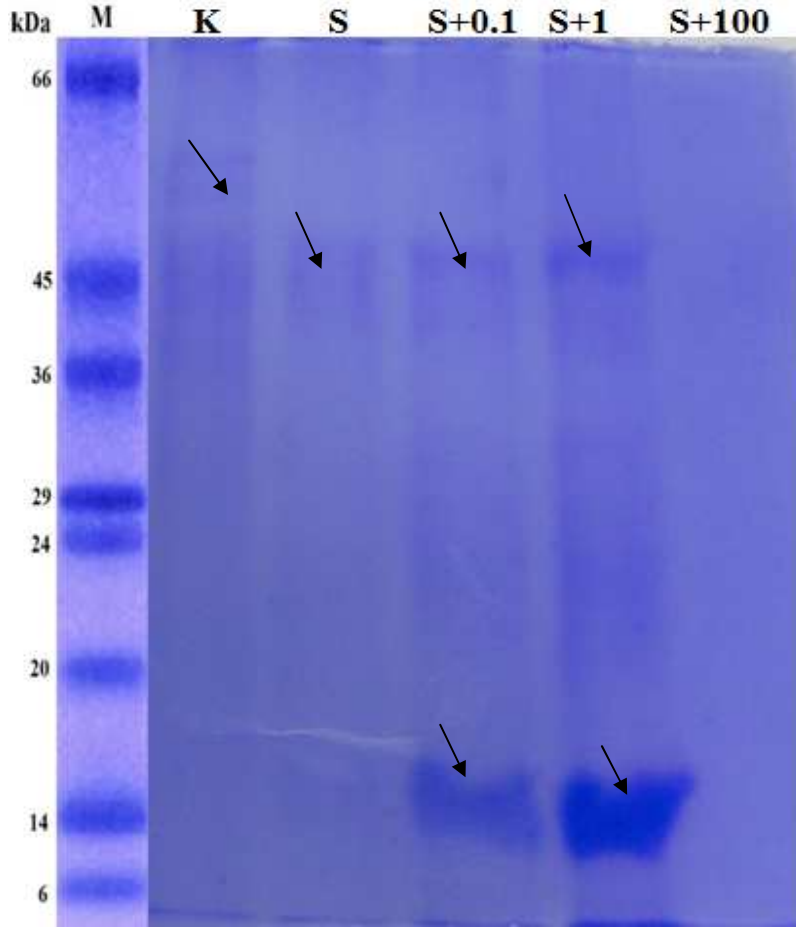
yaklaşık 14 kDa büyüklüğünde belirgin yeni bir polipeptid bantı oluşturmuştur. Düşük sıcaklık + 0.1 μ M SNP uygulaması 20-24 kDa arasında da yeni bir polipeptid bantı meydana getirmiştir.

Şekil 4.21' de 21 günlük mısır yapraklarının apoplast bölgelerinden elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 45 kDa arasında olduğu görülmektedir. Yaklaşık 45 kDa seviyesinde görülmekte olan polipeptidin şiddetini kontrole göre hem tek başına düşük sıcaklık hem de SNP uygulamaları artırmıştır. polipeptidin şiddetindeki en belirgin artış düşük sıcaklık + 1 ve 100 μ M SNP uygulamalarında görülmektedir. 20-29 kDa 'lık bölge arasında yeni polipeptidlerin olduğu görülmektedir.

Şekil 4.22' de 28 günlük mısır yapraklarının apoplast bölgelerinden elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 14 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Yaklaşık 45 kDa seviyesinde görülmekte olan polipeptidin şiddetini kontrole göre düşük sıcaklık düşürürken SNP uygulamaları ise artırmıştır. polipeptid şiddeti en çok 1 μ M SNP uygulamasında meydana gelmiştir. Özellikle düşük sıcaklık + 0.1 ve 1 μ M SNP uygulamaları yaklaşık 14 kDa büyüklüğünde belirgin yeni bir polipeptid bantı oluşturmuştur.



Şekil 4.22. 14 günlük mısır yapraklarından elde edilen apoplast proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi fotoğrafı.



Şekil 4.23. 28 günlük mısır yapraklarından elde edilen apoplast proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi fotoğrafı.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda insanoğlunun kültüre aldığı en eski tarla bitkilerinden biri olan mısır (*Zea mays* L.) kullanılmıştır. Dünyada tahıl bitkileri içerisinde buğday ve arpadan sonra en geniş ekim alanı ve üretime sahip olan mısır, 585 bin ha ekim alanı, 2.5 milyon ton üretim ve 425 kg/da tane verimi ile ülkemizde özellikle Marmara ve Karadeniz Bölgeleri'nde yaygın olarak yetiştirilmekle birlikte bölgemizde de (Doğu Anadolu) tarımı yapılabilen ancak düşük sıcaklığa karşı oldukça hassas bir tahıl bitkisidir (Süzer 2004). Günümüzde zengin besin maddesi içeriği nedeniyle hem insan, hem de hayvan beslenmesi gibi çok sayıda kullanım alanı olan ve önemi giderek artan mısır, yüksek verim alınabilen bir tarla bitkisi olarak diğerlerinden farklılık göstermektedir (Eryılmaz 2007).

Mısırın büyüme ve gelişmesi için en uygun sıcaklık değeri ortalama 25-30°C'dir. Bu sıcaklık değeri bitkinin çimlenme oranı, gövde büyümesi (Miedema *et al.* 1987), yaprak gelişimi (Duncan and Hesketh 1968) ve kuru madde ağırlığı (Muldoon *et al.* 1984) gibi farklı büyüme parametreleri için en ideal değer olduğu gösterilmiştir. Pek çok bitki türü düşük sıcaklık gibi olumsuz çevre şartlarına adapte olma yeteneğine sahiptir (Thomashow 1999). Ancak düşük sıcaklığa karşı hassas bir bitki olan mısır, bu strese adaptasyonda oldukça sınırlı bir kapasiteye sahiptir (Foyer *et al.* 2002). Bu problem çerçevesinde, araştırmamızda bir hedef olarak soğuğa hassas mısır gibi bitkilere soğukla karşılaşmadan önce yapılacak uygulamaların, bitkiyi soğuk zararından kurtarabilme veya en az zararlarla 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 belli değildir. Bitkiye uygulanan ve onu soğuktan koruyabilen bir maddenin etki süresi, birkaç gün gibi kısa bir süre de ancak etkili olabiliyorsa bunun pratikte pek bir anlamı olmayacaktır. Bu nedenle bitkiye verilecek maddenin etki süresinin de belirlenmesi gerekmektedir.

Bitkilerde çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik olaylarda ikincil haberci olarak rol oynayan nitrik oksit (NO) (Neill *et al.* 2003; Crawford and Guo 2005) molekülünün, eksojen uygulamalarının bitkilerde büyüme ve gelişme, çimlenme, de-etiyolasyon, klorosis, senesens gibi fizyolojik olayların yanında bazı stres koşullarında oluşturulan savunma mekanizmalarında da yer aldığı çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur (Beligni and Lamattina 2001; Leshem 2001; Neill *et al.* 2002b). Birçok çalışmada dışarıdan NO veya NO donörleri (SNP gibi) uygulamasının bitkiyi birçok çevresel strese karşı koruyabildiği ile ilgili bilgiye rastlanılmaktadır. Bunlar kaynak özetlerinde ayrıntılı olarak verilmiştir. Bununla birlikte özellikle düşük sıcaklık koşullarında NO'nun etkilerini ortaya koyan araştırmalarda mevcuttur (Zhao *et al.* 2009; Liu *et al.* 2010). Ancak bu bilgiler yetersiz ve kısıtlıdır. Bu yüzden çalışmamızın sonuçları literatürdeki bilimsel bir boşluğu doldurmakla kalmamış, aynı zamanda NO'nun pratikte kullanılabilme potansiyelini de tartışmaya açmıştır.

Çalışmamızda NO'nun mısır fidelerini düşük sıcaklık hasarından koruyabilme potansiyelini araştırırken, koruma derecesi ve kriteri olarak literatürde en çok kullanılan parametreler seçilmiştir. Bunlardan strese toleransın derecesini gösterenler olarak, yapraklardaki donma hasarı, apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktiviteleri, lipid peroksidasyon (MDA miktarı) seviyesi ve reaktif oksijen türlerinin (Hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu) miktarlarının ölçülmesi deneyleri yapılmıştır. Ayrıca hücrelerdeki enzimatik antioksidan kapasitedeki değişimi takip etmek için de apoplastik ve hücrel antioksidan enzimlerin (SOD, POD ve CAT) aktiviteleri, apoplastik polipeptidlerin profillerini belirlemek için de SDS-PAGE elektroforez işlemleri yapılmıştır. Bunlarla birlikte hücrelerde nitrat indirgemesinin yanında NO'nun enzimatik bir kaynağı olan nitrat redüktaz enzim (NR) aktivitesini ve içsel olarak üretilen NO miktarını belirleme deneyleri de yapılmıştır. Ayrıca bitki hormonlarından ABA miktarında HPLC cihazında bakılarak belirlenmiştir. Yapılan bu deneylerin tümünün sonuçlarının yorumlanması ve diğer araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırılmalı değerlendirmeleri aşağıda sunulmuştur.

5.1. Düşük sıcaklık ve NO'nun donma hasarı üzerine etkileri

Çalışmamızda mısır bitkisine yapılan düşük sıcaklık uygulaması, uygulamanın yapıldığı tüm günlerde mısır yapraklarındaki elektrolit sızıntısını artırmış ve kontrole göre yaprakta daha fazla donma hasarının (DH) meydana gelmesine sebep olmuştur (Şekil 4.1-3). Kontrol bitkisinde donma hasarının aniden arttığı sıcaklık değeri, her üç günde de -11°C iken, strese maruz kalan bitkilerde bu değer 14, 21 ve 28 günlük bitkilerde sırasıyla -9 , -9 ve -8°C olarak belirlenmiştir. Görüldüğü gibi düşük sıcaklık uygulaması, hem DH'nın artışına hem de hasarın daha erken sıcaklıklarda başlamasına neden olmuştur (Çizelge 4.1., 4.2. ve 4.3). Düşük sıcaklık sonucu oluşan üşüme zararlarının etkisiyle dokularda elektrolit sızıntısı artmakta ve bu durum üşüme sonrası hücre membranlarında meydana gelen hasarlardan kaynaklanmaktadır (Wang 1994). Bitkiler düşük sıcaklığa maruz kaldıklarında zarların akışkanlığı azalmakta ve zarlarda kırılmalar olduğundan dolayı membran geçirgenliği artabilmektedir. Akışkanlığın azalması veya geçirgenliğin artmasının bir diğer nedeni de membran lipidlerinin yapısında sıvı halden katı hale doğru bir geçiş başladığı için olabilir. Membran permeabilitesinin artması nedeniyle hücrelerin dış ortamla yaptığı elektrolit alışverişinde artış olmaktadır (Campos *et al.* 2003). Örneğin, düşük sıcaklığa duyarlı *Coffea arabica* bitkisinin soğuk uygulamasından sonra elektrolit geçirgenliğinin arttığı belirlenmiştir (Campos *et al.* 2003). Yine, arpa çeşitlerinin düşük sıcaklığa maruz bırakılmasıyla elektrolit geçirgenliğinin arttığı ve dolayısıyla donma hasarının da arttığı belirlenmiştir (Plazek and Zur 2003; Mutlu 2009). Bu bilgiler ışığında eğer düşük sıcaklığa maruz kalan bir bitki, zar geçirgenliği ve akışkanlığını koruyarak, dış ortam ile elektrolit geçirgenliğini normal seviyelerde tutabilirse, düşük sıcaklığa karşı tolerans sağlayabileceği düşünülebilir.

Bizim çalışmamızda bitkiye normal şartlarda uygulanan SNP (NO donörü) konsantrasyonlarının (0.1, 1 ve 100 μM) tümü 14 ve 21 günlük bitkilerde elektrolit geçirgenliğini azaltarak DH'sını düşürmüşlerdir (Şekil 4.1., 4.2. ve 4.3). En etkili konsantrasyon 100 μM SNP olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda bitkilere SNP uygulaması

yapıldıktan sonra (gerek 2 gün, gerekse 9 gün sonra) bitkiler düşük sıcaklık ile karşılaştıklarında, DH'nın SNP ile azaltılmış olması, bitkilerde stres toleransının artırıldığına önemli bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada düşük sıcaklık uygulanmış yabancı hardal süspansiyon kültürüne eklenen SNP'nin, membran permeabilitesini azalttığı, bunun sonucunda da elektrolit sızıntısının azaldığı belirtilmiştir (Liu *et al.* 2010). Bu çalışma, bizim mısırdan elde ettiğimiz sonucu desteklemektedir. İlave olarak bizim çalışmamızda, SNP'nin uygulamadan 9 gün sonra bile gelecek bir soğuk stresine karşı da etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. NO'nun etki süresiyle ilgili bu sonuç literatür için yeni bir bilgi olarak değerlendirilmiştir.

5.2. Düşük sıcaklık ve NO'nun buz nükleasyon aktivitesi üzerine etkileri

Bitkilerde donmaya bağlı soğuk zararının ana nedeni, apoplasttaki buz oluşumudur. Buz oluşumu, hücresel bütünlüğün bozulmasına ve dehidrasyonuna sebep olur (Mahajan and Tuteja 2005). İlk olarak kışlık çavdarda donma toleransı üzerine apoplastik ekstraksiyonun (apoplastik proteinler) etkisi ve apoplastik ekstraktların hücreler arası buz oluşumunu kontrol ettiği belirlenmiştir (Marentes *et al.* 1993). Buz nükleatörleri veya antifriz proteinleri olarak sınıflandırılan bu proteinler, buz oluşumunu doğrudan etkileyerek apoplastta buz nükleasyon aktivitesinin artmasına (buz oluşumunun gecikmesi) neden olurlar (Griffith *et al.* 1992; Hon *et al.* 1994; DeVries 1983, 1986; Feeney and Burcham 1986; Yang *et al.* 1988; Raymond *et al.* 1989; Atıcı and Nalbantoğlu 2003). Bu nedenle bitkilerde apoplastik bölgedeki buz oluşumunu önleyecek, kontrol edebilecek veya geciktirebilecek bir maddenin bitkiye dışarıdan uygulanması bitkinin soğuğa karşı koyma gücünü artırabilmektedir (Griffith *et al.* 1992; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşkın *et al.* 2006). Örneğin, düşük sıcaklığa adaptasyon sağlayabilen kışlık çavdar, kışlık buğday ve karalahana bitkilerinde buz nükleasyon aktivitelerinin yüksek olduğu rapor edilmiştir (Hon *et al.* 1994; Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b). Mevcut çalışmamızda mısır bitkisinde, kontrol ile karşılaştırıldığında, düşük sıcaklık uygulaması tüm uygulama zamanlarında buz nükleasyon aktivitelerini düşürmüştür. 14, 21 ve 28 günlük kontrol bitkilerinde buz

nükleasyon aktivitesi değerleri sırasıyla -8.5, -9, -7°C olarak ölçülürken, düşük sıcaklık uygulamasından sonra ise sırasıyla -7.4, -8 ve -6.4°C olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.4., 4.5. ve 4.6 ve Şekil 4.4., 4.5. ve 4.6). Bu durumdan soğuğa hassas olan mısır bitkisinde düşük sıcaklığa karşı buz oluşumunu engelleyecek apoplastik proteinlerin etkisiz veya yetersiz kaldıkları sonucu çıkartılabilir. Ancak, mısır yapraklarına 10. gün uygulanan SNP ise aktivitenin artırılması üzerinde genel de olumlu bir etki yapmış ve bu etki konsantrasyona bağlı olarak farklılık göstermiştir. Örneğin, 0.1 μ M SNP, 14 ve 21 günlüklerde buz nükleasyon aktivitesini artırırken, 28 günlüklerde ise etkili olmamıştır. 1 μ M SNP özellikle 14 ve 21 günlüklerde aktiviteyi artırmıştır. 100 μ M SNP özellikle 28 günlüklerde aktiviteyi artırmıştır (Çizelge 4.4., 4.5. ve 4.6 ve Şekil 4.4., 4.5. ve 4.6). Çalışmamızda, soğuk gelmeden önce bitki yapraklarına dışsal uygulanan NO'nun, bitki soğuğa maruz kaldığında, yapraklarda apoplastik proteinlerin sentezinin veya aktivitelerinin düzenlemesine katkı sağlayarak apoplastta buz oluşumunu geciktirebildiği ve bu yüzden de bitkinin soğuk stresinden zarar görme derecesini düşürebildiği şeklinde yorumlanmıştır. Literatürde NO'nun bitkilerde apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi üzerinde etkilerini açıklayan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır, Ancak NO gibi sinyal bir molekül olan salisilik asitin düşük sıcaklığa maruz kalan arpa bitkisinde apoplastik proteinleri etkileyebildiği ve buz nükleasyon aktivitesini düzenleyebildiği rapor edilmiştir (Mutlu 2009).

