

**SOĞUĞA DİRENÇLİ BİTKİLERİN YAPRAK
APOPLASTINDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN
FASULYEDE (*Phaseolus vulgaris* L.) SOĞUK
STRESİ TOLERANSI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Deniz TİRYAKİ

**Doktora Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı
Prof. Dr. Ökkeş ATICI
2015
Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

SOĞUĞA DİRENÇLİ BİTKİLERİN YAPRAK APOPLASTINDAN
İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN FASULYEDE (*Phaseolus vulgaris*
L.) SOĞUK STRESİ TOLERANSI ÜZERİNE ETKİLERİ

Deniz TİRYAKİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Botanik Bilim Dalı

ERZURUM
2015

Her hakkı saklıdır



TEZ ONAY FORMU

**SOĞUĞA DİRENÇLİ BİTKİLERİN YAPRAK APOPLASTINDAN İZOLE EDİLEN
BAKTERİLERİN FASULYEDE (*Phaseolus vulgaris* L.) SOĞUK STRESİ TOLERANSI
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Prof. Dr. Ökkeş ATICI danışmanlığında, Deniz TİRYAKİ tarafından hazırlanan bu çalışma, 11/12/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Botanik Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza :

Üye : Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Yavuz DEMİR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Salih MUTLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **29/12/2015** tarih ve **...53.../...13/15...** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2011-108

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

ÖZET

Doktora Tezi

SOĞUĞA DİRENÇLİ BİTKİLERİN YAPRAK APOPLASTINDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN FASULYEDE (*Phaseolus vulgaris* L.) SOĞUK STRESİ TOLERANSI ÜZERİNE ETKİLERİ

Deniz TİRYAKİ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Bu araştırmada, soğuga toleranslı bitkilerin yaprak apoplastından izole edilen bakterilerin fasulyenin (*Phaseolus vulgaris* L.) soğuk stresine fizyolojik ve biyokimyasal cevap mekanizmaları üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaç için Erzurum ve yöresinde toplanan soğuga dayanıklı bazı bitkiler kullanılmıştır. Bu bitkiler, *Onosma isauricum*, *Verbascum cheiranthifolium*, *Chenopodium botrys*, *C. foliosum*, *Myosotis alpestris*, *Capsella bursa-pastoris*, *Artemisia austriaca*, *Draba nemorosa*, *Raphanus raphanistrum*, *Trifolium repens*, *Fragaria vesca*, *Taraxacum sieheanum*, *Galanthus gracilis*, *Colchicum speciosum*, *Scilla siberica*, *Erodium cicutarium*'dur. Bitkilerin yaprak apoplastından psikrotolerant bakteriler izole edilmiş ve tür teşhisleri 16S rRNA dizi analizi ve Vitek yöntemi ile yapılmıştır. Bitkilerin yaprak apoplastından 10 bakteri türüne ait 20 bitki büyüme düzenleyici bakteri (PGPB) izolatu belirlenmiştir. Bunlar, *Sphingobacterium faecium* (izolatları; DT-1, DT-2, DT-3, DT-9, DT-15), *S. kitahiroshimense* (DT-4), *Staphylococcus intermedius* (DT-5), *Bacillus cereus* (DT-6, DT-10, DT-11, DT-12), *Pseudomonas fragi* (DT-7, DT-8), *P. chloropaphis* (DT-14), *P. fluorescens* (DT-16, DT-18), *P. proteolytica* (DT-17, DT-19), *Raoultella ornithinolytica* (DT-13), *Brevibacterium frigoritolerans* (DT-20)'dır. Bakterilerin inokule edileceği fasulye fideleri normal şartlarda (25/22 °C) 16 gün büyütülmüş ve bir grubunun yapraklarına 10. gün 50 ml (10⁸ CFU/ml) bakteri uygulanmıştır. Sonra fideler 3 gün daha normal şartlarda tutulmuş ve soğuk şartlara (9/5°C) transfer edilmiştir. Soğuga 3 gün maruz bırakılan fidelerin yapraklarından apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi, donma hasarı, apoplastik ve hücrel antioksidan enzimlerin aktivitesi, reaktif oksijen türleri ve lipid peroksidasyon seviyeleri belirlenmiştir. Ayrıca, bakterilerin ACC deaminaz aktivitesi ve ekstrasellüler proteinlerinin SDS-PAGE profilleri belirlenmiştir. Fidelere inokule edilen izolatların çoğu, kök-gövde kuru ağırlığını ve klorofil miktarını artırmıştır. Ayrıca, izolatlar fidelerde donma hasarını düşürmüş ve apoplastik sıvının buz nükleasyon aktivitesini (donma noktasının gecikmesi) artırmıştır. İzolatlardan bazıları H₂O₂, süperoksit anyonu ve malondialdehid (MDA) içsel seviyelerini düşürmüştür. Düşük sıcaklık, apoplastik katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerini düşürürken, peroksidaz (POX) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerini artırmıştır. Aynı gruptaki bitkilere bakteri uygulamaları ise aktiviteleri genelde artırmıştır. Tek başına düşük sıcaklık, hücrel CAT ve SOD aktivitesini artırırken, POX, APX ve GR aktivitesini düşürmüştür. Soğuk+bakteri uygulamalarında ise aktivitelerde artış ve düşüşler belirlenmiştir. Bakteri izolatlarının hepsinde ACC deaminaz aktivitesi belirlenmiştir. SDS-PAGE verilerine göre izolatların çoğu, ekstrasellüler olarak yeni proteinler salgılamışlardır. İzolatlardan bazılarının, PGPB bakteri grubunda oldukları ve soğuk stresinden önce fasulye fidelerine inokule edildiklerinde bitkinin soğuga toleransını artırabildikleri ileri sürülmüştür. Tez içinde bütün gruplar kendi kontrolü ile kıyaslanmış ve ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

2015, 167 sayfa

Anahtar Kelimeler: Soğuk stresi, PGPB, Apoplast, Fasulye, Antioksidan enzim, ACC deaminaz, SDS-PAGE

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

THE EFFECTS OF BACTERIA ISOLATED FROM THE LEAF APOPLAST OF COLD-RESISTANT PLANTS ON THE COLD STRESS TOLERANCE OF BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)

Deniz TİRYAKİ

Atatürk University
Institute of Science
Department of Biology
Department of Botany

Supervisor: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

In this study, the effects of bacteria, isolated from the leaf apoplast of psychrotroph plants, on the physiological and biochemical response mechanisms to the cold stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) were investigated. For this aim, some plants collected from and nearby Erzurum that are cold-resistant were used. These plants are, *Onosma isauricum*, *Verbascum cheiranthifolium*, *Chenopodium botrys*, *C. foliosum*, *Myosotis alpestris*, *Capsella bursa-pastoris*, *Artemisia austriaca*, *Draba memorasa*, *Raphanus raphanistrum*, *Trifolium repens*, *Fragaria vesca*, *Taraxacum shieheanum*, *Galanthus gracilis*, *Colchicum speciosum*, *Scilla siberica*, *Erodium cicutarium*. The psychrotolerant bacteria were isolated from the leaf apoplast of the plants and the identifications of species was made by 16S rRNA sequencing analysis and Vitek method. 20 Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) isolates belonging to 10 bacteria species were determined. These are, *Sphingobacterium faecium* (isolates; DT-1, DT-2, DT-3, DT-9, DT-15), *S. kitahiroshimense* (DT-4), *Staphylococcus intermedius* (DT-5), *Bacillus cereus* (DT-6, DT-10, DT-11, DT-12), *Pseudomonas fragi* (DT-7, DT-8), *P. chloropaphis* (DT-14), *P. fluorescens* (DT-16, DT-18), *P. proteolytica* (DT-17, DT-19), *Raoultella ornithinolytica* (DT-13), *Brevibacterium frigoritolerans* (DT-20). The bean seedlings to which the bacteria would be inoculated were grown for 16 days under normal conditions (25/22°C) and on the 10th day, 50 ml (10⁸ CFU/ml) bacteria was applied to the leaves of a group. After that, the seedling were kept under normal circumstances for 3 days and then were transferred to the cold conditions (9/5°C). The ice nucleation activities of apoplastic proteins, frost damage, the activities apoplastic and cellular antioxidant enzyme activity, reactive oxygen types and lipid peroxidation levels were determined from the leaves of seedlings that were exposed to the cold for 3 days. At the same time, the ACC deaminase activities of the bacteria and the SDS-PAGE profiles of the extracellular proteins were determined. Most of the isolates inoculated into the seedlings increased the root-stem dry weight and chlorophyll content. Moreover, the isolates decreased the frost damage and increased the ice nucleation activity (the delay of freezing point) of apoplastic liquid. Some of the isolates decreased H₂O₂, superoxide anion and malondialdehyde (MDA) levels. As low temperature decreased apoplastic catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) activities, it increased peroxidase (POX) and superoxide dismutase (SOD) activities. The bacteria applications to the plants in the same group generally increased the activities. While low temperature, alone, increased the cellular CAT and SOD activities, it decreased POX, APX and GR. In cold+bacteria applications increases and decreases in activities were determined. ACC deaminase activity was determined in all of the bacteria isolates. According to SDS-PAGE data, most of the isolates released new proteins as extracellular. It was suggested that when some of the isolates are in the PGPB bacteria group and when they are inoculated into bean seedlings before cold stress, they can increase the tolerance of the plant to the cold. Within the dissertation, all the groups are compared to their controls and are discussed detailly.

2015, 167 pages

Keywords: Cold stress, PGPB, Apoplast, Bean, Antioxidant Enzyme, ACC Deaminase, SDS-PAGE

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu araştırma, 2011-108 no'lu Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi olarak desteklenmiş ve Fen-Fakültesi Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

Tez konusunun belirlenmesinde, araştırmaların planlanmasında ve sonuçların tartışılmasındaki yardım ve emeklerinden dolayı değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında ilgi, yardım ve desteğini gördüğüm, tez izleme komitesinde bulunan Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a ve Sayın Prof. Dr. Yavuz DEMİR'e, tohum teminindeki yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Erdal ELKOCA'ya, Mikrobiyoloji konusunda bilgilerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ö. Faruk ALGUR'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye, Sayın Arş. Gör. Yağmur ÜNVER'e, çalışmalarımdeki yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Yusuf KAYA'ya, Sayın Doç. Dr. Fatih ÖZ'e, Sayın Doç. Dr. Meryem ATASEVER'e, Sayın Doç. Dr. Serkan ERDAL'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Nevzat ESİM'e, bitkilerin toplanmasında ve teşhis edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Veli İLHAN'a, çalışmalarım esnasında bilgisine danıştığım, fikirleriyle sürekli yol gösteren Sayın Uzm. Biyolog Cüneyt ÇAĞALA'ya çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında yanımda olan ilgi ve desteğini esirgemeyen kıymetli arkadaşlarım, Alev SEZEN'e, Nilay AKBULUT'a, Özlem GÜR'e, Gözdenur ÖZGÜRLER'e, Ülfet ÇAKALOT'a, Özlem GÜLMEZ'e, Sinem KARAKUŞ'a, İhsan AYDIN'a, Murat ÖZDAL'a, Hüseyin KANBUR'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi her konuda yanımda olan umudumu kaybettiğim anlarda sürekli beni destekleyen, hiçbir zaman yılmamam gerektiğini, sabrın gerçek manasının ne olduğunu bana öğreten, babam Sedi TİRYAKİ'ye, annem Anahanım TİRYAKİ'ye, abim Mesut TİRYAKİ'ye, kardeşim Burcu TİRYAKİ'ye şükranlarımı sunuyorum ve bu tezimi onlara armağan ediyorum.

Deniz TİRYAKİ

Kasım 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	23
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	37
3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	37
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	38
3.3. Yöntemler	42
3.3.1. Soğuğa dayanıklı yabani bitki örneklerinin toplanması	42
3.3.2. Bakterilerle ilgili yapılan çalışmalar	43
3.3.2.a. Gram reaksiyon testi	43
3.3.2.b. Hücre morfolojisi analizi	44
3.3.2.c. Gram boyama	44
3.3.3. ACC deaminaz aktivitesinin belirlenmesi	44
3.3.3.a. ACC deaminaz aktivite tayini için standart grafiğin hazırlanması.....	45
3.3.4. Bakterilerin teşhisi.....	46
3.3.5. Bitkilerin büyütülmesi ve bakteri inokulasyonu	47
3.3.6. Yapraklarda % donma hasarının belirlenmesi.....	48
3.3.7. Apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesinin belirlenmesi	48
3.3.8. Apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu	49
3.3.9. Hücresel proteinlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu	49
3.3.10. Lipid peroksidasyon seviyesinin belirlenmesi	50
3.3.11. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi	50
3.3.12. Süperoksit anyon miktarının belirlenmesi.....	52
3.3.13. Apoplastik ve hücresel antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi	52

3.3.13.a. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi	53
3.3.13.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi	54
3.3.13.c. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi	55
3.3.13.d. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayini	55
3.3.13.e. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tayini	55
3.3.14. Çözünabilir protein miktarının tayini	56
3.3.15. Total klorofil içeriğinin belirlenmesi	57
3.3.16. İzole edilen bakterilerden ekstrasellüler proteinlerin izolasyonu ve analizi	58
3.3.17. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi	58
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	61
4.1. Bitkinin Kök ve Gövdelerindeki Kuru Ağırlık Miktarına Ait Bulgular.....	66
4.2. % Donma Hasarı Bulguları	71
4.3. Buz Nükleasyon Aktivitesi (BNA) Sonuçları	77
4.4. Antioksidan Enzimlerin Aktivitelerine Ait Bulgular	81
4.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesi bulguları.....	81
4.4.1.a. Apoplastik SOD aktivitesi	81
4.4.1.b. Hücrel SOD aktivitesi	82
4.4.2. Katalaz (CAT) aktivitesi bulguları	86
4.4.2.a. Apoplastik CAT aktivitesi	86
4.4.2.b. Hücrel CAT aktivitesi	87
4.4.3. Peroksidaz (POX) aktivitesi bulguları.....	91
4.4.3.a. Apoplastik POX aktivitesi bulguları.....	91
4.4.3.b. Hücrel POX aktivitesi bulguları.....	91
4.4.4. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi bulguları	96
4.4.4.a. Apoplastik APX aktivitesi bulguları.....	96
4.4.4.b. Hücrel APX aktivitesi bulguları.....	96
4.4.5. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi bulguları	101
4.4.5.a. Apoplastik GR aktivitesi	101
4.4.5.b. Hücrel GR enzim aktivitesi.....	101
4.5. Lipid Peroksidasyon Seviyesi (MDA miktarı) Bulguları.....	106
4.6. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarına Ait Bulgular.....	109
4.7. Süperoksit Anyonu (O ₂ ⁻) Miktarı Bulguları	112