5.3. Düşük sıcaklık ve NO'nun hidrojen peroksit miktarı üzerine etkileri

Hidrojen peroksit (H_2O_2); bitkilerde özellikle peroksizom, mitokondri ve kloroplastlardaki metabolik etkinlikler sonucunda oluşan bir oksidan üründür. H_2O_2 , bitkilerin abiyotik ve biyotik stres etmenleri ile hormon ve yerçekimi gibi uyarıcılara karşı yanıt olarak sentezlenen bir sinyal molekülü olarak da bilinmektedir (Dat *et al.* 1998; Grene 2002; Apel and Hirt 2004; Gechev *et al.* 2006; Mittler 2006). Normal konsantrasyonlarda toksisitesi diğer oksijen bileşiklerine göre daha az olan H_2O_2 , ortamda Fe ve Cu gibi geçiş metallerinin varlığında süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ile tepkimeye girerek biyolojik sistemlerdeki en

tehlikeli serbest radikal olan hidroksilin ($\text{OH}^\cdot$) oluşumuna neden olmaktadır (Liochev and Fridovich 2007). Bu bileşiklerin hücrelerdeki birikimi, membran lipidlerinin peroksidasyonu ve enzim aktivitelerinin inaktivasyonu gibi pek çok yapısal ve fizyolojik hasara yol açtığı bilinmektedir (Gutteridge 1995; Halliwell and Gutteridge 1998; Chen *et al.* 2000; Hegedus *et al.* 2001; Eryılmaz 2007). Bitki stres derecesinin belirlenmesinde biyolojik bir işaret olarak kullanılan bu bileşiklerin düşük miktarları, bitki savunma sisteminin aktive edilmesine pozitif bir etki göstermekteyken, antioksidan enzim aktivitelerinin yeterince aktive edilemediği veya yetersiz kaldığı durumlarda hücrede yüksek miktarlarda bulunduğu zaman dokularda oksidatif hasarlara, yani strese neden olmaktadır (Liu *et al.* 2010). Bizim çalışmamızda, mısır bitkilerine düşük sıcaklık uygulaması, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, tüm günlerde H_2O_2 miktarını artırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7). Bu durum önceki çalışmamalarla iyi bir uyum göstermektedir. Norveç ladin ağacı -10°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). Mercimek bitkisine soğuk stresi uygulandığında, gövde dokusunda H_2O_2 içeriğinin önemli bir şekilde arttığı gözlenmiştir (Öktem *et al.* 2008). Yabani hardal süspansiyon kültüründe düşük sıcaklığın H_2O_2 miktarını artırdığı belirlenmiştir (Liu *et al.* 2010). Görüldüğü gibi bizim çalışmamıza paralel olarak birçok çalışmada soğuk stresinin bitkide içsel H_2O_2 seviyesini artırdığı belirlenmiştir. Bu artış bitkide birçok fizyolojik ve metabolik işlevlerin bozulmasına yol açan ve dolayısıyla soğuk stresi esnasında bitkiye zarar veren mekanizmalardan birisi olabilir. Çalışmamızda düşük sıcaklık öncesi uygulanan SNP'nin $0.1 \mu\text{M}$ uygulaması, özellikle 14 ve 21 günlüklerde, $100 \mu\text{M}$ uygulaması ise 28 günlüklerde, tek başına düşük sıcaklık uygulamaları ile karşılaştırıldığında, H_2O_2 miktarında önemli derecede bir azalmayı sağlamışlardır (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7). Özellikle $0.1 \mu\text{M}$ SNP aynı zamanda antioksidan enzim aktivitelerinin de en yüksek olduğu konsantrasyon olmuştur. Literatürde soğuk stresine maruz bırakılan bitkilerde NO'nun H_2O_2 üzerine etkisiyle ilgili sadece bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada da, soğuğa dayanıklı bir bitki olan yabani hardal süspansiyon kültürünün düşük ve donma sıcaklıklarına maruz bırakılmasıyla artan H_2O_2 miktarının,

ortama NO uygulamasıyla azaldığı belirtilmiştir (Liu *et al.* 2010). Bununla beraber; tuzluluk (Huaifu *et al.* 2007; Li *et al.* 2008) ve ağır metal (Hsu and Kao 2004; Cui *et al.* 2010) gibi abiyotik streslerde artan H₂O₂ miktarının uygulanan NO tarafından azaltıldığını belirtilen çalışmalar da mevcuttur. Çalışmamızın sonuçları literatürdeki tüm bu çalışmalarla iyi bir uyum göstermektedir. Bizim bulgularımız, düşük sıcaklık uygulaması ile artan H₂O₂ miktarının, bitki soğukla karşılaşmadan önce uygulanan NO ile önemli derecede azaltıldığı ve bu nedenle de oksidatif strese karşı bitki toleransının artırılmasına önemli bir katkı sağladığı anlamına gelmektedir.

5.4. Düşük sıcaklık ve NO'nun süperoksit anyonu miktarı üzerine etkileri

Süperoksit anyonu (O₂⁻), stres şartlarında içsel seviyesi artan ve hücrelerde önemli hasarlara neden olan bir radikaldir. Bu radikalın lipid peroksidasyonu, membran hasarı, hücrel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırılmalarına sebep olduğu belirtilmiştir (Fridovich 1995; Desikan *et al.* 2005; Asada 2006). Mevcut çalışmamız da, kontrolü ile karşılaştırıldığında, düşük sıcaklık, uygulamanın yapıldığı tüm günlerde yapraklarda içsel O₂⁻ miktarını artırmıştır (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8). Daha önce yapılan çalışmalarda da; salatalık ve yabani hardal süspansiyon kültürünün düşük sıcaklığa maruz kalmasıyla O₂⁻ miktarının arttığı rapor edilmiştir (Jing *et al.* 2009; Liu *et al.* 2010). Diğer taraftan, mısır yapraklarına yapılan 0.1, 1 ve 100 µM SNP uygulamaları ise düşük sıcaklığa göre O₂⁻ miktarını düşürmüşlerdir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8). Bu durum ; O₂⁻'nin NO ile reaksiyona girerek daha az zararlı bir reaktif olan peroksinitriti oluşturduğu için olabilir (Delledone *et al.* 2001; Desikan *et al.* 2005). Düşük sıcaklık stresine karşı uygulanan NO'nun O₂⁻ miktarı üzerindeki etkisi ile ilgili literatürde sadece bir çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmada soğuğa dayanıklı bir bitki olan yabani hardalın süspansiyon kültürüne ilave edilen NO donorünün düşük sıcaklık stresi sonucu artmış olan O₂⁻ miktarını azalttığı belirtilmiştir (Liu *et al.* 2010). Çalışmamızın sonuçları yapılmış olan çalışma ile uyum göstermektedir. Stres şartlarında artan O₂⁻ miktarı özellikle membran hasarlarına neden olmaktadır. Uygulanan NO ile azaltılmış O₂⁻ miktarı ya daha az zararlı olan peroksinitrite dönüştürülmüş ya da

aktivitesi artan SOD enzimi ile dismutasyona uğramış olabilir. Azalmış olan $O_2^{\cdot-}$ miktarı membran yapısına zarar veremeyeceğinden hücre bütünlüğünü korunmuş olur. Bunun sonucunda hücre canlılığını koruyabilir ve bitki bir bütün olarak strese karşı tolerans gösterebilir. Çalışmamızın sonuçları NO'nun düşük sıcaklık stresi altındaki mısır bitkisinin yapraklarında $O_2^{\cdot-}$ miktarını azaltarak oksidatif stres zararından korunmaya önemli bir katkı yaptığını göstermektedir.

5.5. Düşük sıcaklık ve NO'nun lipid peroksidasyon seviyesi üzerine etkileri

Lipid peroksidasyonu (LPO) doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımıdır. Hücre zarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerinin oluşmasına neden olmakta ve bunun sonucunda zar geçirgenliği ve özellikleri bozulmaktadır. LPO aktivitesinin, hücresel düzeyde stresin sebep olduğu hasarın hem derecesi hem de yansıması olduğu bilinmektedir (Neto *et al.* 2006; Mutlu 2009; Erdal 2010). 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). LPO hücre için çok tehlikelidir. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Bundan dolayıdır ki LPO ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkuş 1995).

Literatürde düşük sıcaklığın lipid peroksidasyon üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Düşük sıcaklığa maruz bırakılan mısır ve pirinç bitkilerinin yapraklarında MDA miktarının arttığı rapor edilmiştir (Kuk *et al.* 2003). Soğuğa duyarlı bir bitki olan *Coffea arabica*'da düşük sıcaklık etkisiyle LPO seviyesi artmıştır (Campos *et al.* 2003). Soğuk stresine maruz bırakılmış kışkık çavdar (*Secale cereale*), tütün (*Nicotiana tabacum*), *Arabidopsis thaliana* ve patatesten (*Solanum tuberosum*) lipid peroksidasyon ürünü olan MDA içeriğinin arttığı belirlenmiştir (Lynch and Steponkus 1987; Moon *et al.* 1995;

Uemura *et al.* 1995; Lin *et al.* 2006). Arpa (*Hordeum vulgare*) bitkisinin Zafer ve Tarm varyeteleriyle yapılan çalışmada düşük sıcaklık LPO seviyesinde bir etki yapmazken, dondurucu sıcaklıklar ise LPO seviyesinin arttırdığı belirlenmiştir (Afşar 2007). Arpa bitkisinin Tokak ve Akhisar varyeteleriyle yapılan çalışmada ise düşük sıcaklık etkisi ile bitki yaşına bağlı olarak genelde LPO seviyesini artırmıştır (Mutlu 2009). Çalışmamızda kontrol grupları ile karşılaştırıldığında düşük sıcaklık uygulaması tüm günlerde LPO seviyesini artırmıştır (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.9). Düşük sıcaklık uygulaması öncesi uygulanan SNP konsantrasyonları ise hem uygulama zamanı hem de konsantrasyona bağlı olarak LPO seviyelerini farklı şekilde etkilemiştir. Birkaç önemli örnek verecek olursak, 0.1 μM SNP uygulaması tüm günlerde düşük sıcaklığa göre LPO seviyesi düşürmüştür. 1 ve 100 μM SNP uygulamaları düşük sıcaklığa göre 14 günlüklerde LPO seviyesinin etkilemezken, 21 günlüklerde ise LPO seviyesini düşürmüştür (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.9). 28 günlüklerde 1 μM SNP LPO seviyesini düşürürken, 100 μM SNP ise seviyesini artırmıştır. Literatürde NO uygulamalarının abiyotik streslere karşı genelde LPO seviyesini düşürdüğünü gösteren çalışmalar mevcuttur. Soğuk stresi (Liu *et al.* 2010), tuz stresi (Shi *et al.* 2007; Li *et al.* 2008), su stresi (Zhao *et al.* 2008; Jelonek *et al.* 2009), nikel fazlalığı (Kazemi *et al.* 2010), Cd fazlalığı (Singh *et al.* 2008), arsenik fazlalığı (Singh *et al.* 2009), yüksek sıcaklık stresi (Song *et al.* 2006) gibi streslerde artan MDA miktarını, dışsal olarak uygulanan NO'nun azalttığı rapor edilmiştir.. Çalışmamızın özellikle düşük konsantrasyon uygulamalarında 14 ve 21 günlük sonuçları, literatür ile iyi bir uyum göstermiştir. LPO seviyesinin düşmesinin bir nedeni, uygulanan NO ile artan SOD aktivitesinin etkisiyle özellikle $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalinin dismutasyona uğraması olabilir. Çünkü $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikali hücre zarlarındaki doymamış lipidlere saldırarak yıkımına neden olur ve membran bütünlüğüne zarar verir (Asada 2006). LPO seviyesinin NO uygulamalarıyla düşmesinin diğer bir nedeni de NO molekülünün $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikali ile birleşerek daha az zararlı olan peroksinitriti oluşturması ve bu şekilde membranın yapısındaki lipidlerin daha az etkilenmesi olabilir. Çalışmamızda, uygulanan NO'nun hücrelerde oluşan oksidatif hasarların önemli bir göstergesi olan LPO seviyesini düşürmesi, bitki canlılığı için son derece önemlidir. Hücrenin temel elemanlarından olan membranın korunması, hücre bütünlüğünün

korunması anlamına gelebilir. Yani hücrelerinin bütünlüğü sağlanmış olan bir bitki, stres şartlarına adapte olmak için avantaj sağlamış olur. Bu yüzden NO'nun LPO seviyesini düşürmesi, düşük sıcaklığa direnç için kullanılması gerektiği hipotezimizi destekler nitelikte bir bulgudur.

5.6. Düşük sıcaklık ve NO'nun apoplastik antioksidan enzim aktiviteleri üzerine Etkileri

Apoplast, hücre duvarı ile protoplazma arasındaki bölge olarak tanımlanır. Apoplast, gelişme, beslenme, sinyal iletimi ve savunma gibi pek çok olayın meydana geldiği dinamik bir bölgedir. (Kim *et al.* 2000; Mutlu 2005; Taşgın *et al.* 2006). Apoplastik bölgedeki akıcı bileşenler hücre genişlemesi, farklılaşması, onarımı ve patojen saldırılarına cevapta önemli bir rol oynayarak plazmalemmmanın dış yüzeyi ile hücre duvarı arasındaki olayların koordinasyonunu sağlarlar (Vanacker *et al.* 1998b).

Son yıllarda, stres altındaki bitkilerde apoplastik bölge ve bu bölgenin streslere cevaptaki rolü ile ilgili birçok çalışma mevcuttur (Vanacker *et al.* 1998a,b; Hernandez *et al.* 2001; Minibaeva *et al.* 2003; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşgın *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2009). Çalışmamızda elde edilen apoplastik antioksidan enzim aktiviteleri, total enzim aktivitesinin yaklaşık %0.1 ile %2'si arasında olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç başka araştırmacıların bulduğu değerlerle uyum içerisindedir (Vanacker *et al.* 1998a,b; Hernandez *et al.* 2001; Güler 2008). Literatür verilerinde gerek soğuk gerekse diğer stresler üzerine NO uygulaması sonucu apoplastik antioksidan enzim aktivitelerinin değişimi üzerine herhangi bir çalışma yoktur. Bu yüzden çalışmamızın sonuçları literatür için ilk olma özelliğini taşımaktadır.

Araştırmamızın bu bölümünde hem soğuk hem de NO'nun mısırdaki apoplastik enzimlerden SOD, POD ve CAT enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkileri çalışılmak istenmiştir. Ancak

mısır yaprak apoplastlarında çok sayıda tekrarlanmasına rağmen apoplastik CAT aktivitesi belirlenememiştir. Apoplastik CAT aktivitesinin bu bitkide belirlenebilecek seviyeden çok düşük olduğu veya hiç bulunmadığı düşünülmektedir. Literatür bilgilerine göre, bazı bitkilerde de apoplastik CAT aktivitesinin belirlenemediği rapor edilmiştir (Frugoli *et al.* 1996; Garc-a-Limones *et al.* 2009). Çalışmamızın sonuçlarına göre, düşük sıcaklık, apoplastik SOD enziminin aktivitesini 14 ve 21 günlüklerde, kontrole göre, artırırken, 28 günlüklerde ise aktiviteyi düşürmüştür (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.10). Literatürde, soğuk stresine maruz kalmış bitkilerdeki apoplastik SOD enzim aktivitesi ile ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır. Arpanın soğuğa hassasiyetleri farklı olan iki çeşidinde yapılan bir çalışmaya göre; soğuk uygulaması her iki çeşitte de aktiviteyi düşürmüştür (Mutlu 2009). Ancak tuzluluk stresine maruz kalmış buğday da ise, apoplastik SOD aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Mutlu *et al.* 2009). Kuraklık stresinin bir göstergesi olan yaprak kıvrılması, *Ctenanthe Setosa* bitkisinin de %74'e çıktığı zaman apoplastik SOD aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Güler 2008). SOD aktivitesi, artan süperoksit üretiminden dolayı hidroksil radikalının oluşum riskini azaltarak etkili olabilir. Bizim çalışmamızda mısır bitkisi düşük sıcaklık stresi sonucu artan süperoksit anyonunu bertaraf etmek için her ne kadar apoplast bölgedeki SOD aktivitesini genelde artırarak cevap vermişse de, bunun yetersiz olduğu düşünülmektedir. Çünkü artan SOD aktivitesine rağmen, LPO seviyesi ve O_2^- miktarı da artmıştır. Bu durum bitkinin verdiği cevabın yetersiz olduğunun bir göstergesi olabilir. Ancak çalışmamızda, bitki soğuk stresine maruz kalmadan önce uygulanan SNP'nin 0.1 μ M uygulaması, düşük sıcaklığa göre, her üç günde de SOD aktivitesini önemli derecede artırmıştır. 1 μ M SNP; 14 ve 21 günlüklerde aktiviteyi etkilemezken, 28 günlüklerde aktiviteyi artırmıştır. 100 μ M SNP uygulaması ise, tek başına düşük sıcaklık ile karşılaştırıldığında, 14 günlüklerde aktiviteyi düşürmüş, 21 günlüklerde etkilememiş ve 28 günlüklerde ise artırmıştır (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.10) . Yukarıdaki verilere göre, özellikle düşük konsantrasyondaki SNP'nin, soğuk stresine maruz kalan mısırdaki SOD aktivitesini artırabildiği sonucu çıkarılabilir. Görüldüğü gibi mısır bitkisine stres öncesi uygulanan NO, apoplastik SOD enziminin aktivitesini daha da artırmış ve iyi bir kolerasyon göstererek LPO seviyesini ve O_2^- miktarını da düşürmüştür. Bu sonuç, hem literatür için bir zenginlik

hem de NO'nun düşük sıcaklığa karşı cevapta rol oynayabileceğinin başka bir delili olabilir.

Çalışmamızda düşük sıcaklık kontrol ile karşılaştırıldığında apoplastik POD aktivitesini uygulama zamanlarına göre farklı oranlarda etkilemiştir. Kontrole göre düşük sıcaklık uygulamasında 14 ve 28 günlük bitkilerde apoplastik POD aktivitesi azalmışken, 21 günlükler de ise aktivite artmıştır (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.11). Apoplastik POD aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda stres şartlarındaki bitkilerde genelde aktivitenin arttığı rapor edilmiştir. Ladin ağacı yapraklarında aylara göre apoplastik POD aktivitelerine 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 (Tasğın *et al.* 2006). Arpa bitkisinin soğuğa hassasiyetleri farklı olan iki çeşidinde, düşük sıcaklığın etkisiyle dayanıklı çeşitte apoplastik POD aktivitesi artmış, hassas çeşitte ise bitki yaşına bağlı olarak aktivite genelde azalmıştır (Mutlu 2009). Yulaf bitkisi, fungal bir patojen ile enfekte olduğunda apoplastik POD aktivitesinin düştüğü (Vanacker *et al.* 1998a), 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). Tüm bu literatür verilerine göre stres şekli ve bitki çeşidine bağlı olarak apoplastik POD aktivitesi farklılık göstermektedir. Bizim çalışmamızın sonuçları da, 21 günlük bitkiler hariç aktivite genelde düşmüştür. Bu durum soğuğa karşı dayanıksız bir bitki olan mısırın birçok çevresel strese karşı bitkileri korumada savunma mekanizmasının ilk basamağını oluşturan apoplastik POD aktivitesini artıramadığını göstermektedir. Diğer taraftan çalışmamızda, stres öncesi uygulanan SNP ise konsantrasyon ve stres zamanına göre, aktivite üzerindeki etkisi farklılık göstermiştir. Özellikle 0.1 μM SNP, çalışılan tüm günlerde, tek başına düşük sıcaklığa göre, aktiviteyi önemli derecede artırmıştır (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.11). Aynı şekilde 1 μM SNP de tüm günlerde düşük sıcaklığa göre aktiviteyi artırmıştır. 100 μM SNP ise 14 günlüklerde aktiviteyi etkilememiş, 21 günlüklerde düşürmüş ve 28 günlüklerde ise artırmıştır. Elde

edilen sonuç özetlenirse, mısır soğuğa maruz kaldığında apoplastik POD aktivitesinde önemli bir düşüş meydana gelmektedir. Ancak bitkiye soğuğa maruz kalmadan önce uygulanan SNP (özellikle düşük konsantrasyonda), soğukla azalan bu enzimin aktivitesini önemli ölçüde artırabilmektedir. Apoplastik POD aktivitesi üzerine NO'nun etkisi ile ilgili literatür de herhangi bir çalışma belirlenememiştir. Bizim sonuçlarımız değerlendirildiğinde, SNP uygulaması ile aktive olmuş olan apoplastik POD, bitkinin soğuğa dayanma kapasitesini artırmış olduğu sonucu çıkmaktadır. NO'nun düşük sıcaklığa karşı tolerans mekanizmasının ilk basamağı olan, apoplastik POD aktivitesini artırması, düşük sıcaklığa karşı NO'nun etkili olduğunun açık bir göstergesi olabilir.

5.7. Düşük sıcaklık ve NO'nun hücrel antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri

Hücrel antioksidan enzimler olumsuz çevresel faktörler nedeniyle reaktif oksijen türlerinin (ROT) bitki hücrelerinde ortaya çıkışındaki artışa bağlı olarak aktive olabilmekte ve bu durum bitkinin değişen çevre şartlarına uyum sağlamasına yardımcı olmaktadır. Bundan dolayı düşük sıcaklığa karşı mısırın antioksidan enzim aktivitelerini artırması strese karşı tolerans sağlamada önemli bir gösterge olabilir. ROT, normal metabolizma sonucunda hücrelerde meydana gelmekle birlikte, bitki strese maruz kalınca üretimi artmaktadır. Gerek normal şartlarda gerekse stres şartları altında ROT miktarını kontrol etmek ve hücreleri ROT' un olumsuz etkilerinden korumak için bitkiler hem enzimatik hem de enzimatik olmayan bileşenlerden oluşan antioksidan savunma sistemine sahiptirler (Erdal 2010). Başlıca antioksidan enzimlerden olan SOD, CAT ve POD aktivitelerinin birbirlerine göre dengede bulunması; hücrelerdeki O_2^- ve H_2O_2 'in kararlı düzeylerde tutularak zararlı etkilerinin önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Mittler 2002; Halliwell 2006; Eryılmaz 2007). Bu nedenle NO'nun antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırıcı yöndeki etkisi, bitkinin düşük sıcaklık koşullarına karşı direncinin artmasına ve adaptasyonunun kolaylaşmasına yardımcı olması muhtemeldir.

Çalışmamızda düşük sıcaklık, kontrole göre 14 ve 21 günlüklerde hücrel SOD aktivitesini artırırken, 28 günlüklerde ise aktivite üzerinde etkili olmamıştır (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.12). Literatürde soğuk stresinin SOD aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Kışlık çavdarda (Streb *et al.* 1999), pamuk bitkisinde (Kornyeyev *et al.* 2001), kışlık buğday yapraklarında (Beak and Skinner 2003), alp çimi bitkilerinde (Zhou and Zhao 2004), *Picea abies*'de (Kaminska-Rozek and Pukacki 2005), salatalık ve pirinç bitkilerinde (Lee and Lee 2000; Guo *et al.* 2006), kavak ağaçlarında (Zhang *et al.* 2007), düşük sıcaklığa hassas ve dayanıklı iki arpa çeşidinde (Mutlu 2009) ve yabancı hardal süspansiyon kültüründe (Liu *et al.* 2010) soğuk stresi etkisiyle SOD enziminin aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Çalışmamızın sonuçları literatürle iyi bir uyum göstermiştir.

SOD, bitkilerdeki antioksidan sistemin önemli bir enzimatik bileşenidir ve O_2^- radikalini H_2O_2 ' ya parçalayan reaksiyonu katalizler (Raychaudhuri and Deng 2000). SOD aktivitesinin artması, hücrede O_2^- radikalinin oluşumunun arttığının bir göstergesi olmakla birlikte, bir başka oksidant bileşik olan H_2O_2 miktarının da arttığının bir kanıtı olarak kabul edilmektedir. (Liochev and Fridovich 2007). Bu durum SOD enziminin aşırı miktardaki O_2^- radikalini uzaklaştırarak düşük sıcaklık stresi altındaki bitkinin direncini artırmaya çalıştığını göstermektedir. Çalışmamızda düşük sıcaklık uygulamasından önce uygulanan 0.1 μ M SNP hem 14 hem de 21 günlüklerde SOD aktivitesini düşük sıcaklığa göre artırırken, 28 günlüklerde ise etkilememiştir. 1 μ M SNP, düşük sıcaklığa göre 14 günlüklerde etkilemezken, 21 günlüklerde önemli bir oranda artırmış, ancak 28 günlüklerde ise aktiviteyi düşürmüştür. 100 μ M SNP ise düşük sıcaklığa göre 14 günlüklerde aktiviteyi düşürmüş, 21 günlüklerde artırmış ve 28 günlüklerde ise etkilememiştir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.12). Bu sonuçlardan anlaşıldığı gibi NO uygulandıktan sonra 2-9 gün sonra gelen soğuk esnasında SOD aktivitesini düzenleyebilirken, daha sonra gelen soğuk esnasında bu etkisini kaybetmektedir. . Olasılık olarak, NO bir sinyal molekül olduğu için, uygulandıktan belirli bir süre sonra hücrelerde metabolize edilmekte ve etkisini kaybetmektedir. Ancak dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta da en düşük konsantrasyonun aktivite üzerinde en çok etkili olduğudur. Bitkisel hormonlarında düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu göz

önüne alındığında NO'nun bir hormon görevi gördüğü de düşünülebilir. Literatürde eksojen uygulamalarla NO'nun SOD aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Yabani hardal süspansiyon kültürünün soğuk stresine maruz bırakılması sonucu artmış olan SOD aktivitesinin ortama ilave edilen NO ile daha da arttığı belirlenmiştir (Liu *et al.* 2010). Tuzluluk ile ısı stresi altındaki çeltikte (Uchida *et al.* 2002) ve tuzluluk stresin altındaki salatalıkta (Shi *et al.* 2007) NO'nun SOD aktivitesini artırdığı belirtilmiştir. Bu durum SOD enziminin aşırı miktardaki O_2^- radikalini uzaklaştırarak stres altındaki bitkinin direncini artırmaya yönelik bir rol oynadığını göstermektedir. Tüm bu bilgiler ile birlikte mısır yapraklarına uygulanan NO'nun özellikle düşük konsantrasyonunun bitkide düşük sıcaklık ile artan SOD aktivitesini daha da artırması, düşük sıcaklık sonucu oluşan oksidatif hasarı en aza indirmek için olumlu yönde etki yaptığı anlamına gelmektedir. Nitekim bitkinin tek başına artırmış olduğu SOD aktivitesi, O_2^- radikalini yeterince bertaraf edilemediği, ancak NO uygulamasıyla daha da artan SOD aktivitesinin içsel O_2^- miktarını daha etkin şekilde azaltabildiği sonucu çıkmaktadır.