4.8. Klorofil a, Klorofil b ve Total Klorofil Miktarı Bulguları	115
4.9. ACC Deaminaz Aktivite Değerleri	120
4.10. Bakteri Ekstrasellüler Proteinlerinin SDS-PAGE ile Değerlendirilmesine Ait Bulgular	122
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	130
KAYNAKLAR	149
ÖZGEÇMİŞ	168

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
ACC	: 1-aminosiklopropan 1-karboksilat
AFP	: Antifriz protein
APX	: Askorbat peroksidaz
CAT	: Katalaz
E.C	: Enzim kod numarası
E.Ü	: Enzim ünitesi
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
GR	: Glutasyon redüktaz
kDA	: Kilo dalton
LPO	: Lipid peroksidasyon
MDA	: Malondialdehid
mM	: Milimolar
NBT	: Nitroblue tetrazolium klorür
OH^-	: Hidroksil radikali
POX	: Peroksidaz
PVP	: Polivinilpirrolidon
ROS	: 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. Bitkilerin maruz kaldıkları çeşitli biyotik ve abiyotik stresler	2
Şekil 1.2. Düşük sıcaklığa maruz kalmış bir yaprakta simplastik bölgedeki suyun apoplastik bölgelere hareketi ile apoplastik bölgede buz oluşumu	7
Şekil 1.3. Bitkilerde ROT uzaklaştıran metabolik yollar	12
Şekil 1.4. Hem ACC deaminaz üreten hem de IAA sentezleyen PGPB'ler için şematik bir model	20
Şekil 3.1. ACC standart grafiği	46
Şekil 3.2. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik ...	51
Şekil 3.3. Süperoksit anyonu miktarı standart grafiği	52
Şekil 3.4. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik	54
Şekil 3.5. Protein tayini için kullanılan standart grafik	57
Şekil 4.1. Soğuğa dayanıklı yabani ve kültür bitkileri	64
Şekil 4.2. Bakteri izolatlarının yakınlığını gösteren dendogram	65
Şekil 4.3. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) yapraklarından elde edilen kök kuru ağırlık miktarı	69
Şekil 4.4. Düşük sıcaklıkta yetiştirilen fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) yapraklarından elde edilen kök kuru ağırlık miktarları	69
Şekil 4.5. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) yapraklarından elde edilen gövde kuru ağırlık miktarı	70
Şekil 4.6. Düşük sıcaklıkta yetiştirilen fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) yapraklarından elde edilen gövde kuru ağırlık miktarı	70
Şekil 4.7. Bakteri uygulanmış ve uygulanmamış fasulye fidelerinin hasattan önceki görsel durumları	72
Şekil 4.8. Fasulye yapraklarındaki % donma hasarı değerleri	74
Şekil 4.9. Fasulye yapraklarındaki % donma hasarı değerleri	74
Şekil 4.10. Fasulye yapraklarındaki % donma hasarı değerleri	75
Şekil 4.11. Fasulye yapraklarındaki % donma hasarı değerleri	75
Şekil 4.12. Fasulye yapraklarındaki % donma hasarı değerleri	76
Şekil 4.13. Fasulye yapraklarındaki % donma hasarı değerleri	76

Şekil 4.14. Fasulye yapraklarındaki % donma hasarı değerleri.....	77
Şekil 4.15. Fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik buz nükleasyon aktivite değerleri.....	79
Şekil 4.16. Fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik buz nükleasyon aktivite değerleri.....	79
Şekil 4.17. Fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik buz nükleasyon aktivite değerleri.....	80
Şekil 4.18. Fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik buz nükleasyon aktivite değerleri.....	80
Şekil 4.19. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen apoplastik SOD aktivitesi değerleri.....	89
Şekil 4.20. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik SOD aktivitesi değerleri	89
Şekil 4.21. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen hücrel SOD aktivitesi değerleri.....	90
Şekil 4.22. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen hücrel SOD aktivitesi değerleri	90
Şekil 4.23. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen apoplastik CAT aktivitesi değerleri.....	89
Şekil 4.24. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik CAT aktivitesi değerleri	94
Şekil 4.25. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen hücrel CAT aktivitesi değerleri.....	90
Şekil 4.26. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen hücrel CAT aktivitesi değerleri	95
Şekil 4.27. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen apoplastik POX aktivitesi değerleri.....	94
Şekil 4.28. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik POX aktivitesi değerleri	94
Şekil 4.29. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen hücrel POX aktivitesi değerleri.....	95

Şekil 4.30. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen hücresel POX aktivitesi değerleri	95
Şekil 4.31. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen apoplastik APX aktivitesi değerleri.....	99
Şekil 4.32. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik APX aktivitesi değerleri	99
Şekil 4.33. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen hücresel APX aktivitesi değerleri.....	100
Şekil 4.34. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen hücresel APX aktivitesi değerleri	100
Şekil 4.35. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen apoplastik GR aktivitesi değerleri	104
Şekil 4.36. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik GR aktivitesi değerleri.....	104
Şekil 4.37. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen hücresel GR aktivitesi değerleri	105
Şekil 4.38. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen hücresel GR aktivitesi değerleri.....	105
Şekil 4.39. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen MDA miktarı	108
Şekil 4.40. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen MDA miktarı.....	108
Şekil 4.41. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen H ₂ O ₂ seviyesi.....	111
Şekil 4.42. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen H ₂ O ₂ seviyesi	111
Şekil 4.43. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen O ₂ ⁻ miktarı.....	114
Şekil 4.44. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen O ₂ ⁻ miktarı	114
Şekil 4.45. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen Kl a miktarı.....	117

Şekil 4.46. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye	
yapraklarından elde edilen Kl a miktarı	117
Şekil 4.47. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından	
sonra yapraklardan elde edilen Kl b miktarı	118
Şekil 4.48. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye	
yapraklarından elde edilen Kl b miktarı	118
Şekil 4.49. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından	
sonra yapraklardan elde edilen total klorofil miktarı	119
Şekil 4.50. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye	
yapraklarından elde edilen total klorofil miktarı	119
Şekil 4.51. Bakterilerin salgıladıkları ekstrasellüler proteinlerin SDS-Poliakrilamid	
Jel Elektroforezi fotoğrafı	123
Şekil 4.52. Bakterilerin salgıladıkları ekstrasellüler proteinlerin SDS-Poliakrilamid	
Jel Elektroforezi fotoğrafı	124
Şekil 4.53. Bakterilerin salgıladıkları ekstrasellüler proteinlerin SDS-Poliakrilamid	
Jel Elektroforezi fotoğrafı	125
Şekil 4.54. Bakterilerin salgıladıkları ekstrasellüler proteinlerin SDS-Poliakrilamid	
Jel Elektroforezi fotoğrafı	126
Şekil 4.55. Bakterilerin salgıladıkları ekstrasellüler proteinlerin SDS-Poliakrilamid	
Jel Elektroforezi fotoğrafı	127
Şekil 4.56. Bakterilerin salgıladıkları ekstrasellüler proteinlerin SDS-Poliakrilamid	
Jel Elektroforezi fotoğrafı	128

ÇİZELGELER DİZİNİ

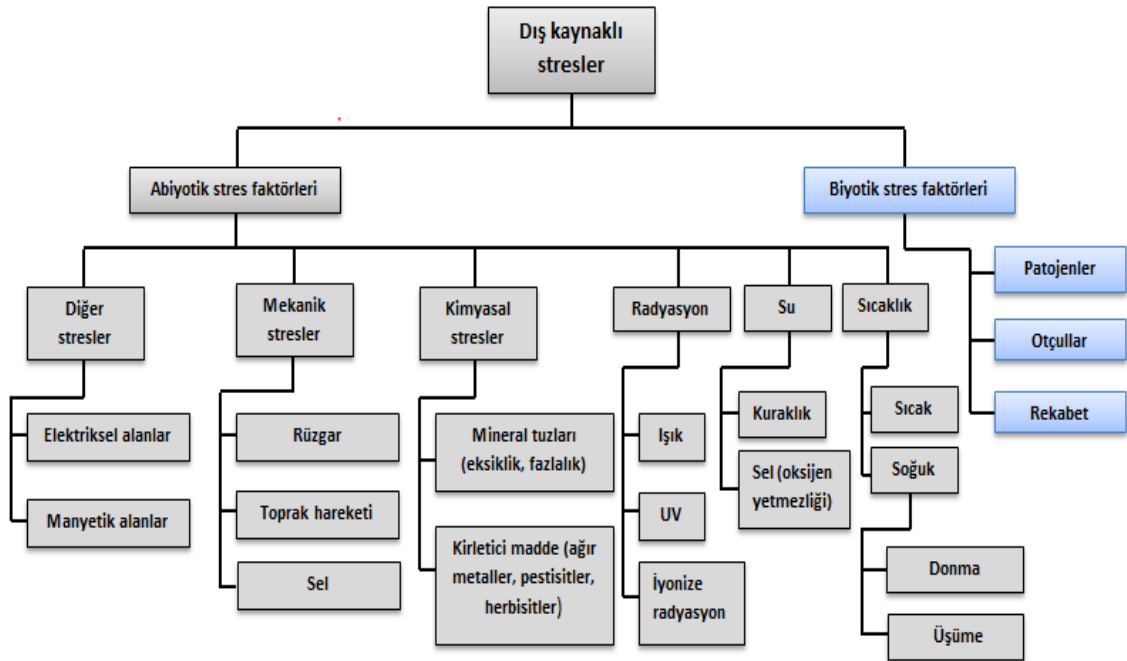
Çizelge 1.1. Başlıca reaktif oksijen türleri	8
Çizelge 4.1. Bakterilerin izole edildiği bitkiler, habitatları, 16S ve Vitek verilerine göre bilimsel adları ve Gram özellikleri	62
Çizelge 4.2. Kuru Ağırlık sonuçları.....	68
Çizelge 4.3. % Donma hasarı değerleri (K: Kontrol, S: Soğuk).....	73
Çizelge 4.4. Fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik buz nükleasyon değerleri	78
Çizelge 4.5. Apoplastik ve hücrel SOD aktivitesi sonuçları.	88
Çizelge 4.6. Apoplastik ve Hücrel CAT aktivitesi sonuçları.	88
Çizelge 4.7. Apoplastik ve Hücrel POX aktivitesi sonuçları.	93
Çizelge 4.8. Apoplastik ve Hücrel APX aktivitesi sonuçları..	98
Çizelge 4.9. Apoplastik ve Hücrel GR aktivitesi sonuçları.	103
Çizelge 4.10. Hücrel MDA aktivitesi sonuçları.	107
Çizelge 4.11. Hücrel H ₂ O ₂ seviyesi sonuçları..	110
Çizelge 4.12. Hücrel Süperoksit Anyonu aktivitesi sonuçları.....	113
Çizelge 4.13. K _{la} , K _{lb} ve Total Klorofil sonuçları.....	116
Çizelge 4.14. Bakteri izolatlarının ACC deaminaz aktivite değerleri	121
Çizelge 4.15. Çalışılan bütün parametrelerin soğuk+bakteri uygulanmış fidelerde izolatlara göre artış ve azalışları.....	129

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun sürekli artması ve bu artışa paralel olarak insan ihtiyaçlarının çeşitlenmesi, topraklar üzerinde sürekli bir kullanım baskısı oluşturmaktadır. Bu baskılar sonucu yanlış kullanılmakta olan topraklarda giderek önemli sorunlar ortaya çıkmaktadır (Donma 2008). Bu bağlamda, ülkemizde de işlenebilir tarım alanlarının çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin etkisiyle kullanılamaz hale gelmesi uzun dönemde önemli bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (Jones *et al.* 1989; Bray *et al.* 2000; Doğru 2006; Mutlu 2009).

Stres kavramsal olarak genelde insanlar ve hayvanlar için kullanılsa da bitkiler de strese girer ve stresli koşullarda önemli bitkisel hasarlar ortaya çıkar. Metabolizmanın bozulması sonucu meydana gelen bu hasardan dolayı bitkinin veya bitki organlarının büyüme, gelişme ve veriminde belirgin azalma olur. Bunlara ilave olarak ileri seviyede stres, üründe nitelik ve niceliğin yitirilmesine, bitkinin ve bitki organlarının yaşamsal faaliyetlerinin son bulmasına neden olabilmektedir. Elverişsiz çevre faktörlerine karşı bitkinin hayatta kalma yeteneği ise stres direnci veya toleransı olarak adlandırılmaktadır (Levitt 1980). 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 dirençliyken, diğer bazı kısımları ise strese daha duyarlı olabilir (Hale and Orcutt 1987; Salisbury and Ross 1992; Taiz and Zeiger 2006). Stresin ortadan kalkması veya strese karşı direnç kazanılması durumunda, stres etkileri geri dönüşümlü olabilir. Ancak stres uzun süre devam eder, şiddetini artırır veya dayanıklılık sağlanamaz durumunda ise bitki canlılığı gerilemeye başlayarak geri dönüşümsüz bir zarara dönüşebilir ve bitkinin ölümüne neden olabilir (Özcan vd 2004).

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 tanımla aklimasyon yeni bir çevreye maruz kalan bitkideki kalıtsal olmayan değişikliklerdir (Kocaçalışkan 2004). Stresle alakalı bir diğer kavram ise adaptasyondur, bu pek çok nesil boyunca seçim sonucu kazanılan, genetiksel olarak belirlenmiş direncin düzeyini gösterir (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. Tolerans ise bir bitkinin uygun olmayan çevre şartlarına maruz kalması durumunda hayatını devam ettirmesi, strese tahammülüdür (Kocaçalışkan 2004; Taşğın 2004). Stres faktörleri orijinlerine göre biyotik (hayvanlar, patojenler, allelopati, parazitik bitkiler ve çeşitli antropogenik aktiviteler) ve abiyotik (kuraklık, düşük sıcaklık, tuzluluk, su baskını, sıcaklık, radyasyon, oksidatif stres, rüzgar ve toprağın besleyicilerden yoksun olması gibi) olmak üzere iki gruba ayrılır. Stres kaynakları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Bitkilerin maruz kaldıkları çeşitli biyotik ve abiyotik stresler (Levitt 1980'den modifiye edilerek)

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 stresi tarımsal açıdan bitki yayılışını, gelişimini etkileyen önemli bir abiyotik faktördür. Örneğin, düşük sıcaklığın bitkilerde çimlenme, büyüme ve gelişme, reproduktif organlar ve hasat sonrası depolama süresi de dahil olmak üzere birçok olay üzerinde olumsuz etkileri olur (Lyons 1973; Wang 1990). Buna karşılık, bitkiler aleminde düşük sıcaklığa tolerans bakımından büyük varyasyonlar bulunmaktadır (Rajashekar 2000).

Soğuk stresinden etkilenmelerine göre bitkiler genelde 3 gruba ayrılırlar:

- 1- Düşük sıcaklığa hassas olanlar (12°C 'nin altındaki sıcaklıklarda zarar görürler).
- 2- Düşük sıcaklığa toleranslı, ancak dona duyarlı olanlar (12°C 'nin altındaki sıcaklıklara uyum sağlayabilir, fakat donma sıcaklıklarında hayatta kalamazlar).
- 3- Donma sıcaklığına toleranslı olanlar. Bunlar 0°C 'nin altındaki sıcaklıklarda yaşamlarını koruyabilmektedirler (Pearce 1999). Örneğin kışlık çavdar (*Secale cereale*), -30°C sıcaklıklarda bile canlılığını koruyabilmektedir.

Görüldüğü gibi, soğuğa duyarlı tropikal türler donma derecesinde olmayan sıcaklıklarda onarılamaz şekilde zarar görebilmektedirler. Zararlar metabolik ve hücrel işlemlerin engellenmesi ve zar özelliklerindeki değişimlerden kaynaklanır. Farklı bitki türleri ise soğuk ya da donma toleransı derecelerini düşük ancak donma derecesinde olmayan sıcaklıklara belli bir süre maruz kalarak artırma yeteneğine sahiptirler. Bu olay 'soğuk uyumu' ya da 'soğuk aklimasyonu' olarak bilinir (Thomashow 1999). Soğuğa uyum olayı doğal koşullarda sonbahar aylarında sıcaklıkların azalmasıyla başlar. Laboratuvar koşullarında ise bitkilerin $2-6^{\circ}\text{C}$ sıcaklıklara belirli bir süre maruz bırakılmasıyla sağlanabilir. Maksimum donma toleransının sağlanması için gereken soğuğa uyum

süresinin, bitki türüne göre birkaç gün veya birkaç hafta olduğu ve böylece bitkileri -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 nedenle 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 uyumla 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 bileşiklerin miktarının yanında birçok genin ifadesinin artması gerçekleşebilir. Bu parametrelerle bir bitkinin düşük sıcaklığa duyarlı mı yoksa toleranslı mı olduğu, toleranslı ise soğuğa uyumun sağlanması için hangi metabolik değişimlerin olması gerektiği konusunda fikir elde edilebilmektedir (Nishida *et al.* 1996; Tao *et al.* 1998; Thomashow 1999; Janda *et al.* 2003; Mahajan and Tuteja 2005).

Bitkiler düşük sıcaklıklara maruz kaldığında neler olabileceğini anlayabilmek için suyun donma davranışlarını da bilmek gerekir. 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 içsel 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), hücrelerarası boşluklardaki sıvılar (interselular) ve hücre dışındaki (ekstrasellüler sıvı) sıvılardan daha yoğun olduklarından dolayı osmotik potansiyelleri daha düşüktür. Bu nedenle hücre içerisindeki donma noktası hücre dışı sıvılarına göre daha düşüktür (Hale and Orcut 1987; Salisbury and Ross 1992). Çevre

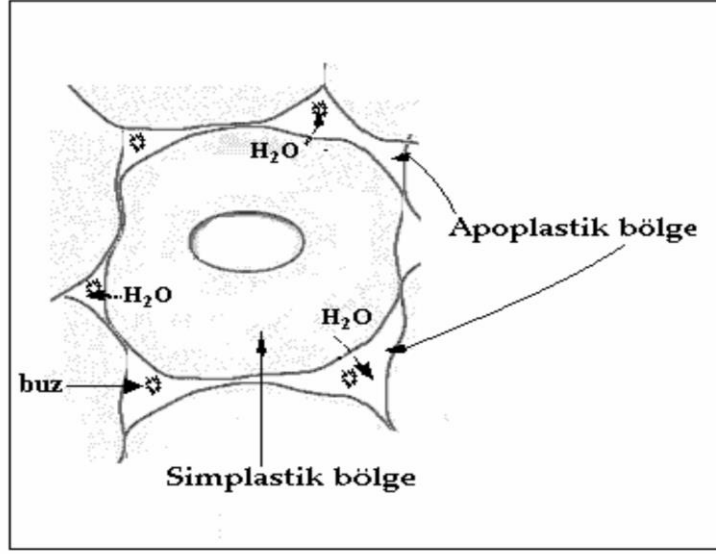
sıcaklığı suyun donma noktasının altına düşerse, bitkinin apoplastik bölgelerindeki (ekstrasellüler) çözeltiler aşırı düzeyde soğumaya başlar. İntraselüler sıvılar ile ekstrasellüler sıvılar doğrudan temas etmediğinden, hücre içinden hücre dışına doğru bir buhar basıncı gradienti meydana gelir. Apoplastik bölgesindeki 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 önlenebilir. Protoplazmanın dehidrasyon miktarı, hücre içerisindeki osmotik potansiyelin düşüşüne bağlı olarak artar. Bu esnada hücre içerisindeki su, hücre dışına (apoplastik bölgeye) pompalanır (Şekil 1.2).

Soğuk stresi hücreler üzerinde doğrudan etki gösterebilirken, bunun bir adım ileri aşaması olan don stresi ise buz oluşumu ile dolaylı bir rol oynar. (Pearce 1999). Hücresel organizmalar için öldürücü bir etken olan donma, özellikle intraselüler bölgenin dehidrasyonu ve buz kristallerinin neden olduğu fiziksel zarardan dolayı ölüme yol açar. Bu olaya, Donma Hasarı denir (Levitt 1980; Hale and Orcutt 1987; Yang *et al.* 1988). Buna karşın bitki hücrelerinde donma toleransı, ekstraselüler buz oluşumuna karşı koyma ve intraselüler buz oluşumunu önleme kapasitesine bağlıdır. Bu olayda, öldürücü intraselüler (hücre içi veya simplastik) ve interselüler (hücre dışı veya apoplastik) buz oluşumunu önlemek öncelikler arasındadır. Örneğin birçok kışlık bitki bunu başarmak için hücre içi veya hücre dışında çözülebilir şeker, aminoasit ve/veya antifriz proteinleri gibi metabolitler biriktirirler (Griffith *et al.* 1997; Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b; Ewart *et al.* 1999; Hoshino *et al.* 1999). Bu metabolitler içerisinde antifriz proteinlerinin önemli bir yeri vardır. Antifriz proteinleri (AFP) üzerine ilk çalışmalar balıklarda yapılmıştır. Daha sonra kışa toleranslı birçok organizmada da bu proteinler çalışılmıştır. Örneğin artropodlarda, fungus, bakterilerde ve yüksek yapılı bitkilerde ise kışlık çavdarda (*Secale cereale*) antifriz özelliğinde birçok proteinin varlığı gösterilmiştir (Duman *et al.* 1991; Duman and Olsen 1993; Griffith and Ewart 1995; Griffith *et al.* 1997; Ewart *et al.* 1999; Hoshino *et al.* 1999; Yu and Griffith 2001). AFP'lerin bulunduğu çözeltilerde donma davranışı üzerine yapılan araştırmalar; bu moleküllerin buz adsorpladıklarını (Duman and DeVries 1974; Tomimatsu *et al.* 1976; DeVries 1983; Griffith *et al.* 1992) ve su moleküllerini farklı bir

şekilde bağlamak suretiyle donma noktasını düşürdükleri belirlenmiştir (DeVries 1983, 1986; Urritia *et al.* 1992). Bitki antifriz proteinlerinin bitkilerin daha çok yaprak apoplastik bölgelerinde biriktirildiğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Hon *et al.* 1995; Ewart *et al.* 1999).

Bitki antifriz proteinlerinin yaprak apoplastında biriktirilmesinin önemli bir ayrıcalığı vardır. Apoplast bitkinin içsel bir çevresidir (Şekil 1.2) ve hücre çeperini de içine alan bitki hücrelerinin ekstraprotoplastik matriksi olarak tanımlanır (Dietz 1997). Bizim vücudumuz kan, lenf ve doku sıvısı gibi içsel bir çevreye sahip olduğu gibi, bitki hücreleri de apoplast adı verilen sıvı bir ortamla kuşatılır. Apoplast gelişme, beslenme, sinyal iletimi ve savunma gibi birçok 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 gelir. Apoplastın birçok önemli fonksiyonları içerisinde şunlar sayılabilir (Sakurai 1998; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Chikov and Bakirova 2004; Mutlu *et al.* 2009).

1. Apoplastik enzimler aracılığı ile polisakkarit, protein ve lignin gibi hücre duvarı moleküllerinin sentezi, yıkımı ve düzenlenmesi.
2. Ozon, soğuk, tuz ve sülfür dioksit gibi zararlı çevresel streslere 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.



Şekil 1.2. Düşük sıcaklığa maruz kalmış bir yaprakta simplastik bölgedeki suyun apoplastik bölgelere hareketi ile apoplastik bölgede buz oluşumu (Antikainen and Griffith 1997)

Bitki apoplastında birçok bileşiğin yanında bitkilerin strese cevabında önemli bir yeri olan antioksidan enzimlerin bulunduğu ve bu enzimlerin apoplastta reaktif oksijen türlerini (ROT) zararsız hale getirdikleri de tespit edilmiştir (Hernandez *et al.* 2000; Lin and Kao 2001; Minibaeva and Gordon 2003; Mutlu *et al.* 2009). Bilindiği gibi bitkiler bazı metabolik yolların düzensizliğinden ortaya çıkan reaktif oksijen türleri (ROT) olarak bilinen moleküllerin yıkıcı ve öldürücü etkilerini sınırlayabilmek için birçok savunma mekanizması bulundurlar (Navrot *et al.* 2007). ROT bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok reaktif moleküller olarak tanımlanabilir. ROT yüksek derecede reaktiftir ve hücreler için toksiktir, ayrıca proteinler, lipitler, DNA ve karbohidratlara zarar vererek hücre ölümüne neden olabilir (Noctor and Foyer 1998; Apel and Hirt 2004; Banu *et al.* 2009; Guo *et al.* 2009). ROT (veya serbest radikaller) arasında hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) gibileri sayılabilir. Hidrojen peroksit, çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal süreçlere aracılık eder (Neill *et al.* 2002; Bright *et al.* 2006; McInnis *et al.* 2006). Normal koşullarda ya da çeşitli streslere (soğuk ve donma, kuraklık, sel, patojen saldırılar, herbisit uygulamaları, radyasyon) maruz kalma sırasında hem kloroplast hem de mitokondri ROT üretir. Verdiği hasarların yanında düşük seviyelerdeki ROT abiyotik ve biyotik stres koşullarında antioksidan

genlerin ekspresyonunu aktive ederek hücrel savunma sistemini uyarabilir (Dixon and Paiva 1995; Grene 2002; Mittler 2006). Bitkiler, aşırı üretilen ROT bileşiklerine karşı hücrelerini oksidatif hasardan koruyan enzimatik olmayan antioksidan bileşikler ile birlikte, bunların normal formlarına dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimlere sahiptir (Mutlu 2005). Aşağıda hücreler için en yaygın ROT bileşikleri kısaca tanımlanacak ve bu bileşiklerin süpürülmesinde rol alan enzimatik antioksidan sistem hakkında kısa bilgiler verilecektir.

Reaktif oksijenler iki gruba ayrılırlar;

Radikaller: Tek elektron eksikleri nedeniyle başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine giren oksidanlardır. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) örnek olarak verilebilir (Neill *et al.* 2002).

Nonradikaller: Elektron eksikleri olmadığı halde başka moleküllerle radikallerden daha zayıf şekilde birleşebilen oksidanlardır. Hidrojen peroksit (H_2O_2) örnek olarak verilebilir (Neill *et al.* 2002).

Çizelge 1.1. Başlıca reaktif oksijen türleri (ROT)

Radikaller	Radikal olmayanlar
Superoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$)	Lipit hidroperoksit (LOOH)
Peroksil radikali ($RO_2^{\cdot}$)	Hipoklorik asit (HOCl)
Alkoksil radikali ($RO^{\cdot}$)	Ozon (O_3)
Hidroperoksil radikali ($HO_2^{\cdot}$)	Singlet oksijen (O_2^1)
Peroksinitrit radikali ($ONOO^{\cdot}$)	

Singlet Oksijen (O_2^1): Oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formudur. Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmadığı için radikal özelliği yoktur, fakat oksidan özelliği oldukça yüksektir (Foyer *et al.* 1997; Güler 2008). Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileşime girdiği zaman ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girmesi ile

peroksit radikalini oluşturur ve OH[•] kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Hücre zarlarının glikolipid, fosfolipid, sterol ve gliserid yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, aldehitler, hidroksi yağ asitleri ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluştururlar (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003a; Mutlu 2005).

Süperoksit anyonu (O₂^{•-}): Oksijene bir elektron aktarılmasıyla oluşur. Bu reaksiyon enzimatik olarak çeşitli organellerde meydana gelebilir. Bu radikal oldukça reaktiftir ve lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna sebep olur. Lipid peroksidasyonu, membran hasarı, hücrel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırıklarına sebep olduğu belirtilmiştir (Fridovich 1995). Hücrel koşullarda üretilen süperoksit, oksitleyici ve indirgeyici olarak davranıp aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom-c'ye veya bir radikale vererek tekrar oksijene yükseltgenir. Oksijenden daha oksitleyici olan süperoksit bir elektron daha alır ve peroksit anyonuna indirgenir. Süperoksit anyonu ayrıca, hidrojen peroksitle reaksiyona girerek çok daha toksik bir molekül olan hidroksil radikalini üretebilir. Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinen bu reaksiyon demir ve bakır gibi metallerin katalizörlüğünde oldukça hızlı gerçekleşir. Hücrel metabolik etkinlikler sonucunda üretilen süperoksit anyonunun oluşumu pek çok abiyotik ve biyotik stres faktörleri altında indüklenmektedir (Bowler *et al.* 1992; Baskin and Salem, 1997). Süperoksit anyonu, yüksek katalitik etkiye sahip süperoksit dismutaz (SOD) enziminin etkisiyle azaltılır. SOD tarafından katalizlenen bu reaksiyon dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılır (Halliwell 1984; Güler 2008).