Çalışmamızda, kontrole göre düşük sıcaklık uygulaması, hücrel POD aktivitesini 14 günlüklerde azaltırken, 21 ve 28 günlüklerde ise önemli seviyelerde ($P<0.05$) artırmıştır. Literatürde soğuk stresinin POD enzimi üzerine etkisi bitki türüne, stres derecesi ve süresine bağlı olarak farklılık gösterebildiği belirlenmiştir. Norveç ladin ağacı $-10^{\circ}C$ 'ye 45 gün maruz bırakıldığında, POD aktivitesinde önemli derecede bir düşüş gözlenmiştir (Kaminska-Rozek and Pukacki 2005). Buna karşılık, buğday, arpa, çavdar ve yulaf bitkileri soğukta büyütüldüklerinde, POD aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Janda *et al.* 2003). Soğuk şartlarda yetiştirilen salatalık ve çeltik fidelerinde POD aktivitesindeki artışın, donma toleransı ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (Saruyama *et al.* 1995; Kang *et al.* 2002). Bunlara ilave olarak, soya fasulyesi (*Glycine max*) (Yadeghari *et al.* 2008), mercimek (Öktem *et al.* 2008) ve yabani hardal (Liu *et al.* 2010) ile yapılan çalışmalarda bitkilerin düşük sıcaklığa maruz bırakılmasıyla POD aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Çalışmamızda 21 ve 28 günlük mısır bitkilerinde POD aktivitesinin soğuk ile artması literatür ile tam anlamıyla uyumludur. Ancak çok genç (14 günlük) fidelerde ise, soğukun

POD aktivitesini önemli derecede azaltması, bitkinin fizyolojik yaşı ve o dönemde soğuğa verdiği cevabın farklılığıyla açıklanabilir. Literatürde, bizim çalışmamıza benzer bir araştırma deseninde soğğun etkisine bakılmadığından dolayı, bu sonucu önceki araştırma sonuçlarıyla tam olarak karşılaştırmalı kıyaslamak mümkün olmamıştır. Ancak bu durum, bitkinin yaşam döngüsünün farklı zamanlarında strese verdiği cevabın derecesi ve belki de biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmaların farklı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Soğuğa maruz kalmadan önce SNP uygulanmış ve daha sonra farklı günlerde soğuğa maruz kalmış bitkilerden elde edilen POD aktivitesi sonuçları, tek başına soğuğa maruz bitkilerdeki ile kıyaslanırsa, SNP'nin 0.1 μM uygulaması 14 ve 21 günlüklerde aktiviteyi artırırken, 28 günlüklerde ise düşürmüştür. 1 μM SNP uygulaması tüm günlerde POD aktivitesini artırmıştır. 100 μM SNP uygulaması ise tüm günlerde POD aktivitesini düşürmüştür (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.13). POD aktivitesi üzerine düşük sıcaklık ve NO'nun birlikte etkisi ile ilgili literatürde sadece bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada da yabani hardal süspansiyon kültüründe soğuk ile artan POD aktivitesi, NO ilavesi ile daha da artmıştır (Liu *et al.* 2010). Bununla beraber NO'nun tuzlulukta (Shi *et al.* 2007), ağır metal ve yüksek sıcaklık stresinde (Uchida *et al.* 2002; Koypra and Gwozdz 2003; Yu *et al.* 2005; Wang *et al.* 2010), ve UV-B (Zhang *et al.* 2009) streslerine maruz bırakılmış bitkilerde POD aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. Çeşitli çevresel stres koşullarında aktivitesi artan ve bitki hücrelerinde etkili bir savunma sistemi şeklinde görev yapan POD, genellikle stres enzimi olarak da kabul edilmektedir (Fang and Kao 2000). Bitki hücrelerinin farklı kısımlarında bulunan POD enzimi H_2O_2 'in temizlenmesinde iş görmektedir (Bakardjieva and Christov 1996). Düşük sıcaklık öncesi uygulanan NO'nun 0.1 ve 1 μM konsantrasyonları POD aktivitesini artırırken aynı konsantrasyonların H_2O_2 miktarını azaltması strese NO'nun rolünün önemini göstermektedir. 100 μM SNP'nin POD aktivitesini düşürmesi yüksek konsantrasyonlu NO'nun POD aktivitesini inhibe etmesi veya bitkide içsel olarak üretilen NO'nun yeterli olması ile açıklanabilir. Sonuç olarak mısıır bitkisinin soğuk stresinden 2 gün önce NO uygulaması sayesinde, soğuk stresine maruz kaldıktan sonra POD aktivitesini düzenleyerek, strese karşı antioksidatif cevabın

düzenlenmesine katkı sağladığı ve bu yolla da bitkinin stresten korunmasında önemli bir rol oynayabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda, aktivitesi araştırılan diğer bir antioksidan enzim de katalaz (CAT)' dır. CAT'ın bitki dokularında H_2O_2 'in zararsız hale dönüştürülmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Ogawa *et al.* 1997). Bu enzim, oldukça yüksek katalitik özelliğe sahip olup, substratına afinitesi zayıftır. Bitkilerde CAT enziminin, H_2O_2 'in yıkımının yanı sıra stres savunma sisteminin önemli bir bileşeni olduğu belirtilmiştir (Willekens *et al.* 1997). Ayrıca katalazın özellikle mitokondriyal bileşenleri, oksidatif zararlardan korurken, hücrenin diğer kısımlarındaki H_2O_2 'in yıkımında yetersiz kaldığı belirtilmiştir (Scandalios 1994). CAT aktivitesindeki azalışın, ayrıca protein sentezinin inhibe olmasından kaynaklandığı da belirlenmiştir.

Çalışmamızda kontrole kıyasla tek başına düşük sıcaklık uygulaması, 14 ve 21 günlük bitkilerde aktiviteyi artırırken, 28 günlüklerde ise aktiviteyi etkilememiştir (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.14). Literatürde, soğuk stresıyla CAT aktivitesinin hem arttığı, hem de düştüğü ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Buğday, arpa, çavdar ve yulaf bitkileri soğuk şartlarda büyütüldüğünde, CAT aktivitesinin önemli derecede düştüğü belirlenmiştir (Janda *et al.* 2002, 2003). Buğdayla yapılan bir başka çalışmada, soğuk muamelesiyle CAT aktivitesinde önemli bir artış tespit edilmiştir (Keleş and Öncel 2002). Soğuk şartlarda yetiştirilen salatalık ve çeltik filizlerinde CAT aktivitesindeki artışın donma toleransı ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Saruyama *et al.* 1995; Kang *et al.* 2002). Ayrıca soğuk stresinin birçok bitkide, özellikle soğuğa duyarlı genotiplerde, CAT aktivitesinde belirgin bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir (Lukatkin 2002). CAT aktivitesindeki değişimler için, Alp çimi 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 (aklimasyon yapılarak) düşük sıcaklıklara maruz bırakıldığında bitkinin kök ve gövdesinde CAT aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Yadeghari *et al.* 2008). Düşük sıcaklığa toleransları farklı olan iki arpa çeşidinde hem

hassas hem de dayanıklı çeşitte CAT aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Mutlu 2009). Yabani hardal süspansiyon kültürünün düşük sıcaklığa maruz bırakılması sonucu CAT aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Liu *et al.* 2010). Bu çalışmaların sonuçlarına paralel olarak, bizim çalışmamızda da CAT aktivitesinin artması gösterir ki; soğuk esnasında metabolizmada ortaya çıkan aksamalardan dolayı ROT bileşikleri artmakta ve bitki de, artan bu bileşikleri metabolize etmek için CAT aktivitesini artırmakta ve böylece soğuğa direnç kazanma yolunda önemli bir görev yerine getirilmektedir.

Soğuğa maruz kalmadan önce SNP uygulanmış ve daha sonra farklı günlerde soğuğa maruz kalmış bitkilerden elde edilen CAT aktivitesi sonuçları, tek başına soğuğa maruz kalan bitkilerdeki ile karşılaştırıldığında, SNP uygulamalarının her üçü de CAT aktivitesini düşürmüştür (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.14). Tütünde, NO'nun CAT aktivitesini inhibe ederek H_2O_2 'nin sinyal görevini göstermesini sağlamak suretiyle, patojen saldırılarına karşı bitkinin hipersensitiv cevap vermesini sağladığı ileri sürülmüştür (Clark 2000). Buna ilave olarak, pirinç bitkisinin arsenik stresi altında artan CAT aktivitesinin, NO ilave edilmesiyle azaldığı belirlenmiştir (Singh *et al.* 2009). Bu bulgulara karşılık, son yıllarda yapılan bir çalışmada, soğuğa maruz bırakılmış yabani hardal (*Chorispora bungeana*) bitkisine ait süspansiyon kültürü ortamına verilen NO, CAT aktivitesini artırmıştır (Liu *et al.* 2010). İlave olarak, dışarıdan uygulanan NO'nun, tuzluluk (Shi *et al.* 2007; Li *et al.* 2008), ağır metal-ısı (Uchida *et al.* 2002; Koyprı and Gwozdzy 2003; Yu *et al.* 2005; Wang *et al.* 2010) ve kuraklık (Zhao *et al.* 2008) streslerine maruz bırakılmış bitkilerde CAT aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. Her ne kadar soğuk stresi altındaki bitkilerde NO'nun CAT üzerinde etkisiyle ilgili sınırlı sayıda araştırma bulgusu olsa da, bizim sonucumuz mevcut literatür bilgileriyle tam olarak uyuşmamaktadır. Bilindiği gibi CAT, substrat olarak H_2O_2 'yi kullanmaktadır. Çalışmamızın diğer sonuçlarına göre, NO'nun düşük sıcaklık sonrası hücrelerde biriken H_2O_2 'yi etkileyerek konsatrasyonunu azaltmıştır. Bu nedenle, H_2O_2 birikmediği için CAT enziminin aktivitesinin artışına ihtiyaç hasıl olmamış olabilir. Bir başka nedende, NO uygulaması ile aktivitesinin arttığını belirlemiş olduğumuz POD enziminin H_2O_2 miktarını tehlike sınırının altına düşürmüş olması olabilir.

Düşük sıcaklık gibi çevresel stresler sonrası oluşan ROT'ların temizlenmesinde görev alan SOD, POD ve CAT enzimlerinin aktive olması, bitkinin strese karşı tolerans sağlamasında büyük bir öneme sahiptir. Bu antioksidan enzimlerin tek başına aktive olması, her zaman yeterli olmayabilir. Tolerans sağlanması için, hem antioksidan enzimlerin aktive olması, hem de ROT'ların miktarı ve LPO seviyesinin düşmesi beklenir. Düşük sıcaklık, mısır bitkisinin antioksidan enzimlerini her ne kadar aktive etmişse de, bu yeterli olmamıştır. Çünkü düşük sıcaklık aynı zamanda hem ROT miktarı hem de LPO seviyesini de artırmıştır. Çalışmamızda kullandığımız NO'nun düşük konsantrasyonları (0.1 ve 1 μ M), özellikle SOD ve POD aktivitelerini artırırken, aynı zamanda ROT'ların miktarını ve LPO seviyesini ise düşürmüştür. NO'nun bu etkisini, hem apoplast bölgede hem de hücresel kısımda açıkça görmekteyiz. Bu sonuçlara bakarak, NO'nun düşük sıcaklığa karşı bitki tolerans mekanizmasını harekete geçirdiğini söyleyebiliriz.

5.8. Düşük sıcaklık ve NO'nun nitrat redüktaz (NR) enzim aktivitesi üzerine etkileri

Nitrat redüktaz (NR), nitratın amonyuma indirgenmesi reaksiyonunda görev alan ilk enzim olmakla birlikte, çevresel faktörlere oldukça duyarlıdır. Işık yoğunluğu, CO₂ seviyesi, sıcaklık, su mevcudiyeti ve nitrat miktarı gibi çevresel faktörlerden aktivitesi etkilenmektedir (Shaner and Boyer 1976). NR ayrıca NAD(P)H' a bağımlı bir yolla nitrit (NO₂)' ten NO üretimine de aracılık eder (Dean and Harper 1986; Yamasaki *et al.* 1999; Rockel *et al.* 2002; Zhao *et al.* 2009). Pek çok bitki türünde NR aracılığıyla NO üretiminin olduğu kaydedilmiştir. Bunlar; salatalık (De la Haba *et al.* 2001), ayçiçeği, ıspanak, mısır (Rockel *et al.* 2002), *Arabidopsis* (Desikan *et al.* 2002), tütün (Planchet *et al.* 2005) ve *Chlamydomonas reinhardtii* (Sakihama *et al.* 2002) bitkileridir. NO'nun NR aracılığıyla üretildiğinin bir kanıtı da; nitrit birikmesi ve defosforilasyon tarafından oldukça aktive edilmiş NR'nin bulunduğu oksijensiz köklerde aynı zamanda NO salınımı olduğunun da belirtilmesidir (Stoimenova *et al.* 2003; Dordas *et al.* 2004; Lea *et al.* 2004). NR aracılığıyla NO oluşumu hem *in vitro* hem de *in vivo* da gösterilmiştir (Rockel *et al.* 2002; Yamasaki and Sakihama 2000).

Çalışmamızda, düşük sıcaklık uygulamasıyla kontrole göre, tüm günlerde NR aktivitesi artmıştır (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.15). Düşük sıcaklığın, NR aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Domateste (*Solanum lycopersicum*) düşük sıcaklığın NR'nin tanskripsiyonunu artırarak NR aktivitesini yani NR protein miktarını artırdığı belirtilmiştir (Tucker and Ort 2002). Bu durum dokulardaki nitrit ve nitrat miktarına bağlıdır (Rockel *et al.* 2002; Arasimovicz and Wieczorek 2007). Buna ilave olarak, NR etkisiyle üretilen NO'nun, *Arabidopsis*'in soğuğa uyum ve donma toleransında önemli bir role sahip olduğu belirlenmiştir (Zhao *et al.* 2009). Bizim sonuçlarımız, literatürdeki çalışmalara uygun olsa da, bu çalışmalarda NR'nin soğuk stresi esnasında artış sebebi hakkında kesin bir bilgi verilememiştir. Çalışmalarımızda, soğuğa maruz kalmadan önce SNP uygulanmış ve daha sonra farklı günlerde soğuğa maruz kalmış bitkilerden elde edilen NR aktivitesi sonuçları, tek başına soğuğa maruz kalan bitkilerdeki ile karşılaştırıldığında, NR aktivitesi düşmüştür (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.15). Dışsal olarak uygulanan SNP'nin NR aktivitesini düşürmesi literatür açısından bir ilktir. NR düşmesinin bir nedeni dışsal olarak bitkiye verilen NO'nun yeterli olması ve bundan dolayı bitkinin NO üretmek için NR enzimini aktive edilmesine gerek duymamış olması olabilir. Bunun sonucunda, bitki büyümesinde önemli bir mineral olan azotun (NO_3 kaynaklı) indirgenmesi olamayacağından büyümede yavaşlar ve bitkide tamamen strese karşı bir cevap verme olayı meydana gelebilir. Bunun içindir ki SNP uygulaması NR aktivitesini azaltması, olumsuz bir sonuç gibi görünse de aksine bitkide bir bütün olarak strese karşı cevap refleksini geliştireceği için olumlu bir durum olabilir.

5.8. Düşük sıcaklığın içsel üretilen NO üzerine etkileri

NO; bitki ve hayvanlarda bulunan bir serbest radikal olmakla birlikte çevresel ve biyolojik streslerin (Corpas *et al.* 2008; Besson-Bard *et al.* 2007; Neill *et al.* 2008; Chaki *et al.* 2009) yanı sıra senesens, bitki gelişmesi, tohum çimlenmesi (Leshem 1996; Corpas *et al.* 2004,

2006) gibi çeşitli fizyolojik süreçlerdeki etkisinden dolayı pek çok araştırmacının dikkatini çekmiştir.

NO bir azot atomu ve bir oksijen atomunun birleşmesiyle oluşan hem suda hem de yağlarda erime özelliğine sahip, renksiz, gaz yapıda küçük bir moleküldür. Dış yörüngesinde paylaşılmamış elektron içermesi ona hem radikal özelliği kazandırmakta hem de membranlar da kolaylıkla difüze olabilmesine imkan vermektedir (Lancaster 1997; Stöhr and Ullrich 2002; Kerkütlüoğlu 2005). Paylaşılmamış elektron aslında azot atomuna ait ise de, bu elektronun hem azot hem de oksijen atomu üzerinde bulunması nedeniyle tam radikal özelliği taşımaz. Bunun sonucu olarak aktivitesi baskılandığından, bilinen diğer radikallere göre oldukça uzun ömürlüdür. Bitkilerin sadece atmosferik NO'ya karşı cevaplar oluşturmadığı, aynı zamanda içsel olarak da NO ürettikleri de belirlenmiştir (Wildt *et al.* 1997; Barroso *et al.* 1999). NO, bitkilerde yaralanma, enfeksiyon, kuraklık, yüksek sıcaklık, ultraviyole (UV), ozon gibi çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı bitki cevaplarında hem antioksidan hem de antistres ajan olarak görev yapmaktadır (Neill *et al.* 2003). NO; H₂O₂ toplayan enzimlerin aktivitelerini artırarak, O₂⁻ 'nin H₂O₂'ye ve en son O₂'ye dönüşüm reaksiyonunu hızlandırarak ve hücrel redoks dengesi için genel mekanizmayı düzenleyerek oksidatif zarardan bitkileri korur (Lamattina *et al.* 2003; Shi *et al.* 2007; Zheng *et al.* 2009). Tuzluluk, kuraklık, sıcaklık, UV-B ve ağır metal streslerinde bitkide içsel olarak üretilen NO miktarının arttığı belirlenmiştir (Gould *et al.* 2003; Mackerness *et al.* 2001; Uchida *et al.* 2002; Singh *et al.* 2008; Siddiqui *et al.* 2010).

Çalışmamızda düşük sıcaklık kontrole göre her üç günde de içsel NO miktarını artırmıştır (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.16). Bu sonuç literatüre paralellik göstermektedir. Literatürde bezelye ve *Arabidopsis*'te soğuk stresi sonucu içsel olarak NO üretiminin arttığı belirlenmiştir (Corpas *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2009). İçsel olarak üretilen NO'nun NOS (nitrik oksit sentaz) aracılığıyla değil de NR aracılığıyla üretildiği ve *Arabidopsis*'te soğuk stresi ile NOS'un inhibe olduğu NR aktivitesinin de arttığı belirlenmiştir (Zhao *et al.* 2009). Çalışmamız da diğer streslerde olduğu gibi soğuk stresinde de içsel olarak üretilen NO'nun

rolünü görmekteyiz. İçsel olarak üretilen NO antioksidan veya sinyal molekül olarak görev yapabilir (Karplus *et al.* 1991; Lamattina *et al.* 2003; Siddiqui *et al.* 2010). Sinyal molekül olarak özellikle hormonlardan ABA ile etkileşime girerek hem stoma açıklığını azaltır, hem de bitki savunma yollarını aktive edebilir (García-Mata and Lamattina 2001). Antioksidan olarak serbest radikallerden O_2^- ile birleşerek peroksinitri oluşturur (Neill *et al.* 2003). Bu şekilde O_2^- nin serbest radikallerin en zararlı olan OH^- molekülünün oluşumu olan Haber-Weiss reaksiyonları önlenmiş olur. Peroksinitrit bir serbest azot radikali olmakla beraber O_2^- den daha az zararlıdır. İçsel olarak düşük sıcaklık sonucu artan NO miktarı çalışmamızın ana amacı olan bitkiyi soğuktan korumak için dışsal olarak NO uygulama hipotezini güçlendirmiş ve iyi bir dayanak noktası oluşturmuştur. Bitki strese maruz kalmadan uygulanan NO ile sinyal iletim yolu aktive edilir ve bu durumda bitki gelecek olan strese karşı koyma gücünü artırabilir. Nitekim çalışmamızın sonuçlarına göre; dışsal olarak verilen NO'nun antioksidan enzim aktivitelerini artırarak, O_2^- ve H_2O_2 'nin miktarları ile LPO seviyesini düşürerek, % donma hasarını azaltarak ve buz nükleasyon aktivitesini artırarak mısır'ın düşük sıcaklığa karşı antioksidan aktivite ve soğuğa uyum mekanizmalarını düzenlemekte olduğu söylenebilir.

5.9. Düşük sıcaklık ve NO' nun ABA miktarı üzerine etkileri

Stres sinyal iletimiyle ilgili olan en önemli bitki hormonunun ABA olduğu bilinmekte olup, bitkiler stres süresince, ABA hormonunu yüksek miktarda üretmektedir (Xiong *et al.* 2002). Kuraklık, tuz ve soğuk stresi, ABA'nın biyosentezinin artmasına ve birikimine yol açmakta ve biriken ABA, stresin etkisiyle yıkıma uğratılmaktadır (Koornnef *et al.* 1998; Taylor *et al.* 2000). Stressiz koşullarda bitki hücrelerinde ABA en düşük düzeylerde korunur. Bitkinin normal gelişimi için bu düzey yeterlidir (Jiang and Zhang 2004). Stressiz koşullarda bitkiye dışarıdan ABA uygulanması bitki büyümesini inhibe eder. Fakat stres koşullarında artan ABA içeriği, çevresel strese bitkinin yanıtı için yararlı olabilir. Bitki hücrelerinde oksidatif stresle ABA aktivitesinin ilişkisini gösteren üç kanıt bulunmuştur. Bunlardan birincisi; ABA, O_2^- ve H_2O_2 gibi ROT'ların oluşmasına neden olur. İkincisi;

ABA, antioksidan genlerin ifade edilmesine, enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan savunma sisteminin kapasitesinin artmasına neden olur. Üçüncüsü; yüksek konsantrasyon da ABA uygulanması hücrelerde oksidatif zarara neden olabilir. ROT'lar antioksidan savunma sisteminin uyarılmasının yol açan ABA-uyartı iletim yolunda önemli bir rol oynar (Xiong and Zhu 2003; Jiang and Zhang 2004; Güzel 2006).

Çalışmamızda düşük sıcaklık, kontrole göre her üç günde de ABA seviyesini artırmıştır. ABA'nın soğuk stresi etkisiyle pek çok bitkisel dokuda arttığını belirten çalışmalar mevcuttur (Daie and Campbell 1981; Chen *et al.* 1983; Vernieri *et al.* 1991). Soğuk stresiyle artan ABA miktarının, stres zararını iyileştirme ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Wilkinson *et al.* 2001). Çalışmamızın sonuçlarına göre, düşük sıcaklık ile artan ABA miktarı bitkinin stres hasarını azaltmak için göstermiş olduğu bir adaptasyon olabileceği görülmektedir. Uygulanan SNP konsantrasyonlarından 100 μ M SNP de, 14 günlük bitki yapraklarında düşük sıcaklığa göre ABA miktarını önemli oranda artırmıştır. Ancak 0.1 ve 1 μ M SNP uygulamaları ise genelde ABA miktarını düşürmüşlerdir (Çizelge 4.17 ve Şekil 4.17). Kuraklık stresine cevapta, stoma kapanmasında bekçi hücrelerdeki ABA sinyal yoluna NO'nun aracılık ettiği belirlenmiştir. ABA teşvikli stoma kapanması için *arabidopsis*, *Vicia faba* gibi bitkilerde NO sentezlenir ve bu sentezlenen NO'nun kaynağının da NR olduğu belirtilmiştir (Neill *et al.* 2002b; Desikan *et al.* 2002; Garcia-Mata and Lamattina 2001). Ancak başka bir çalışmada da *arabidopsis* süspansiyon kültüründe ABA'nın NO sentezi üzerinde etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Tun *et al.* 2001). Ancak her ne kadar kuraklık stresinde stomaların kapanmasında ABA etkili ise de *Commelina communis* bitkisinin düşük sıcaklığa maruz bırakılmasıyla yapraklarında stoma kapanmasında ABA'nın değil de apoplastik kalsiyumun etkili olduğu belirlenmiştir (Wilkinson *et al.* 2001). Kraus (1978) azot eksikliğinde köklenerek filizlenen patates yumrularının ksileminde ABA miktarının arttığını belirlemiştir. Aynı şekilde başka araştırmacılarda, azot eksikliğinde yetişen bitkilerin gövde ve yapraklarında ABA miktarının arttığını belirtmişlerdir (Radin *et al.* 1982; Clarkson and Touraine 1994).

Tüm bilgiler ışığında; çalışmamıza göre düşük sıcaklık sonucu artan ABA miktarı, literatür ile paralellik göstermektedir. Ancak literatür de dışsal olarak SNP uygulaması sonucu, ABA miktarının nasıl etkilendiği ile ilgili herhangi bir çalışma mevcut değildir. Dışsal olarak uygulanan SNP'lerin genelde ABA miktarını düşürmesinin birkaç nedeni olabilir. Birincisi; ABA ile ilişkili sinyal yolunun SNP ile daha önceden aktifleştirilmiş olması olabilir. Eğer gerçek sebep bu ise, bitki stres ile karşılaştığında ABA sentezi yapılmasına ihtiyaç duymamış olabilir. İkincisi; ABA teşvikli NO üretiminden NR sorumlu olduğu düşünüldüğünde, çalışmamız sonucu SNP uygulamalarıyla azalan NR aktivitesinin de hem içsel NO hemde ABA miktarının da azalmasına neden olmuş olabilir. Üçüncüsü; dışsal olarak uygulanan NO'nun, azotlu bir birleşik olduğu göz önüne alındığında bitkide ABA ve azot miktarı arasındaki antagonistik etkiden dolayı da ABA miktarı azalmış olabilir. Dördüncüsü; genelde stres sonucun da bitkilerde miktarı artan ABA'nın SNP uygulamalarıyla azalması SNP'lerin dolayısıyla da NO'nun bitkiyi strese karşı koruduğunu ve bitkinin de stresi en az zararlarla atlattığının bir göstergesi de olabilir.

5.9. Düşük sıcaklık ve NO' nun SDS-PAGE üzerine etkileri

SDS-PAGE protein analizi düşük sıcaklık ve SNP uygulanan mısır yaprakalarında meydana gelmesi muhtemel protein profil değişikliklerinin belirlenmesi amacı ile yapıldı. Literatür de soğuk stresinin protein profilleri üzerindeki etkisiyle ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar da genel olarak antifiriz özelliğindeki proteinlerin (AFP) varlığı ile ilgili bulgular mevcuttur. Kışlık çavdardaki AFP'ler Griffith ve arkadaşları tarafından ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır (Griffith *et al.* 1992, 1997; Antikainen and Griffith 1997; Yu and Griffith 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 antifiriz aktivite gösteren apoplastik polipeptidlerdir (Hon *et al.* 1994). Kışlık buğday yaprağına ait apoplastik proteinler SDS-PAGE'de yürütüldüğünde, soğuk şartlarda polipeptidlerin band şiddetinin arttığı gözlenmiştir (Atıcı and Nalbantoğlu 1999b; Tasgın *et al.* 2006). Arpa da

düşük sıcaklık sonucu apoplastik proteinlerin SDS-PAGE’de yürütüldüğünde özellikle molekül ağırlığı 14-24 kDa arasında olan bantların şiddetinde belirgin değişimler gözlenmiş ve bu bantların şiddetinde meydana gelen değişimler, bu bantların antifriz proteinlere ait olabileceği belirtilmiştir (Mutlu 2009). Çalışmamız sonuçlarına göre hem apoplast hem hücresel protein profillerinin düşük sıcaklık uygulaması sonrasında SDS-PAGE de yürütüldüğünde 20-45 kDa arasında bantların şiddetinde değişimler olduğu gözlenmiştir. Aynı bantların SNP uygulamalarıyla da hem hücresel hem de apoplast bölgede değişimler gözlenmiştir (Şekil 4.17., 4.18., 4.19., 4.20., 4.21 ve 4.22). Apoplast proteinlerin SDS-PAGE’sinde 0.1 ve 1 μ M SNP uygulandığına 14 ve 28 günlük bitkiler de yaklaşık 14 kDa’lık yeni bir bandın oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 4.21 ve 4.22). Diğer çalışmalarda düşük molekül ağırlıklı polipeptidler antifriz protein olarak tanımlanmış olduğundan hem 20-45 hem de 14 kDa arasında belirlenen bantların AFP’lere ait olduğunu söyleyebiliriz. Özellikle 14 kDa molekül ağırlığındaki protein polipeptit bandının NO tarafından sentezi yapılan bir antifriz protein olması muhtemeldir.

Bu araştırmadan elde edilen önemli sonuçlar ve öneriler:

NO uygulaması mısır bitkisinin de donma hasarını düşürerek bitkinin soğuğa uyumunu artırmıştır.

Düşük sıcaklık uygulamasıyla azalan buz nükleasyon aktivitesinin NO uygulamasıyla artması, NO’nun buz oluşumunu geciktirici mekanizmaları aktive etmesiyle ilgili olabilir.

Zararlı reaktif oksijen türleri olan ve genelde stres şartlarında miktarları artan H_2O_2 ve O_2^- soğuk etkisiyle miktarları artmıştır. NO uygulamasıyla bu reaktif oksijen türlerinin miktarları azalmış ve durum bitkinin düşük sıcaklığa toleransını artırabilir.

Tüm streslerde miktarı artan ve stresin bir ölçütü olarak kullanılan lipid peroksidasyonun (LPO) soğuk uygulamasıyla artması ve NO uygulamalarında ise miktarının düşmesi NO'nun soğuk stresinin yıkıcı etkisini düşürerek bitkinin soğuk şartlara uyumunda etkili olduğu tezini desteklemektedir.

Düşük sıcaklık uygulamasıyla apoplastik SOD aktivitesi artarken POD aktivitesi azalmıştır. NO uygulaması ise apoplastik SOD ve POD aktivitesini artırmıştır. Bu sonuç soğuk şartlarda apoplastik antioksidan enzimlerin aktivitesi farklılık gösterebilirken, NO uygulamasıyla bu enzimlerin her ikisinin de aktivitesinin arttığını ve bu durumun dışsal olarak NO uygulamasıyla başarıldığının belirlenmesi önemlidir.

Düşük sıcaklık uygulamasıyla hücrsel kısımda artan antioksidan enzim aktiviteleri NO tarafından aktiviteleri daha da artırılarak bitkinin oksidatif strese karşı tolerans geliştirmesine katkı sağlamıştır.

Düşük sıcaklıkla aktivitesi artan NR'ın bitkide içsel olarak NO miktarının da artırıldığını ve bu durumun NO ile düşük sıcaklık arasında bir ilişkinin olduğu sonucuna da ulaşılabilir.

NO'nun düşük konsantrasyonlarının özellikle 14 ve 21 günlükler de tüm parametrelerde etkili olması literatür için ilginç bir sonuç olabilir. Bu da soğuk şartlara karşı NO'nun koruyucu etkisinin düşük dozlar da ve uzun süre (11 gün sonrası) de göstermesi bakımından önemlidir. Bu sonuç da pratik anlamda NO'nun kullanılabileceği görüşünü desteklemekte ve tarla şartlarının araştırılmasının gerekliliğini göstermektedir.

Düşük sıcaklık uygulamasıyla içsel olarak miktarı artan NO'nun çalışmamızın hipotezini desteklemektedir.

Labaratuvar şartlarında oldukça etkili olan NO'nun tarla şartlarında nasıl bir etki yaptığının belirlenmesi düşük sıcaklığa hassas pek çok bitki için önemlidir.

NO'nun etki mekanizmasının tam olarak anlaşılabilmesi için daha ileri teknikler de kullanılarak belirlenebilir ve kesin olarak NO'nun etkisi ortaya çıkartılabilir.