Hidrojen peroksit (H₂O₂): Aerobik canlılarda süperoksitlerin katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan (SOD) tarafından katalizlenmesi ile oluşur. H₂O₂, oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur.

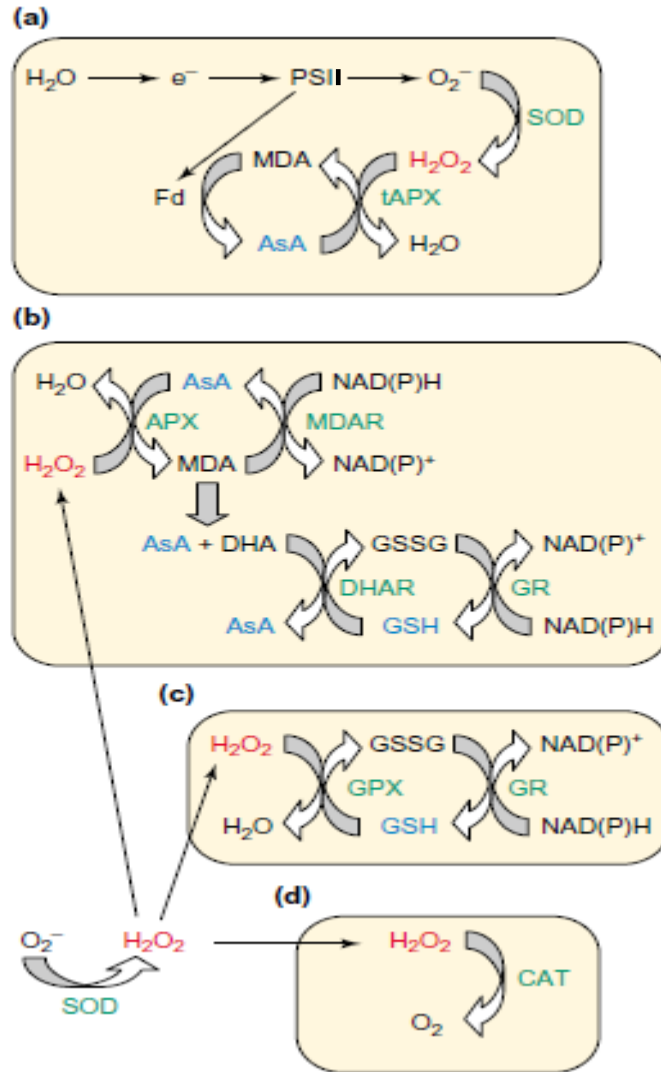


Süperoksitin oluştuğu yerlerde (peroksizomlar, elektron taşıma zinciri, plazma membranı, ekstraselüler matriks) önemli miktarda H_2O_2 de üretilir (Slesak *et al.* 2007). Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz. Aktif oksijen türleri arasında diğerlerine göre nispeten daha düşük toksisiteye sahip olan 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 ortamdaki uzaklaştırılması gerekir (Halliwell 1984; Güler 2008). Bu görevi öncelikle askorbat-glutatyon döngüsü ile yapar. Hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri tarafından su ve oksijen gibi ürünlere dönüştürerek yerine getirir (Hausladen and Alscher, 1993). Oksidatif streslere tolerans sağlamada bitkilerin bu enzimlerin hücresel seviyelerini düzenlenmesi oldukça önemlidir (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003a; Mutlu 2005).

Hidroksil radikali ($OH^\bullet$): Oksijen radikalleri içerisinde en aktif ve en toksik olanıdır. (Elstner 1982; Baskin and Salem 1997; Sigel and Sigel 1999; Kehler 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). $OH^\bullet$ biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif türdür, su dahil olmak üzere rastladığı her molekülle tepkimeye girebilir. Bu tepkimeler $OH^\bullet$ 'in 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. $OH^\bullet$ radikalının sebep olduğu biyolojik zararlardan birisi de lipid peroksidasyonudur, zincirin yapısını bozar ve geçirgenliğini artırarak hücre ölümüne sebep olabilir (Girotti 1985; Nishiyama *et al.* 1998; Maillard *et al.* 2007). $OH^\bullet$ nükleik asitlerle tepkimeye girerek baz

modifikasyonlarına, baz delesyonlarına ve zincir kırılmalarına neden olabilir (Getoff 2007; Lin *et al.* 2007).

Yukarıda tanımlanan ROT'lar hücrelerde elektrolit permeabilitesinin artmasına ve membran bütünlüğünün yok olmasına neden olurlar. Hücre içerisine kalsiyum ve sodyum gibi iyonların geçişi, hücrenin ATP'sini tüketmesine neden olarak enerji oluşturan mekanizmaları etkiler. İntrasellüler kalsiyum iyonlarındaki artış; protein ve lipidlerde daha fazla hasara neden olabilecek proteaz ve fosfolipazı aktive eder. Bu aynı zamanda DNA'da yapısal hasara ve hücre ölümüne neden olabilecek enzim inaktivasyonuna neden olabilir (Halliwell 1984). Diğer taraftan ROT'ların sebep olduğu membran lipidlerinin peroksidasyonu (LPO) doku hasarına neden olur. (Şimşek 1999). Çünkü lipidlerdeki doymamış yağ asitleri otooksidasyona eğilimlidirler. Otooksidasyon iki çift bağ arasındaki metilen grubunun çevresinden kolayca etkilenecek, hidrojen atomunun birini kaybetmesi ile oluşur. Hidrojen ayrılmasının ilk nedeni reaktif oksijen türleri hareketidir. ROT'lar direkt hasara neden olabildikleri gibi birbirlerini etkileyerek, en reaktif radikal olan hidroksil radikalini oluşturmakta ve doymamış yağ asitlerine etki etmektedirler (Wood and Smith 1991). Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerini yani Malondialdehiti (MDA) oluştururlar. Lipit peroksidasyonu ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkuş 1995). Lipit hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak reaktif olan aldehitler hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hasarı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar. MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, ancak lipit peroksidasyonunun derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple organizmada oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. MDA, tiyobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu çözeltinin absorbans değerlerinden LPO'nun derecesi saptanmaktadır (Yılmaz *et al.* 2003; Kuru 2007).



Şekil 1.3. Bitkilerde ROT uzaklaştıran metabolik yollar (a) Su-su döngüsü. Süperoksit dismutaz (SOD) O₂⁻'yi H₂O₂'ye çevirerek savunmanın ilk basamağı olarak görev alır (CAT) (b) Askorbat-glutasyon döngüsü (c) Glutasyon redüktaz (GR) döngüsü (d) Katalaz. CAT, askorbat peroksidaz (APX) ve GR'yi detoksifiye ederler. CAT'ın (d) tersine, APX ve GR döngüyü tekrar oluşturmak için bir askorbat (AsA) ve/veya bir glutatyon (GSH) gerek duyarlar (b-c). Bu döngü elektronları doğrudan NAD(P)H (b-c) ya da fotosentetik aygıtlardan (a) kullanırlar. ROT kırmızı, antioksidanlar mavi ve ROT uzaklaştıran enzimleri yeşil olarak gösterilmiştir (Mittler 2002).

GPX, glutatyon peroksidaz; GSSG, okside glutatyon DHA, dehidroaskorbat; DHAR, DHA redüktaz; Fd, ferrodoksin; MDA malondialdehid, MDAR, monodehidroaskorbat; MDA redüktaz; PSII, fotosistem II; tAPX, tilakoid bağlı APX.

Bitkilerde hücre zar ve organelleri ROT'ların zarar verici etkilerinden korumak için antioksidan savunma sistemleri oldukça önemlidir (Lee and Lee 2000). Antioksidanlar düşük konsantrasyonlarda oksidasyon yapabilen ve diğer bir substratın oksidasyonunu azaltan veya engelleyen maddelerdir (Şekil 1.3). Hücreleri zararlı ROT etkisinden

korumak için gereken yüksek verimli antioksidant savunma sistemleri tüm bitki hücrelerinde bulunur (Seppanen and Fagerstedt 2000). Antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemleri olarak sınıflandırılır (Hernandez-Nistal *et al.* 2002).

Enzimatik olmayan savunma sistemleri: Askorbat (AsA), glutatyon, karotenoid, α -tokoferol, antosiyanin, flavonoidlerdir.

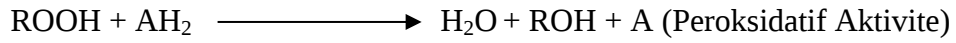
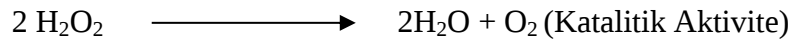
Enzimatik savunma sistemleri: Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) dır.

Süperoksit dismutaz (SOD) (E.C.1.15.1.1): Süperoksit radikalinin H_2O_2 'ye dönüşümünü katalizler. Aerobik organizmaların tüm hücrelerinde bulunur (Moller 2001). Ayrıca SOD'un bazı bitki türlerinin apoplastik alanlarında da var olduğu rapor edilmiştir (Vanacker *et al.* 1998b; Lyons *et al.* 1999).



SOD'un biri sitoplâzmada, diğeri mitokondride olmak üzere iki izoenzimi vardır. Ökaryotlardaki mitokondriyal SOD, karakteristik Mn^{+2} içeren Mn SOD olarak, sitoplazmadaki ise tamamen farklı yapıya sahip olup Cu^{+2} - Zn^{+2} iyonu ihtiva eden Cu/Zn SOD olarak bilinir. Bazı bakterilerde de Fe SOD olduğu saptanmıştır. SOD, süperoksitin parçalanmasını sağlayarak metallerin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşum riskini azaltır. (Bowler *et al.* 1992; Foyer *et al.* 1995; Van Camp *et al.* 1996; Apel and Hirt 2004). SOD antioksidan savunma ağında ana göreve sahiptir. Artan SOD aktivitesi ile oksidatif stres yüzünden meydana gelen zarardan korunmanın artışı birbiriyle bağlantılıdır (Hernandez-Nistal *et al.* 2002)

Katalaz (CAT) (E.C.1.11.1.6): Tabiatla oldukça yaygın dağılım göstermektedir. Aerobik organizmaların hepsinde omurgalılarda, omurgasızlarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunmaktadır (Bergmeyer and Grabl 1983). CAT, 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). CAT'ın görev aldığı reaksiyonlar aşağıdaki gibidir.



Peroksizomlarda bulunan CAT sitozolden difüzyonla peroksizomlara gelen H_2O_2 'yi ortadan kaldırır (Lukatkin 2002; Mittler 2002). Ancak CAT'ın hücreleri H_2O_2 'den koruma etkinliği oldukça sınırlıdır. Bunun nedeni, CAT'ın H_2O_2 'ye karşı ilgisinin düşük olması ve ışık varlığında inaktivasyona uğramasıdır (Prasad 1997). Siyanid, azid, süperoksit ve indirgenmiş glutatyon tarafından da katalaz aktivitesinin inhibe edildiği rapor edilmiştir (Fridovich 1986). Solunum zincirinde, oksijenin eksik indirgenmesinden oluşan H_2O_2 'yi O_2 'ye indirger (Chaudiere and Ferrari 1999). CAT'ın temel fonksiyonu, stres koşulları altında oluşan zararlı H_2O_2 'in H_2O ve O_2 'ya dönüşümünü sağlamak, hücreleri strese karşı korumak ve özellikle membranlarda oluşabilecek geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir. Zira H_2O_2 , singlet oksijen (O_2^1) ve hidroksil radikallerinin ($OH\cdot$) potansiyel kaynağıdır (Scandalios 1993; Chaudiere and Ferrari 1999).

Peroksidaz (POX) (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). Çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahip olan POX, bitkilerde, hücre çeperinde, vakuollerde, membrana bağlı ribozomlarda ve bitki dokularının ekstrasellular alanlarında büyük oranda bulunurlar. POX, elverişsiz çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenleyen en önemli

koruyucu enzimlerden birisidir (Bakardjieva and Christov 1996). Molekül ağırlıkları 35-100 kDa arasında değişmektedir. POX'lar hidrojen vericisi olarak birçok organik ve inorganik substratı (AH₂) kullanarak H₂O₂'yi temizlerler. Aşağıdaki reaksiyonu katalizlerler.



Bitkisel POX; yapraklarda, yaralanan gövdelerde, kotiledon yapraklarda, çiçek saplarında bulunmuş ve nukleus, mitokondri, ribozom, hücre membranları ve hücre dışında (apoplast) lokalize olduğu belirlenmiştir (Bergmeyer and Grabl 1983; Banci 1997; Hamed *et al.* 1998; Kim *et al.* 2000; Tasgın *et al.* 2006; Mutlu 2009). Peroksidazlar, kloroplast, sitosol ya da peroksizomlarda yerleşim gösteren ve elektron vericisi olarak askorbatı kullanan askorbat peroksidaz (APX) ile sitosol ya da vakuolde yer alan ve elektron vericisi olarak glutatyon peroksidaz (GPX) ya da guaiakol ve diğer fenolik bileşikler kullanan guaiakol peroksidaz (GuPX) izoenzimleri olmak üzere başlıca üç gruba ayrılmaktadır. Mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, çeşitli stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenen POX 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).

Askorbat Peroksidaz (APX) (E.C 1. 11. 1. 11): Hidrojen peroksiti parçalarken substrat olarak askorbatı kullanan enzimlerdir. Yüksek bitkiler, kamçılılar, algler, gibi birçok organizmada ROT'a karşı gerçekleştirilen savunmada önemli role sahip olduğu belirlenmiştir. APX; mitokondri, kloroplast, sitozol, apoplast ve peroksizomlarda bulunan ve H₂O₂'yi suya indirgeyen askorbat glutatyon döngüsünün ilk enzimidir. Bu reaksiyon sonucunda askorbat iki molekül monodehidroaskorbata (MDHA) dönüşür. MDHA monodehidroaskorbat redüktaz tarafından tekrar askorbata dönüştürülür (Kumar *et al.* 2011). APX'in H₂O₂'ye yüksek afinitesi ve askorbat glutatyon döngüsünün hemen hemen her hücresel yapıda bulunması, bu döngünün ROT seviyesinin kontrolünde hayati önem taşıdığını göstermektedir (Mittler 2002). Askorbat peroksidazlar yaygın şekilde çalışılan guaiakol peroksidazlara benzemesine rağmen H⁺ vericisi olarak

askorbata olan yüksek spesifikliklerinden dolayı aralarında farklılıklar vardır (Nakano and Asada 1987; Güler 2008).