KAYNAKLAR

- Afşar, N., 2007. Effect of cold stress on antioxidant mechanism of winter and spring type barley (*Hordeum vulgare* L.) Cultivars. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara.
- Agarwal, S. and Pandey V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 48(4), 555-560.
- Ahmad, P., Sarwat, M., Sharma, S., 2008. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Signaling in Plants *Journal of Plant Biology*, May, 51 (3), 167-173.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkiler, Mimoza Yayınları, Konya.
- Amaya, I., Botella, M.A., Calle, M., Medina, M.I., Heredia, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quesada, M.A., Valpuesta, V., 1999. Improved germination under osmotic stress or tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett*, (457), 80-84.
- 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.
- Anderson, L., and Mansfield, T.A., 1979. The effects of nitric oxide pollution on the growth of tomato. *environmental pollution*, 20, 113-121.
- 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 daimine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon deetilation and wounding in chick-pea. *Planta*, 182, 89-96.
- Antikainen, M. and Griffith M., 1997. Antifreeze proteins accumulation in freezing tolerant cereals. *Physiol. Plant.* 99, 423-432.
- Antikainen, M., 1996. Cold Acclimation in Winter Rye (*Secale cereale* L.): Identification and characterization of protein involved in freezing tolerance. *Painasolama OY*. Turku.
- Apel, K., and Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, (55), 373-399.
- Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J., Kubiś, J., 2009. Interaction between polyamine and nitric oxide signaling in adaptive responses to drought in cucumber. *J Plant Growth Regul*, (28), 177-18.
- Arasimowicz, M. and Floryszak-Wieczorek, J. 2007. Nitric Oxide as a Bioactive Signalling Molecule in Plant Stress Responses, *Plant Science*, 172(5):876-887.
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant*, (85), 235-241.
- Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141:391-396
- 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.
- Aytamka, E., 2005. Soya Fasulyesi (*Glycine max* L.) bitkisinde Tuz Stresi ile Nitrik Oksit Arasındaki İlişki, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı Botanik Programı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- 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 hight temperature. *Can. J. Bot.*, 74, 1665-1670.
- Banci, L., 1997. Structural properties of peroxidase. *J. Biotech.*, (53), 253-263.
- Barroso, J.B., Corpas, F.J., Carreras, A., Sandalio, L.M., Valderrama, R., Palma J.M., Lupianez, J.A. ve del RIO, L.A., 1999, Localization of Nitric Oxide Synthase in Plant Peroxisomes, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 36729-36733.
- Baskin, S.L., Salem, H., 1997. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Washington, D.C. Taylor & Francis. 364 p.
- Battal, P. And Tileklioglu, B., 2001. The Effects of Different Mineral Nutrients on the levels of Cytokinins in Maize (*Zea mays* L.) *Turk.J.Bot.*, 25:123-130.
- 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.
- Beligni, M.V. and Lamattina L., 1997, Putative Role of Nitric Oxide in Plant-Pathogen Interactions, In: Moncada S. Toda N, Higgs EA (eds) *The Biology of Nitric Oxide* part 6 (Proc Fifth Int Meeting on the Biology of Nitric Oxide, Kyoto, Japan). Portland Press, p 250.
- Beligni, M.V. and Lamattina L., 2000, Nitric Oxide Stimulates Seed Germination and De-etiolation and Inhibits Hypocotyl Elongation, Three Light-Inducible Responses in Plants, *Planta*, 210, 215-221.
- Beligni, M.V. and Lamattina, L., 1999a. Nitric Oxide Counteracts Cytotoxic Processes Mediated by Reactive Oxygen Species in Plant Tissues, *Planta*, 208, 337-344.
- Beligni, M.V. and Lamattina, L., 1999b. Is Nitric Oxide Toxic or Protective? *Trends Plant Sci.*, 4, 299-300.
- Beligni, M.V., and Lamattina, L., 2001. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell and Environment.*, (24), 259-264. *Plant, Cell and Environment*, 24, 267-278.
- Bellaire, B.A. , Carmody, J. , Braud, J., Gossett, D.R. , Banks, S.W. , Lucas M.C., and up-regulation of antioxidant enzyme activity during NaCl stress in cotton callus tissue, *Free Radic. Res.* 33, 531–545.

- Bergmeyer, J., and Grabl, M., 1983. Methods of Enzymatic Analysis (Third Edition), pp.190-302, Germany.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., Wendehenne, D., 2007. New insight into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 59, 21–39.
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL. 2004. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell* 16, 332–341.
- 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.
- Bishop, D.L., 2002. Gene expression of vacuolar peroxidase with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 61, 65-71.
- Blokhina, O., E. Virolainen and K.V. Fagerstedt, 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation Stress: A review. *Ann. Bot.*, 91, 179-194.
- Blum, A., 1986. *Plant Breeding for Stress Environments*, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Bolwell, G.P., 1999. Role of reactive oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol.*, 2, 287–294.
- Boveris, A.D., Galatro, A., Puntarulo, S., 2000. Effect of nitric oxide and antioxidants on microsomal content of lipid radicals. *Biol Res*, 33, 159–165.
- Bowler, C., Montagu, M.V. and Inze, D., 1992, Superoxide dismutase and stress tolerance, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43, 83–116.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., 2000, Responses to abiotic stresses, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones (eds), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 158-1249.
- Brennan, T., Frenkel C., 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiology*, 59, 411–416.
- Brocard-Gifford, I.M., Lynch, T.J., Garcia, M.E., Malhotra, B., Finkelstein, R.R., 2004, The *Arabidopsis thaliana* abscisic acid insensitive locus encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth, *Plant Cell* 16, 406-421.
- Brocard-Gifford, I.M., Lynch, T.J., Finkelstein, R.R., 2003, Regulatory networks in seeds integrating developmental, ABA, sugar and light signaling, *Plant Physiol.*, 131, 78-92.
- Bunkelmann, J.R., and Trelease, R.N., 1996, Ascorbate peroxidase: a prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes, *Plant Physiol.*, 110, 589–598.
- 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.
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 79.
- Campbell, K.M., 1999. *Biochemistry* 3rd Ed. New York: Academic press; 502, 618-638.
- Campos, P., Quartin, V., Ramalho, J.C., Nunes, M.A., 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *J. Plant Physiolol.*, 160, 283-292.

- Chaki, M., Ferná'ndez-Oca'na, A., Valderrama, R., Carreras, A., Esteban, F., Luque, F., Go'mez-Rodr'iguez, M., Begara-Morales, J.C., Corpas, F.J., Barroso, J.B., 2009. Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant Cell Physiol*, 50, 265–279.
- 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.
- 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, L.M., Lin, C.C. and Kao, C.H., 2000. Copper toxicity in rice seedlings: changes in antioxidative enzyme activities, H₂O₂ level, and cell wall peroxidase activity in oats. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 41, 99-103.
- 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*, 263, 1883–1886.
- Chen THL, Li PH, Brenner ML., 1983. Involvement of abscisic acid in potato acclimation. *Plant Physiol* 71:362–365
- Chen,F., Wang,F., Sun,H., Cai,Y., Mao,W., Zhang,G., Vincze,E., Wu,F., 2010. Genotype-dependent effect of exogenous nitric oxide on Cd-induced changes in antioxidative metabolism, ultrastructure, and photosynthetic performance in barley seedlings (*Hordeum vulgare*), *J. Plant Growth Regul.* 29, 394–408
- Clark, D., Durner, J., Navarre, D.A. and Klessig, D.F., 2000. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Mol. Plant Micro. Inter.*, 13, 1380–1384.
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R.D., Hancock, J.T. ve Neill, S.J., 2000, NO Way Back: Nitric Oxide and Programmed Cell Death in *Arabidopsis thaliana* Suspension Cultures, *Plant Journal*, (24), 667-677.
- Clarkson D.T. & Touraine B. (1994) Morphological responses of plants to nitrate-deprivation: a role for abscisic acid?. In *A Whole Plant Perspective on Carbon–Nitrogen Interactions* (eds J. Roy & E. Garnier), pp. 187–196. SPB Academic Publishing, The Hague.
- Close, T.J., 1997. Dehydrins: a commonality in response of plants to dehydrations and low temperature. *Physiol. Plant.* (100), 291-296.
- Cooney, R.V., Harwood, P.J., Custer, L.J. and Franke, A.A., 1994. Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ Health Perspect.* 102(5):460-2.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Quiro's, M., Leo'n, A.M., Romero-Puertas, M.C., Esteban, F.J., Valderrama, R., Palma, J.M., Sandalio, L.M., 2004. Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol*, 136, 2722–2733.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Quiro's, M., Leo'n, A.M., Romero-Puertas, M.C., Esteban, F.J., Valderrama, R., Palma, J.M., Sandalio, L.M., 2004. Cellular and

- subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol*, 136, 2722–2733.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Valderrama, R., Palma, J.M., León, A.M., Sandalio, L.M., Del Río, L.A., 2006. Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta*, 224, 246–254.
- Corpas, F.J., Chaki, M., Fernández-Ocaña, A., Valderrama, R., Palma, J.M., Carreras, A., Begara-Morales, J.C., Airaki, M., Del Río, L.A., Barroso, J.B., 2008. Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol*, 49, 1711–1722.
- Corpas, F.J., Palma, J.M., Del Río, L.A., and Barroso, J.B., 2009. Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol.* (184), 9–14.
- Crawford, N.M. and Guo, F.Q., 2005. New Insights into Nitric Oxide Metabolism and Regulatory Functions. *Trends in Plant Science*, 10, 195–200.
- Cui, X.M., Zhang, Y.K., Wu, X.B., Liu, C.S., 2010. The investigation of the alleviated effect of copper toxicity by exogenous nitric oxide in tomato plants. *Plant Soil Environ.* (56), 274–281.
- Cutler, A.J., Krochko, J.E., 1999, Formation and breakdown of ABA, *Trends Plant Sci.*, (4), 472–478.
- 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 incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Celal Bayar Üniversitesi, Manisa.
- Daie J, Campbell WF (1981) Response of tomato plants to stressful temperature: increase in ABA concentration. *Plant Physiol* 67: 26–29
- 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.
- Davies, P.J., 1995. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Dean, J.V. and Harper, J.E., 1986. Nitric Oxide and Nitrous Oxide Production by Soybean and Winged Bean During the in vivo Nitrate Reductase Assay, *Plant Physiology*, 82:718–723.
- 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 la Haba, P., Agüera, E., Benítez, L., Maldonado, J.M., 2001. Modulation of nitrate reductase activity in cucumber (*Cucumis sativus*) roots. *Plant Science*, 161, 231–237.

- 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*. Plant Physiol., 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*. J Plant Physiol., 135, 165-169.
- Dean, J.V. ve Harper, J.E., 1986, Nitric Oxide and Nitrous Oxide Production by Soybean and Winged Bean During the in vivo Nitrate Reductase Assay, Plant Physiology, 82, 718- 723.
- Dehon, L., Macheix, J.J., ve Durand, M., 2002, Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*, J. Exp. Bot., 53, 303–311.
- Delledonne, M., 2005. NO News is Good News for Plants, Currant Opinion in Plant Biology, 8, 1-7.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A. and Lamb, C., 1998. Nitric Oxide Functions as a Signal in Plant Disease Resistance, Nature, 394, 585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C., 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. Proc Natl Acad Sci., 98, 13454-13459.
- Deng, M., Moureaux, T., Leydecker, M.T., and Caboche, M., 1990. Nitrate reductase expression in under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. Planta 180, 257-261.
- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J., Neill, S., 2002. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 99: 16314-16318.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Bright, J., Harrison, J., Weir, I., Hooley, R., Neill, S.J., 2005. A role for ETR1 in hydrogen peroxide signaling in stomatal guard cells. Plant Physiol., 137, 831–83.
- Dhindsa, R., Plumb-Dhindsa, P., ve Thorpe, T., 1981, Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase, J. Exp. Bot., 32, 93–101.
- Doğru, A., 2006. Kolza (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*)’nın Bazı Kışlık Çesitlerinde Düşük Sıcaklık Toleransı ile İlgili Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametrelerin Araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Dordas, C., Hasinoff, B.B., Rivoal, J. and Hill, R.D., 2004. Class-1 hemoglobins, nitrate and NO levels in anoxic maize cell suspension cultures. Planta, 219, 66–72.
- Duman, J.G., Xu L.G., Trusman D. and Wu D.W. 1991. Hemolymph protein involved in insect subzero-temperature tolerance: Ice 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.
- Duncan, W.G., Hesketh J.D., 1968. Net photosynthetic rates, relative leaf growth rates and leaf numbers of 22 races of maize grown at eight temperatures. Crop Science 8, 670-680.

- 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.
- Durmuş, N., 2003. Büyümeyi düzenleyici maddelerin oksidatif stres üzerine etkileri. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Durner, J. ve Klessig, D.F., 1999, Nitric Oxide as a Signal in Plants, *Current Opinion in Plant Biology*, (2), 369-374.
- Durner, J., Wendehenne, D. and Klessig, D.F., 1998. Defense Gene Induction in Tobacco by Nitric Oxide, Cyclic GMP and Cyclic ADP-Ribose, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, (95), 10328-10333
- Elstner, E.F. and Heupel, A. 1976. Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish. *Planta*, 130, 175-180.
- Elstner, E.F., 1982 Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu Rev Plant Physio.*, 33 73-96
- Erdal, S., 2010. Memeli cinsiyet hormonlarının arpa ve nohut bitkilerinin büyüme ve gelişmeleri üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Erdei, S., Hegedüs, A., Hauptmann, G., Szalai, J., ve Horvath, G., 2002, Heavy metal induced physiological changes in the antioxidative response system, *Acta Biol Szeged*, 46 3-4, 89-90.
- Eryılmaz, 2007. Bakır (Cu) uygulanmış mısır (*Zea mays*) fidelerindeki antioksidan aktivitelerin fizyolojik ve anatomik yönden incelenmesi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- Ewart, K.V., Lin Q. and Hew C.L., 1999. Structures function and evolution antifreeze proteins. *CMLS*, (55), 271-283.
- Eyidoğan, F.D., Öktem H.A., Yücel, M., 2003. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. *Acta Physiologia Plantarum*, 25, 263-269.
- Fang, W.C. and Kao, C.H., 2000, Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc, *Plant Sci.*, 158, 71-76.
- Finkelstein, R.R., Gampala Srinivas, S.L., Rock, C.D., 2002, Absciscic Acid Signaling in Seeds and Seedlings, *The Plant Cell*, 14, S15-S45.
- 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.
- Foyer, C.H., Valadier, M.H., Migge, A. and Becker, T.W., 1998. Drought- induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the co-ordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves, *Plant Physiol. (Rockville)*, 117(1): 283-292.
- Foyer, C.H., Vanacker, H.L.D., Gornez, and Harbinson, J., 2002. Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures: review. *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 659-668.
- Foyer, C.H., Souriau, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K.J., Pruvost, C., and Jouanin, L., 1995. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase

- leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol* 109,1047–1057
- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 97-112.
- Frugoli, J. A., H. H. Zhong, M. L. Nuccio, P. McCourt, M. A., McPeck et al., 1996 Catalase is encoded by a multi-gene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* 112: 327–33.
- Garcia-Limones C, Schnabele K, Blanco-Portales R, Luz Bellido M, Caballero JL, Schwab W, Muñoz-Blanco J. 2009. Functional characterization of FaCCD1: a carotenoid cleavage dioxygenase from strawberry involved in lutein degradation during fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9277–9285.
- Garcia-Mata, C. and Lamattina, L., 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology*, 126, 1196–1204.
- Gechev, T., Gadjev, I., Breusegem, F. V., Inze, D., Dukiandjiev, S., Taneve, V., Minkov, I., 2002. Hydrogen peroxide protect tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *CMLS*, 59, 708-714.
- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I. ve Laloi, C., 2006, Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death *BioEssays*, 28, 1091-1101.
- Gilmour, S. J., Hajela, R. K and Thomashow, M. F., 1988, Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 87, 745–750.
- Girotti, A.W., 1985. Mechanisim of lipid peroxidation. *J.free radicals bio.med.*, , 87-95.
- 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.
- Gouia, H. , Ghorbal, M.H., and Touraine, B., 1994. Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and on NO₃ reduction rate within whole plants of salt sensitive bean and salt- tolerant cotton. *Plant Physiol.* 105, 1409–1418.
- Gould, K.S., Lamotte, O., Klinguer, A., Pugin, A., Wendehenne, D., 2003. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ*, 26, 1851–1862.
- 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.
- Gutteridge, J.M., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clin. Chem.*, 41, 1819–1828.

- 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.
- Güzel, A., 2006. Kuraklık stresine maruz bırakılan domates bitkilerinde bazı fizyolojik ve büyüme Parametreleri üzerine absisik asit (ABA) ve Kalsiyum'un (Ca^{2+}) etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin Üniversitesi, Mersin.
- Hale, M.G., Orcutt D.M., 1987. The physiology of plants under stress, John Wiley and Jons, 206p.New York.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1998. Mechanisms of damage to cellular targets by oxidative stress: lipid peroxidation, In: Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Editors, Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford Science Publication.,
- Halliwell, B., 1984. Toxic Effects of Oxygen on Plant Tissues, In: Chloroplast Metabolism, The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells. Oxford Press, Oxford, 180-206.
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiol. (141), 312–322.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., 1999. Free radicals in biology and medicine , Oxford university pres, Oxford. Aust, S.D., Morehouse, L.A., and Thomas, C.E. 1985. Role of metals in oxygen radical reactions. J. Free Radical. Biol. Med. ,(1), 3–25.
- Halliwell, B., Clement M. and Long L., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. FEBS Letters, 486, 10–13.
- Harper, J.E., 1981, Evolution of Nitrogen Oxide(s) during *in vivo* Nitrate Reductase Assay of Soybean Leaves, Plant Physiology,(68), 1488-1493.
- Harrison, R. , 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? Free Radical Biology Medicine, 33, 774–797
- Hoshino T., Odaria M., Yoshida M., Tsuda S., 1999. Physiological and biochemical significance of antifreeze substances in plants. J. Plant Res.. 112, 255-261.
- Haynes, D.W., 1986, Stratiform copper deposits hosted by low-energy sediments: II. Nature of source rocks and composition of metal-transporting water: Economic Geology, v. 81, 266–286
- He, Y.L., Liu, Y.L., Cao, W.X., Huai, M.F., Xu, B.G., Huang, B.G., 2005. Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in Kentucky bluegrass. Crop Sci., 45, 988-995.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 25, 189-198.
- Hegedus, A., Erdei, S. and Horvath, G., 2001. Comparative studies of H_2O_2 detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. Plant Sci., 160, 1085–1093.
- Henry, Y.A., Ducastel, B. and Guissani, A., 1997. Basic Chemistry of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides, Nitric Oxide Research From Chemistry To Biolgy, Landes Co . Biomed. Publ, Austin, USA, 15-46.

- 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.
- Hon, W-C., Griffith M., Mlynarz A., Kwok Y.K., Yang D.S.C., 1994. Antifreeze proteins in winter rye leaves are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.*, 109, 879-889.
- Horemans, N., Foyers, C.H. and Asard, H., 2000, Transport and action of ascorbate at the plasma membrane, *Trends Plant Sci.*, 5, 263-267.
- Hsu, Y.T., Kao, C.H., 2004. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regul.* 42, 227–238.
- http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_countries_by_population#endnote_n14 (15.06.2011).
- http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998/ (15.06.2011).
- Hu, X., Fang, J., Cai, W., Tang, Z., 2003. NO-mediated hypersensitive responses of rice suspension cultures induced by incompatible elicitor. *Chinese Science Bulletin*, 48, 358–363.
- Huaifu, F., Shirong, G., Yansheng, J., Runhuna, Z. and Juan, L. 2007. Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress. *Front. Agric. China*, (1) , 308-314.
- 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.
- Huang, X., Von Rad, U., Durner, J., 2002. Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta*, 215, 914–923
- Huften, C.A., Besford, R.T. and Wellburn, A.R., 1996. Effects of NO (+NO₂) Pollution on Growth, Nitrate Reductase Activities and Associated Protein Contents in Glasshouse Lettuce Grown Hydroponically in Winter CO₂ Enrichment, *New Phytologist*, (133), 495-501.
- Ingram, J., Bartel, D., 1996,. The molecular basis of dehydration, *Plant Biology*, 387–391.
- Jaleel, C.A., Sankar, B., Sridharan, R., Panneerselvam, R., 2008. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turk. J. Biol.*, (32), 79–83.
- 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.
- 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.
- Jiang, M., Zhang, J., 2003. "Cross-talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defence in leaves of maize seedlings", *Plant, Cell and Environment*, 26, 929-939.
- Jiang, M., Zhang, J., 2004. "Abscisic acid and Antioxidant Defense in Plant Cells" *Acta Botanica Sinica*, 46, 1-9.
- Jing, L. J., Shao-hang L., Pei-lei X., Xiu-juan W. and. Ji-Gang B. 2009. Effects of Exogenous Silicon on the Activities of Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Chilling-Stressed Cucumber Leaves. *Agricultural Sciences in China*, 8(9): 1075-1086
- Jones, H.G. and Jones, M.B., 1989, Introduction: some terminology and common mechanisms, *Plants Under Stress*, H.G. Jones, T.J. Flowers, M.B. Jones (eds), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-10.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kappen, L., 1981. Ecological significance of resistance to high temperature, *Physiological*, 12 A, 439-474.
- Karplus, P.A., Daniels, M.J., Herriot, J.R., 1991. Atomic structure of ferredoxin-NADP⁺ reductase, prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Sci.*, 251, 60–66.
- Kaya, Y., 2008. Tohumlu Bitkiler. Erzurum.
- Kazemi, N., Khavari-Nejad, A.R., Fahimi, H., Saadatmand, S., Nejad-Sattari, T., 2010. Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in leaves of *Brassica napus* L. under nickel stress. *Scientia Horticultura*, 126, 402–407.
- Kehrer, J.P., 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43.
- Keles, Y., Öncel I., 2002. Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. *Plant Sci.* 163, 783-790.
- Keles, Y., Ünyayar, S., 2004. Responses of antioxidant defence system of *Helianthus annuus* to abscisic acid treatment under drought and waterlogging. *Acta Physiologia Plantarum*, 26 (2), 149-156.
- Kerkütlüoğlu, E., 2005. Mercimek (*Lens culinaris* medık.) Tohumlarının çimlenmesi ve erken fide büyümesi üzerine nitrik oksit (NO) etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.

- Keskin, B.C., 2006. Buğdayda (*triticum aestivum* L.) Absisik asitle ilişkili gen anlatımı. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- 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.
- Kolbert, Z., Bartha, B., Erdei, L., 2005. Generation of nitric oxide in roots of *Pisum sativum*, *Triticum aestivum* and *Petroselinum crispum* plants under osmotic and drought stress. *Acta Biol Szegediensis*, 49, 13-16.
- Koornneef, M., Leon-Klosterziel, K.M., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A.D., 1998, The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*, *Plant Physiol. Biochem.*, 36, 83-89.
- Kopyra, M., Gwóźdź, E.A., 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Physiol Biochem* 41, 1011-1017.
- 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.
- Kraus A. (1978) Tuberization and abscisic acid content in *Solanum tuberosum* as affected by nitrogen nutrition. *Potato Research*, 21, 183-193.
- 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.
- Kuk Y. I., Shin J. S., Burgos N. R., Hwang T. E., Oksoo H., Cho B. H., Jung S., Guh J. O., 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Science*, vol. 43, pp. 2109-2117.
- Kuo, W.N., Ku, T.W., Jones, D.L. ve JN-Baptiste, J., 1995, Nitric Oxide Synthase Immunoreactivity in Baker's Yeast, Lobster and Wheat Germ, *Biochemical Archives*, 11, 73-78.
- Kuraishi, S., Tasaki, K., Sakurai, N., Sadatoku, K., 1991. Changes in levels of cytokinins in etiolated squash seedlings after illumination. *Plant Cell Physiol.*, 32(5): 585-591.
- Kuru, H.İ., 2007. Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Laloue, H., Weber-Lofti, F., Lucau-Danila, A., ve Guillemat, P., 1997, Identification of ascorbate and guaiacol peroxidase in needle chloroplasts of spruce trees, *Plant Physiol. Biochem.*, 35, 341-346.
- Lamattina, C., Garcia-Mata, M., Graziano & G. Pagnussat. 2003. Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annuals Reviews Plant Biology* (54) 109-136.
- Lancaster, J.R., 1997. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide, *Nitric Oxide, Biology and Chemistry*, 1, 18-30.

- Laspina, N.V., Groppa, M.D., Tomaro, M.L. and Benavides, M.P., 2005. Nitric Oxide Protects Sunflower Leaves Against Cd-Induced Oxidative Stress, *Plant Science*, 168 (7):252-260.
- Lea, U.S., Ten Hoopen, F., Provan, F., Kaiser, W.M., Meyer, C. and Lillo, C., 2004. Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf and root tissue. *Planta*, 219, 59–65.
- 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.
- Leemml, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage. T4. *Nature (London)*, 227, 680-685.
- Leja, M., Mareczek A., Ben J., 2003. Antioxidant properties of two apple cultivars during long-term storage. *Food Chem.* (80), 303-307.
- Leshem, Y.Y., 2001. *Nitric Oxide in Plants*, London, UK: Kluwer Academic Publishers.
- Leshem, Y.Y., and Haramaty, E., 1996. The Characterisation and Contrasting Effects of the Nitric Oxide Free Radical in Vegetative Stress and Senescence of *Pisum sativum* Linn. *Foliage, Journal of Plant Physiology*, (148), 258-263.
- Leshem, Y.Y., Haramaty, E., Iluz, D., Malik, Z., Sofer, Y., and Roitman, L. 1997. Effect of Galactolipid Fluidity and Lipoxygenase Activity, *Plant Physiology and Biochemistry*, (35), 573-579.
- Leshem, Y.Y., Wills, R.B.H. and Veng-Va Ku, V., 1998. Evidence for the Function of the Free Radical Gas, Nitric Oxide (NO[•]), as a Endogenous Maturation and Senescence Regulating Factor in Higher Plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 36:825-833.
- Leshem, Y.Y., 2000. *Nitric oxide in plants. Occurrence, function and use*. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- 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.
- Liochev, S.I. and Fridovich, I., 2007. The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ Formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(10), 1465-1469.
- Li, Q.Y., Niu, H.B., Yin, J., Wang, M.B., Shao, H.B., Deng, D.Z., Chen, X.X., Ren, J.P., Li, Y.C., 2008. Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65, 220-225.
- 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.
- Liochev, S.I. and Fridovich, I., 2007, The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ Formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 42 (10), 1465-1469.
- Liottenberg, S., North, H., Marion-Poll, A., 1999, Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 37, 341–350.

- Liu, Y., Wu, R., Wan, Q., Xie, G., Bi, Y., 2007. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in nitric oxide-involved defense against oxidative stress under salt stress in red kidney bean roots. *Plant Cell Physiol* 48, 511–522.
- Liu, Y., Jiang, H., Zhao, Z., and An, L., 2010. Nitric oxide synthase like activity-dependent nitric oxide production protects against chilling induced oxidative damage in *Chorisporea bungeana* suspension cultured cells. *Plant physiology and Biochemistry*. 48, 936-944.
- 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.
- Mackerness, S.A.H., John, C.F., Jordan, B., Thomas, B., 2001. Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Lett*, 489, 237–242.
- Maestrini P, Cavallini A, Rizzo M, Giordani T, Bernardi R, Durante M, Natali L. 2009. Isolation and expression analysis of low temperature-induced genes in white poplar (*Populus alba*). *J Plant Physiol*. 166, 1544-1556.
- Mahajan, S., Tuteja, Narendra., 2005, Cold, salinity and drought stresses: An overview, *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 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.
- Marschner ,H., 1995. Mineral nutrition of higher plants, 2nd edn. San Diego: Academic Pres.
- McClung ,C.R., 1997. Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radicals in Biology and Medicine* 23, 489-494.
- 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.
- 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.
- Miedema, P., Post J., Groot P. 1987. The effects of low temperature on seedling growth of maize genotypes *Agricultural Research Reports* 926. Wageningen, Pudoc.
- 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.
- Mittler, R., 2006, Abiotic stress, the field environment and stress combination, *Trends Plant Sci.*, 11, 15-19.
- Mittler, R., 2002. Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance, *Trends Plant Sci.*, 7, 405-410.
- Moon, B. Y., Higashi S., Gombos Z., Murata N., 1995, Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against lowtemperature 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.
- Muldoon DK, Wheeler JL, Pearson CJ. 1984. Growth, mineral composition and digestibility of maize, sorghum and barnyard millets at different temperatures. *Australian Journal of Agricultural Research* 35, 367-78.
- 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., 2009. Salisilik asidin arpada(*Hordeum vulgare* L.) soğuk toleransını sağlama ve apoplastik ile simplastik proteinler üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Nakagawa, H., Poulle, M. and Oaks, A., 1984. Characterization of nitrate reductase from corn leaves (*Zea mays* cv W64A x W182E). *Plant Physiol.*, 75, 285.
- Neill, S., Bright, J., Desikan, R., Hancock J, Harrison, J., Wilson, I., 2008. Nitric oxide evolution and perception. *J. Exp. Bot.*, 59, 25–35.
- Neill, S.J., Desikan, R. ve Hancock, J.T., 2003, Nitric Oxide Signalling in Plants, *New Phytologist*, 159, 1469-1481.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., 2002a. Hydrogen peroxide and nitric Oxide as signaling molecules in plants. *J Exp Bot* 53,1237–1242.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J.T., 2002b. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.*, 128,13–16.
- Neill, S-J., Desikan, Burnett, E-C., 1999. “Regulation of gene expression during water deficit stress” *Plant Growth Regulation*, 29,23-33.
- Neto, A.D.A., Prisco, J.T., Enéas-Filho, J., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 56, 87–94.
- Ninneman, H. ve Maier, J., 1996, Indication for the Occurrence of Nitric Oxide Synthase in Fungi and Plants and the Involvement in Photoconidiation of *Neurospora crassa*, *Photochemistry Photobiology*, (64), 393-398.