Glutasyon Redüktaz (GR) (EC 1. 6. 4. 2): Elektron verici olarak NADPH'ı kullanan oksitlenmiş glutasyonun (GSSG), glutatyona (GSH) indirgenmesini katalizleyen enzim glutasyon redüktaz enzimidir (Ranieri *et al.* 2005; Yannarelli *et al.* 2007).



GR'nin hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda bulunduğu belirlenmiş olup (Creissen *et al.* 1994) ilk defa eritrositlerde ve mayalarda tespit edilmiştir (Meldrum and Tarr 1935). GR hem Gimnospermiler hem de Angiospermilerin dahil olduğu birçok bitkide de çalışılmıştır (Creissen *et al.* 1994). GR, oksidatif stres sırasında askorbat havuzunu indirgenmiş halde tutmada önemli bir role sahiptir, bu nedenle de inaktivasyonu H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılmasını sınırlar (Foyer 1991). GR askorbat glutasyon döngüsünde GSH/GSSG oranını yüksek tutarak hücreleri oksidatif hasara karşı korumada görevli anahtar enzimlerden biridir (Foyer and Noctor 2005). GR diğer enzimlerle birlikte H_2O_2 'nin radikal özelliğinin ortadan kaldırılmasında görev alır. Oksitlenmiş askorbik asiti (dehidroaskorbat) tekrardan askorbik asite indirgeyen dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), substrat olarak GSH'ı kullanmakta ve reaksiyon sonucu GSSG oluşmaktadır. Oluşan GSSG, GR enzimiyle tekrardan GSH'a indirgenir ve böylece dehidroaskorbat redüktaz enziminin substratı yeniden oluşur. Ayrıca GR enzimi GSSG'yi GSH'a indirgerken, NADPH'ı kullanmakta ve böylece CO_2 fiksasyonu sınırlandığı durumlarda, NADPH/NADP⁺ oranının dengelenmesine yardımcı olmaktadır. Bu nedenle GSSG'nin GSH'a indirgenmesi, oksidan temizlenmesinde önemli bir basamaktır ve oksidatif strese karşı savunmada GR'nin önemini ortaya koymaktadır (Aono *et al.* 1995; Creissen *et al.* 1996; Güler 2008).

Doğada birçok bakteri, kutup bölgeleri, soğuk su, tuzlar, kurak kaya yüzeyleri, çöller, deniz dipleri gibi olumsuz çevrelere uyumlu bir şekilde üreyebilirler. Mikroorganizmaların yaşayabildiği çeşitli çevresel faktörler arasında doğrudan doğruya

hücrelerin metabolizmasını etkileyen sıcaklık özellikle dikkat çekmektedir. Mikroorganizmalar yüksek, orta ve düşük sıcaklıkta yaşayabilme kabiliyetlerine göre psikrofiller, mezofiller ve termofiller olarak 3 gruba ayrılırlar (Arda 2000).

Psikrofil (soğuk seven) Bakteriler: Düşük sıcaklıklarda yaşayabilen ve bunu tolere etmek için yüksek adaptasyonlara sahip bakterilerdir. (Üreme sıcaklıkları 0-4°C arasında olanlar). Bu bakterilerin enzimleri -5°C ile +20°C arasında aktivite gösterebilir. Mezofil (ılık seven) Bakteriler: Üreme sıcaklıkları 15-45°C arasında olan bakterilerdir. Termofil (sıcak seven) Bakteriler: Üreme sıcaklıkları 45-70°C arasında olan bakterilerdir.

Psikrofil bakteriler 20°C'nin altında ya da üstündeki sıcaklıklarda hızlı üreyip ürememelerine bakılarak zorunlu ve fakültatif olmak üzere 2 gruba ayrılırlar. Birçok araştırmacıların çeşitli çevrelerden psikrofil mikroorganizma izole ettikleri bildirilmiştir. Bu çevreler; okyanuslar, denizler, topraklar, balıklar, et, süt, sebze gibi ortamlardır (Graumann 1996).

Dünya biyosferinin %85'ten daha fazla bir kısmı yılın büyük bir bölümünde 5°C'den daha düşük sıcaklığa sahipken, %75'ten daha fazla kısmı ise sürekli soğuktur (Baross and Morita 1978). Bundan dolayı psikrofil ve psikotolerant bakteriler bakteriyel çeşitliliğin önemli bir bölümünü oluştururlar. Bu bakteriler zor iklimsel koşullarda yaşayabilme yetenekleri nedeniyle soğuk adaptasyonunun moleküler mekanizmasının anlaşılmasında model organizmalar olarak kullanılmaktadır.

Soğuğa dirençli mikroorganizmalar da düşük sıcaklıktaki ortamlarda gelişebilmek için düşük sıcaklıkta soğuk şok proteinini (Csps (cold shock proteins=soğuk şok proteinleri) veya Caps (cold shock acclimation proteins=soğuk şoku alıştırtma proteinleri) sentezlerler (Gerday and Glansdorff 2007; Margesin *et al.* 2008).

Sıcaklığın düşmesi esnasında organizma sitoplazmik membranın kompozisyonunu değiştirir ve soğuk şok proteinler (Csps) sentezlenir. Organizmaların normal proteinleri

soğuk stresi altında azalırken, Csp gibi bazı özel proteinler adaptasyona kadar çoğalır (Moon *et al.* 2009). Bu proteinlerin transkripsiyon, translasyona katıldığı da bilinmektedir (Mega *et al.* 2010). Bugüne kadar Csp çoğunlukla *E. coli* (CspA, CspI) ve *Bacillus subtilis*'den (CspA, CspB ve CspD) elde edilmiştir. Bunlar arasında CspA, CspB, CspE, CspG ve CspI soğuk adaptasyon fonksiyonlarının modülasyonu ile bağlantılıdır (Schmid *et al.* 2009). *E. coli*'deki CspA ilk belirlenen soğuk şok proteindir.

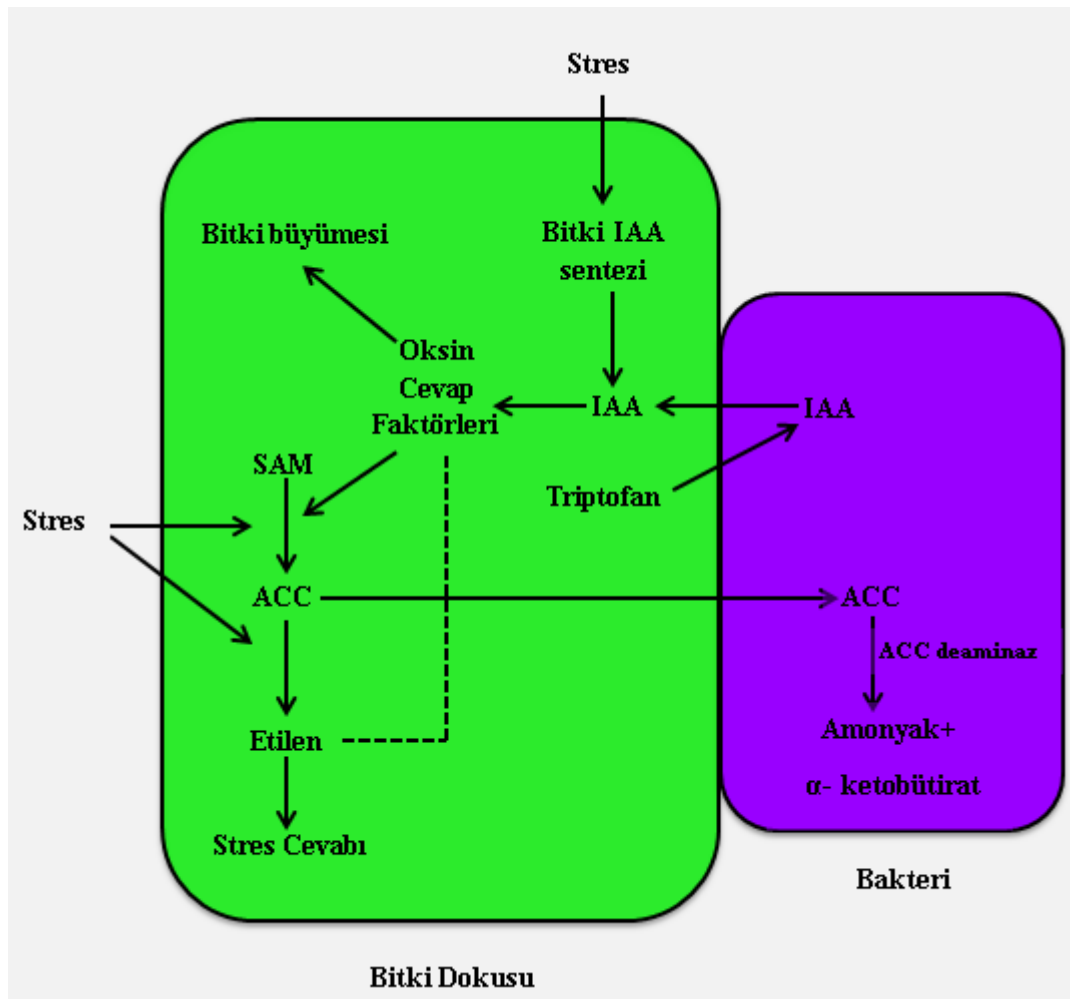
Bitkilerle simbiyotik olarak yaşayan pek çok bakterinin bitkilerin kök rizosfer, rizoplan ve yapraklarında yaşayarak bitkiye önemli kazanımlar sağladığı birçok çalışmada rapor edilmiştir. Bunlar “Bitki Büyümesini Artıran Bakteriler” (PGPB) “Plant Growth Promoting Bacteria“ olarak adlandırılmaktadır. Bu bakteriler son yıllarda zirai alanlarda biyo-gübre olarak kullanılmaya başlanmıştır. Sentetik gübrelerin; toprak, bitki, çevre ve hatta insan sağlığında önemli sorunlara sebep olduğu bariz bir şekilde bilinmektedir. Buna karşılık PGPB’li biyo-gübrelerin bu sorunları azaltacağı ve doğal çevrelerin korunmasına önemli katkı yapacağı ileri sürülmektedir. PGPB’ler azot fiksasyonu, bitkisel hormon üretimi, bakteriyel siderofor üretimiyle demir ve benzeri elementlerin alınımını sağlama, fosfat çözme, stres toleransı sağlayıcı bileşikler sentezleme ve bitki patojenlerini baskılama gibi etkilerle bitki gelişimini artırmaktadırlar. Özellikle önemli kültür bitkileriyle yapılan çalışmalarda bitki gelişim ve verimi üzerine arttırıcı etkileri ortaya konulmuştur (Selvakumar 2007; Turan *et al.* 2013).

Bugün bitki gelişimini teşvik eden bakteri cinslerinin; *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Aereobacter*, *Alcaligenes*, *Artrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Chromatium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* ve *Serratia* olduğu belirlenmiştir (Bashan and de-Bashan 2005). Endofitik PGPB’ler yaprak dokularında tespit edilmiştir. PGPB’nin bitki büyümesini teşvik ettiği mekanizmalar tamamen anlaşılmamıştır. Ancak bu konuda bazı önemli veriler elde edilmiştir. Örneğin; oksin (Egamberdiyeva 2005), sitokinin (Garcia de Salamone *et al.* 2001), giberellin (Gutierrez- Manero *et al.* 2001) gibi bitki hormonlarının üretilmesi ve etilen üretiminin inhibisyonu (ACC deaminaz

aktivitesiyle) (Glick *et al.* 1995), asimbiyotik N₂ fiksasyonu (Sahin *et al.* 2004), inorganik fosfatın çözünürleşmesi ve organik fosfat ve diğer besinlerin mineralizasyonu bunlardan en önemlileridir (Jeon *et al.* 2003). PGPB aynı zamanda fitopatojenik mikroorganizmaların (bakteriler, mantarlar ve virüsler) zararlı etkilerini önleyerek bitki büyümesini dolaylı olarak teşvik ederler (Van Lonn and Glick 2004). PGPB, ürettiği ACC deaminaz enzimi ile stres koşullarının bir sonucu olarak sentezlenen etilen miktarını azaltarak bitkide aşırı etilen üretiminin yıkıcı etkilerine karşı bitkiye direnç kazandırmaktadır (Burd *et al.* 1998; Grichko *et al.* 2000; Wang *et al.* 2000; Grichko and Glick 2001; Mayak *et al.* 2004a,b; Kausari and Shahzad 2006; Nadeem *et al.* 2007; Arshad *et al.* 2008).

Bilindiği gibi, bitkiler stres şartlarına maruz kaldıklarında stres etileni olarak bilinen hormonu üretirler. Etilen bütün bitkiler tarafından üretilen bir hormondur ve çeşitli stres sinyallerini indükler (Bleecker and Kende 2000; Saleem *et al.* 2007). Ancak aşırı etilen üretimi tohum çimlenmesini veya bitki büyümesinin engelleyebilir. Etilen ve diğer bitki hormonları arasında kompleks bir etkileşim ağı vardır ve bitkiden bitkiye değişiklik gösterir. Farklı stres şartlarında üretilen etilen normal biyosentez yolu ile sentezlenir. Metiyonin amino asiti etilenin öncü maddesidir. Metioninin etilene dönüşümünde rol oynayan ara bileşik 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asittir (ACC). ACC'nin parçalanmasını sağlayan ACC deaminaz (ACCD) enzimi ilk olarak 1978 yılında keşfedilmiştir (Honma and Shimomura 1978). Birçok bakteri ve fungus tarafından sentezlenmektedir (Klee *et al.* 1991; Glick *et al.* 1995; Bernard *et al.* 2007). Şekil 1.4'te görüldüğü gibi birçok bitki büyüme ve gelişmesini teşvik edici bakteriler (PGPB) ACC deaminaz'ı üretirler ve bu sayede üretilen etilen seviyesini azaltabilirler. Stres şartlarında bakterilerce üretilen ACC deaminaz enzimi, ACC'nin amonyak ve α -ketobütirata ayrışmasını katalizler (Hontzeas *et al.* 2004; Glick 2005) Bu türlerin birçoğundan ACC deaminaz geni izole edilerek özellikleri belirlenmiştir. Örneğin; Gram-negatif bakteriler: *Enterobacter cloacae*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Rhizobium leguminosarum*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia phytofirmis*, *Variovorax paradoxus*, *Methylobacterium fujisawaense*, *Cronobacter sakazakii*, *Mesorhizobium sp.* *Haererehalobacter sp.*, *Halomonas sp.* bu aktiviteye sahiptirler

(Belimov *et al.* 2001; Holguin and Glick 2001; Ma *et al.* 2003; Hontzeas *et al.* 2004; Sessitsch *et al.* 2005 Madhaiyan *et al.* 2006). Gram-pozitif bakteriler de ACC deaminaz aktivitesi içerirler. Bunlardan en yaygın olanları, *Rhodococcus sp.*, *Brevibacterium iodinum*, *Bacillus licheniformis*, *Zhihengliuella alba*, *Micrococcus sp.* *Brachybacterium saurashtrense*, *Brevibacterium casei* bakterileridir (Belimov *et al.* 2002; Siddikee *et al.* 2011).



Şekil 1.4. Hem ACC deaminaz üreten hem de IAA sentezleyen PGPB'ler için şematik bir model (Glick 2014)

ACC deaminaz aktivitesine sahip bakterilerle simbiyotik yaşayan bitkilerin, laboratuvar koşullarında tuzluluk (Sergeeva *et al.* 2006) aşırı su (Grichko and Glick 2001a), metal kirliliği (Grichko *et al.* 2000; Nie *et al.* 2002; Stearns *et al.* 2005) ve bitki patojenleri

(Robison *et al.* 2001b) gibi bazı stres koşullarına karşı dayanıklılık gösterdiği görülmüştür.

Bu çalışmada kültür bitkilerinden biri olan fasulye (*Phaseolus vulgaris* cv. Elkoca-0.5) kullanılmıştır. Fasulye, gerek dünya ve gerekse ülkemiz tarımında önemli bir yere sahiptir. Dünyada, 2013 yılı verilerine göre, toplam 66.7 milyon ha alanda 61.2 milyon ton yemeklik baklagil üretimi yapılmaktadır. Üretim miktarları dikkate alındığında, fasulye 23.1 milyon ton üretim ve %37.7'lik pay ile yemeklik baklagiller içerisinde ilk sırada yer almaktadır (FAO 2013). Ülkemizde ise toplam yemeklik baklagil ekim alanı 797.835 ha olup, 1.139.061 tonluk üretim gerçekleştirilmektedir (FAO 2013). Fasulye 84.763 ha ekim alanı ve 195.000 ton üretim ile ülkemizde nohut ve mercimekten sonra en fazla ekim alanı ve üretim miktarına sahip yemeklik baklagil bitkisidir (Elkoca ve Çınar 2015). Ülkemizin en soğuk ve yüksek bölgesinde yer alan Erzurum'da fasulye ekiliş alanı (1.140 ha) ve üretiminin (2.174 ton) düşük seviyelerde kalmasının ana nedeni, bölgede hüküm süren iklim şartlarıdır (Elkoca ve Çınar 2015). Fasulye tohumu 15-20°C'de çimlenmekte, 15°C'nin altında yavaşlamakta, 10°C'nin altında ve 35°C'nin üstünde ise çimlenme çok az olmakta veya hiç olmamaktadır. Fasulye bitkisi ile yapılan bir çalışmada metil jasmonat veya genistein ile *Rhizobium leguminosarum*'un bitkiye inokulasyonu ile nodulasyon, nitrojen fiksasyonu ve büyüme üzerine düşük kök sıcaklığının olumsuz etkilerinin üstesinden gelinmiştir (Kazem *et al.* 2005). Düşük kış sıcaklığı olan Akdeniz Bölgesinin otlak bitkilerinde özellikle de *Medicago* bitkilerinde büyüme gecikir. *Rhizobium* suşlarının inokulasyonu ile düşük sıcaklıkta bitkide büyüme ve nitrojen fiksasyonu sağlanmıştır (Sultan *et al.* 2001). Düşük sıcaklığa toleranslı *Bradyrhizobium japonicum* suşları soğuk ilkbahar bölgesinde yetiştirilen soya fasulyesinde nodulasyonu ve nitrojen fiksasyonunu iyileştirmiştir (Zhang *et al.* 2003).

PGPB hücrelerde birçok farklı mekanizmayı düzenleyerek bitkinin stres toleransını arttırabilmektedir. Ancak, sınırlı sayıdaki çalışmada, soğuğa toleranslı yabancı bitkilerden izole edilen psikrofil PGPB'lerin bazı bitkilerde düşük sıcaklık toleransını arttırabildikleri gösterilmiştir (Selvakumar 2008). Literatür araştırmasında Ülkemizde hiçbir yabancı bitkinin yaprak apoplastından bakteri izolasyonu yapılmadığı ve ayrıca bir

kültür bitkisine inokule edilerek, stres cevabının biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmalarının çalışılmadığı tespit edilmiştir.

Bu nedenle, soğuğa dirençli yabani bitkilerin yaprak apoplastından izole edilen psikrofil bakterilerin, düşük sıcaklık stresine duyarlı kültür bitkilerinde soğuk stresi toleransını artırabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, Erzurum İli içerisinde ve Erzincan İlinde yaşayan soğuğa oldukça dirençli bazı yabani ve kültür bitkilerin yaprak apoplastından bakterilerin izolasyonunu yapmayı ve bu bakterilerin fasulyede (*Phaseolus vulgaris*) soğuk stresi toleransının artırılmasında kullanım potansiyelini araştırma amaçlanmıştır. Çalışma iki aşamadan oluşmuştur. İlk olarak öncelikle seçilen bitkilerin yaprak apoplastından bakteriler izole edilmiş ve izole edilen bakterilerin teşhisleri yapılmıştır. Daha sonra bunların bazı karakteristik özellikleri belirlenmiştir. İkinci olarak ise elde edilen bakteri izolatları fasulye yapraklarına, soğuk stresi öncesinde, inokule edilmiştir. İnokule edilmiş ve edilmemiş (kontrol) bitkiler soğuk stresine maruz bırakıldıktan sonra, bitkilerde bazı fizyolojik ve biyokimyasal parametreler değerlendirilmiştir. Bunlar arasında öncelikle kuru ağırlık, klorofil miktarı, canlılık testi (iyon sızıntı testi) ve lipid peroksidasyon seviyesi deneyleri yapılarak bakteri izolatları içinde soğuk stresi toleransını artıranlar seçilmiştir. Seçilen bu izolatların hangi mekanizmaları harekete geçirerek etkili olduğunu belirlemek için bitkide antioksidan sistem parametrelerinden antioksidan enzimlerin aktiviteleri de değerlendirilmiştir. Diğer taraftan çalışmada bakterilerin bitki üzerinde bu etkiyi nasıl yapmakta olduğu da aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bunu belirlemek için olumlu etki yaptığı belirlenen PGPB'lerin ekstrasellüler ortama salgıladıkları proteinlerin profilleri belirlenmiştir. Çalışmada ülkemiz içinde ilk kez yabani bir bitkiden izole edilen apoplastik bakterilerin çalışılmasıyla, bilim dünyasına ve ülkemize kazanımlar sağlanması, PGPB uygulamasıyla fasulyede soğuk stresi cevabının biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmalarının anlaşılmasına katkı yapılması ve bu bakteriler içerisinde ticari değeri olabilenlerin patentinin alınması en önemli hedefler olarak değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Literatürde düşük sıcaklığın bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak bakterilerin bitkilerde düşük sıcaklığa tolerans sağlamadaki etkisi ile ilgili oldukça az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışma bu açıdan literatürdeki önemli bir boşluğu dolduracak niteliktedir.

Soğuğa dayanıklı bitkilerin soğuk stresine karşı tolerans sağlamak için özel mekanizmaların varlığı birçok araştırmacı tarafından ileri sürülmüştür (Griffith 1997; Hoshino 1999; Ewart 1999; Yu and Griffith 2001; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşgın *et al.* 2006; Mutlu 2009; Esim 2011). Kışlık bitkilerde bir aklimasyon (uyum) periyodundan sonra soğuk toleransının arttığı pek çok çalışmada bildirilmiştir (Jarillo 1994; Close 1997; Wisniewski 1999; Mutlu 2009; Esim 2011). Bu periyod, birçok farklı mekanizma ile ve düşük sıcaklıkla birlikte yeni proteinlerin birikimini de sağlar. Bu proteinlerin bazıları, donmadan koruyucu kriyoproteinler, kinaz regülâtörleri, dehidrin içerenler ve intraselüler olanlar olarak bilinmektedir (Jarillo 1994; Close 1997; Wisniewski 1999). Stres yanıtı düşük sıcaklıkta çok daha aktiftir. Bunun nedeni bu sıcaklıkta soğuk şok protein (Csp) olarak adlandırılan proteinlerin soğuk koşullara bağlı olarak transkripsiyon ve translasyon seviyesinin artmasıdır (Khan *et al.* 2003). Soğuğa dirençli mikroorganizmalar da düşük sıcaklıktaki ortamlarda gelişebilmek için düşük sıcaklıkta soğuk şok proteinini (Csps (cold shock proteins=soğuk şok proteinleri) veya Caps (cold shock acclimation proteins=soğuk şoku alıştırma proteinleri) sentezlerler (Gerday and Glansdorff 2007; Margesin *et al.* 2008). Organizmaların normal proteinleri soğuk stresi altında azalırken, Csp gibi özel proteinler soğuğa adaptasyon sürecinde çoğalır (Moon *et al.* 2009). Ayrıca soğuğa karşı dayanıklılığın kazanılmasında artan antioksidan savunma sistemlerinin de önemli bir rolü olduğu çok sayıda araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Yang *et al.* 2001; Posmyk *et al.* 2005; Taşgın *et al.* 2006; Morsy *et al.* 2007; Turhan 2012). Soğuğa tolerans olarak ortaya çıkan bu cevap mekanizmalarının tümü, bitkilerde soğuk stresi esnasında donma hasarını azaltmasını, bitki apoplastında donmanın kontrol altına alınmasını (buz nükleasyon aktivitesi) ve düşük sıcaklıkla bozulan antioksidan sistemin düzenlenmesi ile birlikte bitkinin soğuk

zararından kurtulmasını amaçlamaktadır. Bu sayılan soğuğa cevap mekanizmaları ile ilgili daha önce yapılmış olan çalışmalar ve bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

Sala (2000), mandalina meyvesini düşük sıcaklık şartlarına maruz bırakmış ve bitkide donma hasarına bakmıştır. Kontrol şartlarındaki bitkilerde donma hasarı düşükken, düşük sıcaklık muamelelerine maruz kalan bitkilerde ise donma hasarının arttığı tespit edilmiştir. Kışlık çavdar, karalahana ve kışlık buğday ile yapılan çalışmalarda, bitkiler bir aklımasyon periyodu boyunca düşük sıcaklıklarda yetiştirilmiş düşük sıcaklıklara aklime olan bitkilerde, aklımasyon yapılmayan kontrol bitkilerine göre, donma hasarının azaldığı tespit edilmiştir (Marentez *et al.* 1993; Atıcı and Nalbantoğlu 1999a; Taşgın *et al.* 2003). Düşük sıcaklık stresine maruz bırakılmış arpanın iki farklı çeşidiyle yapılan bir çalışmada her iki varyetede de donma hasarının azaldığı gözlenmiştir (Mutlu *et al.* 2013). Düşük sıcaklığa hassas olan mısırın 14, 21 ve 28 günlük yapraklarında düşük sıcaklık uygulaması kontrole göre donma hasarını artırmış ve donma daha erken derecelerde başlamıştır (Esim 2011). Olgun *et al.* (2005) ve Taulavuori *et al.* (2005) yapmış oldukları çalışmalarda bitkilere mineral uygulamasının bitkilerde donma hasarını azalttığını göstermişlerdir.

Bitkilerin çevresel streslere karşı tolerans kazanmasında bakterilerin de önemli rol aldığı yapılan birçok çalışmada belirlenmiştir. Bitki büyüme ve düzenleyici bakteriler (PGPB) çevresel streslerin zararlı etkilerinden bitkileri koruduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Enebak *et al.* 1997; Glick *et al.* 1997; Timmusk and Wagner 1999). Bitki büyüme ve düzenleyici rizobakteriler (PGPR) bitki büyümesini artırır ve patojenler tarafından neden olan hastalığa duyarlılığı azaltır (Kloepper and others 2004a; Van Lonn and Glick 2004). Düşük kış sıcaklığı olan Akdeniz Bölgesinin otlak bitkilerinde özellikle de *Medicago* bitkilerinde büyüme geciktiği ve *Rhizobium* suşlarının inokulasyonu ile düşük sıcaklıkta bitkide büyüme ve nitrojen fiksasyonunun arttığı gözlenmiştir (Sultan *et al.* 2001). Düşük sıcaklığa toleranslı *Bradyrhizobium japonicum* suşlarının soğuk ilkbahar bölgesinde yetiştirilen soya fasulyesinde nodülasyonu ve nitrojen fiksasyonunu iyileştirdiği tespit edilmiştir (Zhang *et al.* 2003). *Cucurbita pepo*'dan izole edilen PGP

Serratia marcescens bakterisi düşük sıcaklıkta yetiştirilen buğday tohumlarına inokule edilmiş ve soğuğa tolerans sağladığı görülmüştür (Selvakumar 2007). Himalaya bölgesinin yüksek rakımlı topraklarından soğuğa toleranslı PGP *Exiguobacterium acetylicum* bakteri suşu izole edilmiş ve buğday tohumlarına inokule edilmiştir. Sonuçta buğday bitkisinin büyümesinde olumlu etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Selvakumar *et al.* 2010). Başka bir çalışmada da PGP *Pantoea dispersa*'nın Himalaya bölgesindeki subalpin topraklarından izole edildiği ve soğuğa tolerans sağladığı gözlenmiştir. Ayrıca bu bakteri izolatu soğuk ortamlarda yetişen buğdaya aşılması ile büyüme ve gelişme seviyesinde istenen değerlerin elde edilebileceği sonucuna varılmıştır (Selvakumar 2008). Sentetik kimyasalların yerine bitkiye besin sağlamak için PGPB'nin kullanıldığı çalışmalarda bulunmaktadır. Çilek ile yapılan bir çalışmada uygulanan PGPR bakterilerinin bitki büyümesini artırdığı gözlenmiştir (Eşitken 2010). Şeker pancarı, arpa (Çakmakci *et al.* 2001) ve domates (Turan *et al.* 2004) ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar gözlenmiştir. Turan *et al.* 2013 tarafından yapılan bir çalışmada PGPR bakterileri buğday ve arpaya inokule edilmiş ve donma hasarının azaldığı gözlenmiştir. Sıcaklığın düşük olduğu Himalaya topraklarından izole edilen psikotolerant *Pseudomonas* suşları buğday tohumlarına inokule edilmiş ve soğuk stresinin azaldığı gözlenmiştir (Mishra *et al.* 2011). Yapılan bir başka çalışmada düşük sıcaklıktaki asma bitkisine inokule edilen *Burkholderia phytofirmans* suşları donma sıcaklığında elektrolit kaçağını düşürdüğü gözlenmiştir (Barka *et al.* 2006). Himalaya bölgesindeki yalancı iğde rizosferinden izole edilen soğuğa toleranslı mayanın (*Rhodotorula sp.*) stresi tolere ettiği gözlenmiştir (Mundra *et al.* 2011). Kuzeybatı Hindistan Himalaya Dağları'nda soğuk şartlarda yetiştirilen *Amaranthus* bitkisinin rizosferinden PGPR bakterileri izole edilmiş ve buğday tohumlarına inokule edildiğinde bitki büyümesini düzenlediği gözlenmiştir (Mishra *et al.* 2009). Yapılan bir diğer çalışmada kuraklık stresi altındaki mısır bitkisine *Pseudomonas spp.* inokule edilmiş ve stresin azaldığı gözlenmiştir (Sandhya *et al.* 2010). Bir başka çalışmada da fasulye bitkisine *Paenibacillus polymyxa* ve *Rhizobium tropici* bakterileri uygulanmış ve kuraklık stresinin azaldığı gözlenmiştir (Figueiredo *et al.* 2008).