- Nishida I., Murata N., Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids, 1996, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 47, 541-568.
- Nishiyama, Y., Ikeda, H., Haramaki, N., 1998. Oxidative Stress is Related to Exercise in Tolerance in Patients With Heart Failure. *Am. Heart. J.*, 135, 115.
- Ogawa, K., Soutome, R., Hiroyama, K., Hagio, T., Ida, S., and Nakagawa, H., 2000. Co-regulation of nitrate reductase and nitrite reductase in cultured spinach cells, *JPlant Physiol.*, 157, 299–306.
- Ogawa, K., Kanematsu, S and Asada, K., 1997. Generation of Superoxide Anion and Localization of Cu-Zn Superoxide Dismutase in the Vascular Tissue of Spinach Hypocotyls: Their Association With Lignification. *Plant Cell Physiol.*, 38, 1118-1126.
- Oral, B., 2003. Salisilik asit ve düşük sıcaklıkların ıspanak yapraklarında nitrat redüktaz , katalaz ve peroksidaz aktivitesi ve donma hasarı seviyesi üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Orozco-Cárdenas, M., Narvaéz-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..
- 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. *Journel of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 17(1), 15-21.
- Padu, E., 1999. Apoplastic peroxidases, ascorbat and lignification in relation to nitrate supply in wheat stem. *J. Plant Physiol.*, 154, 576- 583.
- Parida, A.K., Das A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 324–349.
- Pattanayak, D., and Chatterjee, S. R., 1999. Inactivation of Sunflower NADH:Nitrate Reductase by White Light-Activated Rose Bengal. *Molecular Cell Biology Research Communications*.1(3), 41–45.
- 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., 1999. Molecular analysis of acclimation to cold, *Plant Growth Regulation*(29): 47–76.
- Pedroso, M.C., Magalhaes, J.R. ve Durzan, D.J., 2000b. Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells, *Plant Sci.*, (157), 173–180.
- Pedroso, M.C., Magalhaes, J.R. and Durzan, D., 2000a. A Nitric Oxide Burst Precedes Apoptosis in Angiosperm and Gymnosperm Callus Cells and Foliar Tissues, *Journal of Experimental Botany*, 51,1027-1036.
- Pedroso, M.C. and Durzan, D.J., 2000. Effect of Different Gravity Environments on DNA Fragmentation and Cell death in *Kalanchoë* Leaves, *Ann. Bot.*, 86:983–994

- Planchet, E., Gupta, K.J., Sonoda, M., Kaiser, W.M., 2005. Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate-limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *The Plant Journal*, 41, 732–743.
- Plazek, A., Zur, I., 2003. Cold-induced plant resistance to necrotropic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability. *Plant Science*, 164, 1019-1028.
- 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.
- 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.
- Pryor, W.A. ,and Squadrito, G.L., 1995. The Chemistry of Peroxynitrite: a Product from the Reaction of Nitric Oxide with Superoxide?, *American Journal of Physiology*, 268, 699-700.
- 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 physicochemical characterization of boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*). *Arch. Biochem. Biophys.* 410, 238-245.
- Radin J.W., Parker L.L., Guinn G. 1982. Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency. V. Environmental control of abscisic acid accumulation and stomatal sensitivity to abscisic acid. *Plant Physiology* 70, 1066–1070.
- 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.
- Raychaudhuri, S.S., Deng, X.W., 2000. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *Bot Rev.*, 66, 89–98.
- Riberio, E.A., Cunha, F.Q., Tamashiro, W.M.S.C. ve Martins, I.S., 1999, Growth Phase-Dependent Subcellular Localization of Nitric Oxide Synthase in Maize Cells, *FEBS Letters*, (445), 283-286.
- Rock, C.D., 2000, Pathways to abscisic acid-regulated gene expression, *New Phytol.*, 148, 357–396.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J. ve Kaiser, W.M., 2002. Regulation of Nitric Oxide (NO) Production by Plant Nitrate Reductase *in vivo* and *in vitro*, *Journal of Experimental Botany*, (53), 103-110.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P., 2000. *In vitro* rooting of *Psoralea corylifolia* Linn: Peroxidase activity as a marker, *Plant Growth Regul.*, 305, 215–219.
- 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.
- Sakihama, Y., Nakamura, S. and Yamasaki, H., 2002. Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol*, 43(3), 290–297.

- 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.* Wadsworth 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, G.D., 1994, Regulation and properties of plant catalases. In: Foyer, C.H. Mullineaux, P.M., Editors, *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton FL.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.*, 101, 7-12.
- Sen, S., ve Cheema, I.R., 1995, Nitric Oxide Synthase and Calmodulin Immunoreactivity in Plant Embryonic Tissue, *Biochemical Archives*, 11, 221-227.
- 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 Assurance in Agricultural Produce* 593-598.
- Shi, Q., Ding, F., Wang, X., Wei, M., 2007. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiol Biochem*, 45, 542–550.
- Siddiqui M.H., Al-Whaibi M.H., Basalah M.O., 2010. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma*, 248(3):447-55.
- Sigel, H., ve Sigel, A., 1999. *Interrelations Between Free Radicals and Metal Ions in Life Processes*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Singh, H.P., Batish, D.R., Kaur, G., Arora, K., Kohli, R.K., 2008. Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environ. Exp. Bot.* 63: 158-167.
- Singh P. H., Kaur, S., Daizy, R., Batish, V. P., Sharma, N., Ravinder, K., Kohli, 2009. Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). *Nitric Oxide*, 20, 289–297.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., 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.
- Solomonson, L., Barber, M.J., 1990. Assimilatory nitrate reductase: Functional properties and regulation. *Ann. Rev. Plant Phys. And Plant Mol. Biol.*, 41, 225.
- Song, L., Ding, W., Zhao, M., Sun, B., Zhang, L., 2006. Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Sci* 171, 449–458.
- Spiteller, G., 2001. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122, 617-657.
- Stahl, W., Sies, H., 2002. Introduction reactive oxygen species. *Res. Monographs*, 1-2.
- Steponkus, P. L., 1992, Preface, *Advances in Low Temperature Biology*, 1: ix-xi.

- Stoimenova, M., Libourel, I.G.L., Ratcliffe, R.G., Kaiser, W.M., 2003. The role of nitrate reductase in the anoxic metabolism of roots. II. Anoxic metabolism of tobacco roots with or without nitrate reductase activity. *Plant Soil*, 253, 155–167.
- Storey, K.B., Storey J.M., 1988. Freeze tolerance in animals. *Physiol. Rev.* 68, 27-84.
- Stöhr, C., and Ullrich, W.R., 2002. Generation and Possible Roles of NO in Plant Roots and Their Apoplastic Space, *Journal of Experimental Botany*, 53:2293-2303.
- 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.
- Sutka, J. and Galiba, G., 2003, Abiotic Stresses: Cold Stress, *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 1-9.
- Süzer, S., 2004, Mısır Tarımı, Trakya Tarımsal Enstitüsü Yayınları.
- Taiz and Zeiger., 2006, *Plant Physiology.*, Palme yayınevi, Ankara.
- Tao, D.L, Öquist, G., 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.
- Taylor, I.B., Burbidge, A., Thompson, A.J., 2000. Control of abscisic acid synthesis, *J. Exp. Bot.* Vol. 51), 1563–1574.
- Thomashow, M.F. 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* ,50, 571-599.
- Thompson, A.J., Jackson, A.C., Parker, R.A., Morpeth, D.R., Burbidge, A., Taylor, I.B. 2000. ‘‘Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid’’, *Plant Molecular Biology*, 42, 833-845.
- Tucker, D.E., Ort, D.R. 2002. Low temperature induces expression of nitrate reductase in tomato that temporarily overrides circadian regulation of activity. *Photosynth Res.*, 72, 285–293.
- Tun, N.N., Holk A., Scherer, G.F.E., 2001. Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Letters* 509: 174–176.
- Turan, Ö., 2007. Nohut (*Cicer arietinum* L.) Çesit ve Hatlarının Soğuk Stresine Karşı Toleransını Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametreler ile Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Uchida, A., Jagendorf, A.T., Hibino, T., Takabe, T., Takabe, T., 2002 Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci* 163,515–523.
- 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.
- Unsal, N.P., & Arisan,D., 2009. Nitric Oxide Signalling In Plants. *Bot. Rev.* 75, 203–229.
- Urritia, M., Duman J., Knight C., 1992. Plant thermal hysteresis proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1121-199.
- Van Camp, W., Capiou, K., Van Montagu, M., Inze D., and Slooten, L., 1996. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe- superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol*, (112), 1703–1714.
- Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Kaur, H., Cross, C.E. and Halliwell, B., 1996. Nitrotyrosine as Biomarker for Reactive Nitrogen Species, In: Packer L, ed. *Nitric Oxide, B. Physiological and Pathological Processes*, *Methods in Enzymology*, 269, 175-184.
- 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.
- Vernieri, P., Pardossi A., Tognoni, F. 1991. Influence of chilling and drought on water relations and abscisic acid accumulation in bean. *Aust J Plant Physiol* 18: 25- 35
- 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.
- Vital, S.A., Fowler, R.W., Virgen, A., Gossett, D.R., Banks, S.W., Rodriguez, J., 2008. Opposing Roles for Superoxide and Nitric Oxide in the NaCl-Induced Up-Regulation of Antioxidant Enzyme Activity In Cotton Callus Tissue. *Environ Exp Bot.*, 62, 60-68
- Vranova, E., Inze, D., Van Breusegem, F., 2002. Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53, 1227-1236.
- Wang, C., WeiLi, S., Wang, L.,2011.Nitricoxide supplementation alleviates ammonium toxicity in the submergedmacrophyte *Hydrilla verticillata*(L.f.) Royle. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 67–73.
- Wang, C.Y., 1990. *Chilling Injury of Horticultural Crops*, Boca Raton, FL: CRC, 313 pp.
- Wang, H-H., Huang J-J., Bi Rong. 2010 . Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. *Plant Science* , 281–288.
- Wang, Y., Feng, H., Qu, Y., Cheng, J., Zhao, Z., Zhang, M., Wang, X., An, L., 2006. The relationship between reactive oxygen species and nitric oxide in ultraviolet-B-induced ethylene production in leaves of maize seedlings. *Environ Exp Bot* ,57, 51–61.

- Webb, M. S., Uemura, M. and Steponkus, P. L., 1994, A Comparison of Freezing Injury in Oat and Rye: Two Cereals at the Extremes of Freezing Tolerance. *Plant Physiol.* 104 (2) :467-478.
- Weitzberg, E., ve Lundberg, J., 1998, Nonenzymatic Nitric Oxide Production in Humans Nitric Oxide, *Biology and Chemistry*, 2, 1-7.
- Wendehenne, D., A. Pugin, D. F. Klessig & J. Durner. 2001. Nitric oxide: comparative synthesis and signalling in animal and plant cells. *Trends in Plant Sciences*, 6, 177–183.
- Whetten, R.W., MacKay, J.J., Sederoff, R.R., 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 49, 585-609.
- Wildt, J., Kley D, Rockel A, Rockel P, Segschneider HJ. 1997. Emission of NO from several higher plant species. *Journal of Geophysical Research* 102: 5919–5927.
- Wilkinson S., Clephan A.L., Davies W.J. 2001. Rapid low temperature-induced stomatal closure occurs in cold-tolerant *Commelina communis* L. leaves but not in cold-sensitive *Nicotiana glauca* L. leaves, via a mechanism that involves apoplastic calcium but not abscisic acid. *Plant Physiology* 126, 1566–1578.
- Wilkinson, S., Davies W. J., 2002. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment*, 25, 195–210.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Monyagu, M.V., Inzé D. ve Camp, W.V., 1997, Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants, *EMBO J.*, (16), 4806–4816.
- Willekens, H., Villarroel, R., Montagu, M.V., Inze, D., Camp, W.V., 1997. Molecular identification of catalases from *Nicotiana glauca* (L.). *FEBS Letters*, 352, 79-83.
- 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.
- Wojtaszek, P., 1997. Oxidation burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemistry*, 322, 681–692
- Xing, H., Tan, L.L., An, L.Z., Zhao, Z.G., Wang, S.M., Zhang, C.L., 2004. Evidence for the involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: Inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. *Plant Growth Regul.*, 42, 61-68.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M., Zhu, J.K., 2002, Regulation of osmotic stressresponsive gene expression by the *LOS6/ABA1* locus in *Arabidopsis*, *J. Biol. Chem.*, 277, 8588–8569.
- Xiong, L., Zhu, J.K. 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology*, 133: 29–36.
- 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.) Çesitlerinin Kuraklık Stresine Karşı Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Tolerans Parametrelerinin Arastırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

- Yamasaki, H., and Sakihama, Y., 2000, Simultaneous Production of Nitric Oxide and Peroxynitrite by Plant Nitrate Reductase: *in vitro* Evidence for the NR Dependent Formation, *FEBS Letters*, 468, 89-92.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. and Takahashi, S., 1999. An Alternative Pathway for Nitric Oxide Production in Plants: New Features of an Old Enzyme, *Trends in Plant Science*, (2), 128–129.
- Yaneva, I., Mack, G., Vunkova-Radeva, R., Tischner, R., 1996. Changes in nitrate reductase activity and the protective effect of molybdenum during cold stress in winter wheat grown on acid soil. *Journal of Plant Physiology*, 149, 211–216.
- 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 (*Bruguiera 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.
- Yousef, S.A., Al-Saadawy, I.S., and Nasr Alla, A.Y., 1999. Effect of salinity nitrogen fertilization on nitrate reductase activity in local cultivar of broad bean *Vicia faba* L., *Dirasot Agricultural Sciences*, 26 (1), 144-150.
- Yu, C.C., Hung, K.T., Kao, C.H., 2005. Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced NH_4^+ accumulation in rice leaves. *J Plant Physiol* (162), 1319–1330.
- 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.
- Zhang, J., Jiang, M., 2002. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta*, 215, 1022-1030.
- Zhang, F., Wang, Y., Yang, Y., Wu, H., Wang, D., and Liu, J., 2007. Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in salt resistance in the calluses from *Populus euphratica* Plant, *Cell and Environ.* 30, 775–785.
- Zhang, L., Zhou S., Xuan Y., Sun M, Zhao L., 2009. Protective effect of nitric oxide against oxidative damage in *Arabidopsis* leaves under ultraviolet-B irradiation. *J Plant Biol* 52: 135–140
- Zhao Z, Chen G, Zhang C., 2001. Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings. *Australian J Plant Physiol* 28:1055–1061.
- Zhao, L., Zhang, F., Guo, J., Yang, Y., Li, B. and Zhang, L., 2004. Nitric Oxide Functions as a Signal in Salt Resistance in the Calluses from Two Ecotypes of Reed, *Plant Physiology*, 134:849-857.

- Zhao, L., He, J., Wang, X., Zhang, L., 2008. Nitric oxide protects against polyethylene glycol- induced oxidative damage in two ecotypes of reed suspension cultures. *J. Plant Physiol.* 165, 182–191.
- Zhao, M.G., Chen, L., Zhang, L.L., Zhang, W.H., 2009. Nitric Reductase-Dependent Nitric Oxide Production Is Involved In Cold Acclimation And Freezing Tolerance In *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 151, 755–767.
- Zhao, M.G., Tian, Q.Y., Zhang, W.H., 2007. Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 144, 206–217.
- Zheng C, Jiang D, Liu F, Dai T, Liu W, Jing Q, Cao W., 2009. Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. *Environ Exp Bot* 67:222–227.
- Zhou, R. and Zhao, H., 2004. Seasonal pattern of antioxidant enzyme system in the roots of perennial forage grasses grown in alpine habitat, related to freezing tolerance. *Physiologia Plantarum*, 121, 399–408.
- Zottini, M., Formentin, E., Scattolin, M., Carimi, F., Schiavo, F.L., Terzi, M., 2002. Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality *in vivo*. *FEBS Lett*, 515, 75–78.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Bingöl ili Solhan ilçesi Hazarşah köyünde doğdu. İlkokulu köyünde, ortaokulu Solhan ve Bingöl de, lise öğrenimini de Gebze de tamamladı. 2000 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nden 2005 yılında lisans ile birleştirilmiş tezsiz yüksek lisan derecesi alarak mezun oldu. 2006 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında doktora öğrenimine devam etmektedir. Ocak 2009 da Bingöl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne araştırma görevlisi olarak atandı. YÖK'ün 35. maddesine göre yurt içi görevlendirme ile Nisan 2009'dan beri görevlendirildiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde halen araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.