Literatürde bitki dokularında apoplastik proteinlerin suyun donma noktasını düşürme ve buz oluşumunu kontrol edebilme potansiyeli olarak bilinen buz nükleasyon aktivitesi üzerine düşük sıcaklığın etkisi ile ilgili çok sayıda araştırma vardır. Düşük sıcaklık stresine maruz bırakılmış arpanın (*Hordeum vulgare*) iki farklı çeşidiyle yapılan bir çalışmada her iki varyetede de buz nükleasyon aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Mutlu *et al.* 2013). Düşük sıcaklığa hassas olan 14, 21 ve 28 günlük mısır yapraklarında düşük sıcaklık uygulaması tüm günlerde apoplastik bölgedeki proteinlerin buz nükleasyon aktivitelerini kontrol grubuna göre önemli oranlarda düşürmüştür (Esim 2011). Kışlık ve yazlık çavdar ile buğday, kışlık arpa, karalahana, bezelye, mısır yapraklarının apoplastik bölgelerinde (ekstrasellüler 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; Taşğın *et al.* 2003; Esim *et al.* 2011). Bu bitkilerden, kışlık çavdar, kışlık buğday, karalahana ve mısır 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; Taşğın *et al.* 2003; Esim *et al.* 2011).

Bazı bitkilerde bulunan bakteriler buz nükleasyon aktivitesini (INA) düşürücü etkiye (donma noktasını artırma) sahiptir ve bu bakteriler buz nükleasyon proteinleri (INPs) üretirler. Bunlar sıfırın altındaki sıcaklıklarda kristalleşmeye neden olurlar. Bu bakterilerin çoğunun bitki patojeni olduğu düşünülür, bunların oluşturduğu buz dokulara zarar verebilir. INPs 3 farklı cinse (*Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas*) ait 10 bakteri türünde görülmüştür; (Kawahara *et al.* 2002). INA bakterileri kurbağa (*Rana sylvatica*) bağırsağında (Lee *et al.* 1995), kara salyangozu *Helix pomatia* (Nicolai *et al.* 2005), *Geukensia demissa* yumuşakçasının solungaçlarında (Loomis and Zinser 2001) bulunmuştur. INPs'den farklı olarak böcek antifiriz proteinlerinin (AFP) yanı sıra balık antifiriz glikoproteinlerinin bakteriyel INA'yı inhibe ettiği bildirilmiştir (Morreale *et al.* 1988; Duman *et al.* 2001). Yapılan bir çalışmada çim AFP'nin bakteriyel INA'lara karşı savunma gösterdiği gözlenmiştir (Tomalty *et al.* 2014). Kolorado patates böcekleri ile yapılan bir çalışmada, kışın bu böceklerin bağırsaklarında bakteriyel buz nükleasyon

aktivitesi gözlenmiştir, bu bakteriyel INA'lar kışın toprak sıcaklığını azalttığı ve buz nükleasyon aktivitesine sahip olan bakterilerle beslenen böceklerin ölüm olasılığını artıracığı belirtilmiştir (Castrillo *et al.* 2001).

Bitkilerin apoplastik bölgelerindeki antioksidan enzimlerin strese cevabın düzenlenmesinde önemli rollere sahip olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Keles and Oncel 2002; Janda *et al.* 2003; Taşgın *et al.* 2006; Milyutina *et al.* 2008; Mutlu *et al.* 2009). Bitkilerde antioksidan enzim sisteminin önemli bir elamanı olan süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitelerine etki eden faktörler (tuz, patojen, soğuk, sıcaklık, kuraklık ve su stresi) bu anlamda en çok çalışılan enzimlerdir.

Çeşitli bitkilerde soğuğa karşı dayanıklılığın kazanılmasında artan antioksidan savunma sistemlerinin önemli bir role sahip olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (Yang *et al.* 2001; Posmyk *et al.* 2005; Morsy *et al.* 2007; Esim 2011). Kışlık çavdarla yapılan bir çalışmada 5 haftalık soğuğa uyum süresi sonunda yapraklardaki SOD aktivitesinin kontrollere göre arttığı belirlenmiştir (Streb *et al.* 1999). SOD aktivitesini aşırı derecede arttırabilen mutant pamuk bitkilerinde SOD aktivitesinin düşük sıcaklık uygulaması sonucu kontrole göre 3 kat arttığı gözlenmiştir (Kornyeyev *et al.* 2001). Sibirya'da çamlarda (*Pinus sylvestris*) rizosfer sıcaklığının düşmesi ile diğer antioksidan enzimlerle birlikte SOD enziminin de düştüğü belirlenmiştir (Milyutina *et al.* 2008). Kavak ağaçları ile yapılan bir çalışmada düşük sıcaklığın SOD aktivitesini artırdığı belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2007). Mutlu 2009 tarafından yapılan bir çalışmada düşük sıcaklığın arpanın hassas ve dayanıklı iki çeşidinde de apoplastik SOD aktivitesini düşürdüğü belirlenmiştir. Düşük sıcaklığa hassas olan mısırın yapraklarında hem 14 hem de 21 günlük bitkilerin apoplastik SOD aktivitesinde artış gözlenmiştir, 28 günlükte ise azalmıştır. Aynı zamanda hücrel SOD aktivitesi de 14 ve 21 günlükte artmış 28 günlükte ise değişim gözlenmemiştir (Esim 2011). Tuza toleransları farklı iki buğday varyetesi ile yapılan çalışmada tuz konsantrasyonlarının artmasıyla apoplastik SOD aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Mutlu *et al.* 2009). Buğday, arpa, çavdar ve yulaf bitkileri soğukta büyütüldüklerinde POX aktivitesinin arttığı bulunmuştur (Janda

et al. 2003). Soğuğa dayanıklı ve hassas dört farklı mandalina kültürü soğukta depolanmış, bu mandalinaların kabuklarında ve meyvelerinde POX aktivitesine bakılmış, hassas türlerde depolama süresince POX aktivitesi düşerken, toleranslı türlerde aktivitenin yükseldiği belirlenmiştir (Sala 1998). Kışlık buğdayla yapılan bir çalışmada soğuk uygulaması apoplastik POX aktivitesini artırmıştır (Taşgın *et al.* 2006). Düşük sıcaklığa dirençleri farklı olan iki çeşit arpada düşük sıcaklık muamelesiyle POX aktivitesinin her iki çeşitte de bitkinin yaşına göre artış veya düşüş olduğu belirlenmiştir (Mutlu 2009). Düşük sıcaklığa hassas olan mısırın yapraklarında hem 14 hem de 28 günlük bitkilerin apoplastik POX aktivitesinde düşüş gözlenmiştir, 21 günlükte ise artmıştır. Aynı zamanda hücrel POX aktivitesinin de 14 günlükte azaldığı 21 ve 28 günlükte ise arttığı görülmüştür (Esim 2011). 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). Tropikal bir bitki olan soya fasulyesi (*Glycine max*) 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). Düşük sıcaklığa hassas olan mısırın yapraklarında hem 14 hem de 21 günlük bitkilerin hücrel CAT aktivitesinin arttığı 28 günlükte ise azaldığı görülmüştür (Esim 2011). Çeşitli bitkilerde soğuğa uyum sırasında GR enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Zhao and Blumwald 1998; Kocys *et al.* 2000). Kışlık arpada düşük sıcaklık uygulamasıyla yapraklarda GR aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Janda 2003). *Arabidopsis* ve salatalıkta donma stresinde GR aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Lee and Lee 2000). Buğday kültürlerinde kuraklık uygulamasından sonra yapraklarda GR aktivitesinin arttığı gözlenmiş, en yüksek aktivite ise kuraklığa toleranslı kültürde gözlenmiştir (Sairam and Srivastava 2001). Kışlık arpa ile yapılan bir çalışmada APX aktivitesinde artış gözlenmiştir (Janda 2003). Soğuğa uyumlu zeytin ağaçlarında CAT ve APX aktivitesinde artış tespit edilmiştir (Cansev *et al.* 2009). Soğuk stresine maruz bırakılmış nohut bitkisi ile yapılan bir çalışmada SOD ve CAT aktiviteleri artmış, POX aktivitesinde ise düşüş gözlenmiştir (Erdal 2012). Buğday bitkisinin iki farklı kültürü düşük sıcaklıklara maruz bırakılmış ve

her iki kültüründe CAT ve GR aktivitesinde artış gözlenmiştir (Keles and Oncel 2002). Bir başka çalışmada da soğuğa maruz kalmış çilek yapraklarında antioksidan enzim aktivitelerinin artmasıyla soğuğa direncin arttığı belirlenmiştir (Güler *et al.* 2008). Düşük sıcaklık, tuzluluk, yüksek ışık ve toprak kirliliği gibi stres şartlarındaki salatalık fidelerinde (Kang and Saltveit 2001), zeytin (*Olea europea*) kültürlerinde, buğdayda (Biemelt *et al.* 2000) antioksidan enzim aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir. Soğuğa toleranslı pirinç, kabak ve mısır kültürlerinde antioksidan enzim aktiviteleri soğuğa hassaslardan daha fazla olduğu belirlenmiştir (Guo *et al.* 2006). Düşük sıcaklığa maruz kalan mısır tohumlarında CAT ve GR aktivitesinin ve soğuğa toleransın arttığı gözlenmiştir (Prasad 1997). Mısır ile yapılan bir çalışmada gelişmenin ilk evresinde soğuğa toleransın azaldığı ve CAT ve APX aktivitesinde düşüş olduğu belirlenmiştir (Hodges *et al.* 1997). Soğuğa toleranslı ve kurak pirinç kültürlerinde soğuk veya kuraklık esnasında APX aktivitesinde artış, hassas kültürlerde ise azalma gözlenmiştir (Guo *et al.* 2006). Yapılan literatür çalışmalarında soğuk stresi koşullarında PGPR bakterileri uygulanmış bitkilerde apoplastik antioksidan enzim aktivitelerinin değişimi ile ilgili herhangi bir veriye rastlanılmamıştır.

Lipid peroksidasyonu (LPO), hücre zarı lipidlerinin süperoksid anyonu, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi serbest radikallerle etkileşmesi sonucu ortaya çıkar ve sonuçta hücresel zarların bozulmasına yol açar (de Azevedo Neto *et al.* 2006). Malondialdehid (MDA), stres şartlarında doymamış yağ asitlerinin peroksidasyon ürünü olarak ortaya çıkar. MDA miktarındaki artış, hücre zarlarının yapısal bütünlüğünün bozulduğunu gösterir (Posmyk *et al.* 2005). Nohutla yapılan bir çalışmada, soğuğa maruz kalan fidelerde MDA miktarının ve buna bağlı olarak da lipid peroksidasyon aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Turan 2007). Arpa ile yapılan çalışmada da hem hassas hem de dayanıklı arpada MDA miktarının arttığı gözlenmiştir (Mutlu 2009). Arpa (*Hordeum vulgare*) bitkisinin 2 varyetesi ile yapılan çalışmada düşük sıcaklığın LPO seviyesinde bir etki yapmadığı, dondurucu sıcaklıklarda ise LPO seviyesini arttırdığı belirlenmiştir (Afşar 2007). Soğuğa dayanıklı ve dayanıksız çilek yaprak apoplastında enzim aktivitelerinin ve MDA içeriğinin arttığı gözlenmiştir (Turhan *et al.* 2012). Düşük sıcaklığa hassas olan mısırın yapraklarında düşük sıcaklık uygulaması 14,

21 ve 28 günlük mısır bitkisinin yapraklarının MDA miktarlarında önemli artışlara neden olduğu görülmüştür (Esim 2011). Soğuğa maruz bırakılmış *Arabidopsis* ile yapılan bir çalışmada da MDA içeriğinin arttığı gözlenmiştir (Xue *et al.* 2009). Soğuk stresi uygulamasıyla mısır ve pirinçte yaprak dokularında MDA seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Kuk *et al.* 2003). Soğuğa hassas *Coffea* bitkisine soğuk uygulamasından sonra MDA içeriğinin arttığı gözlenmiştir (Campos *et al.* 2003). Kuraklık stresi altındaki çemen otu bitkisiyle yapılan bir çalışmada bitkilere ACC deaminaz aktivitesine sahip *Bacillus subtilis* uygulanmış ve MDA içeriğinin kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir (Barnaval *et al.* 2013). Literatürde bu çalışmanın dışında, soğuk stresi koşullarında PGPR bakterileri uygulanmış bitkilerde MDA miktarı değişimi ile ilgili herhangi bir veriye rastlanılmamıştır.

H₂O₂'nin oksidatif stresler sırasında miktarının artması bitkilerle ilgilenen bilim insanları için bitkilerde bu molekülün stresin bir işareti olduğu düşüncenin uyandırmıştır (Cheeseman 2006). Düşük sıcaklıkta H₂O₂'nin nasıl etkilendiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Mercimek bitkisi soğuk stresine maruz bırakıldığında, gövde dokusunda H₂O₂ 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 H₂O₂ miktarını düşürdüğü gözlenmiştir (Mutlu 2009). Düşük sıcaklığa hassas olan mısırın yapraklarında düşük sıcaklık uygulamasının 14, 21 ve 28 günlük mısır bitkisinin yapraklarında H₂O₂ miktarında önemli artışlara neden olduğu belirlenmiştir (Esim 2011). Düşük sıcaklıkta yetiştirilen buğday ve arpa bitkilerine PGPR uygulanmış ve her iki bitkide de H₂O₂ miktarında düşüş gözlenmiştir (Turan *et al.* 2013). Literatürde bu çalışmanın dışında, soğuk stresi koşullarında PGPR bakterileri uygulanmış bitkilerde H₂O₂ miktarı değişimi ile ilgili herhangi bir veriye rastlanılmamıştır.

Stres şartlarında içsel seviyesi artan ve hücrelerde önemli hasarlara neden olan diğer bir Reaktif oksijen türü (ROT) süperoksit (O₂⁻) radikalidir. Bu molekül, oldukça reaktif olup lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna sebep olmaktadır. Yabani hardal (Liu *et al.* 2010) ve salatalığın (Jing *et al.* 2009) düşük

sıcaklığa maruz kalmasıyla $O_2^{\cdot-}$ miktarının arttığı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada da kamış bitkisinin kuraklık stresi altında $O_2^{\cdot-}$ miktarını arttırdığı rapor edilmiştir (Zhao *et al.* 2008). Düşük sıcaklığa hassas olan mısırın yapraklarında düşük sıcaklık uygulaması 14, 21 ve 28 günlük mısır bitkisinin yapraklarının $O_2^{\cdot-}$ miktarlarında önemli artışlara neden olduğu görülmüştür (Esim 2011).

Bitkilerde kuraklık, donma, sıcaklık, tuzluluk, ve metal toksisitesi gibi abiotik streslere karşı mikrobiyal inokülasyonla stresin azaltıldığı gözlenmiştir (Hontzeas *et al.* 2006; Cheng *et al.* 2007; Nabti *et al.* 2010). Bitki büyüme ve düzenleyici rizobakterilerin (PGPR) bitkileri kuraklık, tuzluluk, metal toksisitesi gibi streslere karşı toleranslı hale getirdiği pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Eşitken *et al.* 2006; Turan *et al.* 2006, 2007). Sandhya *et al.* 2010 tarafından yapılan bir çalışmada kuraklık stresi altındaki mısır bitkisine *Pseudomonas* spp. inokule edilmiş ve antioksidan enzim aktivitelerinde (CAT, APX, GPX) artış tespit edilmiştir. Kuraklık stresi altındaki marul (*Lactuca sativa* L.). bitkisine PGPR *Pseudomonas mendocina* inokule edilmiş ve antioksidan enzim aktivitelerinde artış belirlenmiştir (Kohler 2008). *Pseudomonas putida* suşu kuraklık stresi altındaki ayçiçeği bitkisinde strese karşı tolerans kazandırdığı gözlenmiştir (Sandhya *et al.* 2009). Marul bitkisine PGPR *Pseudomonas mendocina* inokule edilmiş ve kuraklık stresine karşı antioksidan CAT aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Kohler 2008).

Himalaya bölgesindeki bitkilerin köklerinden izole edilen psikrotrofil *Pseudomonas* suşları soğuk şartlardaki mercimek bitkisine inokule edilmiş, bu bitkide kök ve gövde kuru ağırlığının kontrole göre arttığı gözlenmiştir (Bisht *et al.* 2013). Himalaya bölgesinin yüksek rakımlı topraklarından soğuğa toleranslı *Exiguobacterium acetylicum* bakteri suşu izole edilmiş ve bu bakteri buğday tohumlarına inokule edilmiştir. Soğuk şartlarda buğday bitkisinin kök ve gövde kuru ağırlığının kontrole göre arttığı gözlenmiştir (Selvakumar *et al.* 2010). Sıcaklığın düşük olduğu Himalaya topraklarından izole edilen psikrotolerant *Pseudomonas* suşları soğuk şartlardaki buğday tohumlarına inokule edilmiş kök ve gövde kuru ağırlığının inokule edilmemiş olanlara göre arttığı tespit edilmiştir (Mishra *et al.* 2011). *Cucurbita pepo*'dan izole edilen PGP

Serratia marcescens bakterisi düşük sıcaklıkta yetiştirilen buğday tohumlarına inokule edilmiş kök ve gövde kuru ağırlığının inokule edilmeyen kontrol bitkilerine göre arttığı gözlenmiştir (Selvakumar 2007). Turan *et al.* 2013 tarafından yapılan bir çalışmada bitki büyüme ve düzenleyici rizobakteriler (PGPR) buğday ve arpaya inokule edilmiş, kök ve gövde gövde kuru ağırlığının kontrole göre arttığı belirtilmiştir.

Bitkilerde soğuğa aklimasyon sırasında üretilen antifriz proteinlerle (AFP) ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Soğuğa aklime edilmiş kışlık çavdar yapraklarından elde edilen apoplastik ekstraktların SDS-PAGE'si sonunda 7 tane farklı molekül ağırlığına sahip polipeptid gözlenmiş ve bunların 16-37 kDa arasında değişen ve antifriz aktivite gösteren apoplastik polipeptidler olduğu tespit edilmiştir (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; Taşğın *et al.* 2006). Düşük sıcaklığa hassas olan mısırın yapraklarında 14 ve 28 günlük bitkilerin apoplastik proteinlerinin SDS-PAGE de yeni bandlar oluşturduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, tüm günlerde (14, 21 ve 28) bitkilerin hücresel proteinlerin SDS-PAGE de hem yeni bandlar oluşturduğu hem de mevcut bandları daha belirgin yaptığı belirtilmiştir (Esim 2011). Henrike *et al.* 2002 tarafından yapılan bir çalışmada mikroorganizmaların düşük sıcaklıkta üretilmesinden sonra (10°C) soğuk şok protein sentezinin uyarılma oranının arttığı belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada Himalaya bölgesindeki topraklardan izole edilen *Enterobacter ludwigii*'de Csp'nin varlığı 2DE jel elektroforezi yapılarak görülmüştür (Kandasamy *et al.* 2013). *Pseudomonas aeruginosa* suşundan farklı sıcaklıkta inkübasyon yapılarak soğuk şoku proteinler izole edilmiş SDS-PAGE jel analizinde farklı protein fraksiyonları elde edilmiştir (Üzümcü 2009). Michel vd. 1997 tarafından yapılan bir çalışmada Psikrotrofik bakteri *Pseudomonas fragi* 30 veya 20°C'den 5°C'lik üreme ortamına alınarak analiz edilmiş 25 ile 17 proteinin aşırı derecede üretildiği, 12 proteinin ise düşük düzeyde sentezlendiği, diğer taraftan her iki sıcaklık değerinde de (30 veya 20°C) ve (5°C) 20 proteinin sentezinde değişiklikler olduğu bulunmuştur. Bir başka çalışmada da Khan *et al.* (2003), farklı sıcaklıklarda inkübe ettikleri (4, 10, 20, 30 ve 37°C) *Pseudomonas fluorescens* suşundan 14000 Da ağırlığında soğuk şok, *Pseudomonas*

flourocessens mutant CRPF suşundan 35000 Da ağırlığında soğuğa dirençli protein izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada da psikrotrofik *Acinetobacter* sp. suşu 25°C’de inkübe edilerek protein sentezini indükledikten sonra 5°C’ye transfer edilerek iki boyutlu SDS-PAGE siteminde analiz edilmiştir. *Acinetobacter* sp. suşunun 25°C’den 5°C’ye transfer edilmesinden sonraki 2 saatlik inkübasyon sonunda 19 proteinin sentezinin arttığı saptanmıştır (Barbaro *et al.* 2002). Soğuğa adapte olmuş *Pseudomonas fluorescens* bakterisi 5°C’de üretildiğinde 5 adet soğuk şoku proteini sentezlenmiştir. Bu bakteri 0°C’de üretildiğinde ise 28 proteinin sentezinde artış görülmüştür (Colucci and Innis 1996). PGP *Pseudomonas fluorescens* 25°C ve 10°C sıcaklıklarda inkübe edilerek SDS-PAGE analizleri yapılmış düşük sıcaklıkta normal şartlara göre ekstra protein bandları görülmüş (13.5 kDa) ve proteinlerin miktarında da artış görülmüştür (Mishra *et al.* 1999). Antartik deniz sularından izole edilen psikrotrofik *Colwellia* sp. bakteri proteinlerinde SDS-PAGE yapılarak ve 0°C, 8°C ve 15°C deki protein bandları incelendiğinde soğukta geliştirilen bakterilerde farklı bir protein (7.3 kDa) bandı görülmüştür (Wang *et al.* 2006). Soğuğa toleranslı *Rhizobium* bakterisinin proteinlerinin SDS-PAGE ile incelendiğinde yüksek moleküler ağırlıklı membran polipeptitleri içerdiği ve bunun soğuk stresini azalttığı tespit edilmiştir (Sardesai *et al.* 2001). Kuraklık stresi altındaki mısır bitkisine *Pseudomonas* spp. inokule edilerek yapraklardan SDS-PAGE yapılmıştır. Bakteri inokule edilen uygulamalarda inokülasyon yapılmayanlara göre protein bandlarında artışlar gözlenmiştir (Sandhya *et al.* 2010). Kanada’nın yüksek arktik bölgelerinde yetişen bitkilerin rizosferinden izole edilen PGPR *Pseudomonas putida* bakterisi kışlık ve yazlık kanola bitkisinde 5°C’de bitki büyümesini artırdığı gözlenmiştir. Bu bakterinin AFP sahip olduğu gözlenmiştir. SDS-PAGE yapılarak 32-34 kDa ağırlığında büyük bir proteine sahip olduğu belirtilmiştir (Sun *et al.* 1995).

Yapılan çalışmalarda, buğday, çavdar ve kanolanın hem yazlık hem de kışlık çeşitlerinde, 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; Fletcher *et al.* 1999; Mayer *et al.* 1999; Huang and Duman 2002; Pudney *et al.* 2003; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşkın *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2009; Esim 2011).

Antifiriz proteinler (AFP) buz kristallerinin yapısını değiştirebilen yapısal olarak farklı proteinlerdir (Raymond and DeVries 1997). AFP sıfırın altındaki sıcaklıklarda buzun yeniden kristalleşmesini inhibe etmektedir (Knight *et al.* 1988). AFP'ler yaygın olarak kutup balıkları, bazı böcekler, bitkiler ve mantarlarda bulunur. Bazı bakterilerde de AFP'ler ve antifiriz lipoproteinler (AFLPs) bulunmuştur (Duman and Olsen 1993; Sun *et al.* 1995; Xu *et al.* 1998; Mills 1999; Kawahara *et al.* 2001; Raymond and Fritsen 2001; Yamashita *et al.* 2002). Yapılan çalışmalarda, *Pseudomonas putida* (Sun *et al.* 1995; Xu *et al.* 1998; Kawahara *et al.* 2001), *Micrococcus cryophilus*, *Rhodococcus erythropolis* (Duman and Olsen 1993), *Marinomonas protea* (Mills 1999) ve *Moraxella* türlerinin AFP aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Yamashita *et al.* 2002). Kanada'nın yüksek arktik bölgelerinde yetişen bitkilerin rizosferinden izole edilen PGPR *Pseudomonas putida* bakterisinin kışlık ve yazlık kanola bitkisinde 5°C'de bitki büyümesini artırdığı ve bu bakterinin de AFP'ye sahip olduğu gözlenmiştir (Sun *et al.* 1995). Böcek antifiriz proteinlerinin yanı sıra balık antifiriz glikoproteinlerinin bakteriyel INA'yı inhibe ettiği bildirilmiştir (Morreale *et al.* 1988; Duman *et al.* 2001). Yapılan bir çalışmada çim AFP'nin bakteriyel INA'lara karşı savunma gösterdiği gözlenmiştir (Tomalty *et al.* 2014).

Kuraklık, sıcaklık, tuzluluk ve oksidatif stres sırasında bitkilerde etilen üretiminin arttığı bilinmektedir (Morgan and Drew 1997). Glick *et al.* 1998 tarafından yapılan bir çalışmada ACC deaminaz içeren PGPR bitkilerde etilen seviyesini düşürdüğü tespit edilmiştir. ACC deaminaz içeren PGPR bakterileri tarafından bitki etilen seviyesinin düşürüldüğü abiyotik ve biyotik stresin zararlı etkilerinin de azaltıldığı görülmüştür (van Loon and Glick 2004). Halotolerant bakterilerin ürettiği ACC deaminaz enziminin tuz stresi altındaki kırmızı biber tohumlarında stres etilenini azaltarak tuza tolerans sağladığı ve böylece büyümeyi artırdığı belirlenmiştir (Siddikee *et al.* 2011). Donma stresine maruz kalmış domates bitkilerine ACC deaminaz aktivitesine sahip mutant

bakteri suşları inokule edilmiş ve etilen seviyesinin azaldığı görülmüştür (Subramanian *et al.* 2015). ACC deaminaz aktivitesine sahip bitki büyüme ve düzenleyici *B. phytofirmans* suşunun soğuk stresi esnasında asma bitkisinde bitki büyümesini artırdığı gözlenmiştir (Theocharis *et al.* 2012). Kuraklık stresi altındaki çemen otu bitkisiyle yapılan bir çalışmada ACC deaminaz aktivitesine sahip *Bacillus subtilis* uygulamasıyla strese karşı tolerans kazanıldığı belirtilmiştir (Barnaval *et al.* 2013). Kanola tohumlarının ACC deaminaz enzimine sahip *P. fluorescens* suşlarının inokülasyonunun kanolada tohum çimlenmesi ve gelişimi üzerindeki tuzluluk stresinin olumsuz etkilerini hafifletebileceği belirtilmiştir (Jalili *et al.* 2009). Sadrnia *et al.* 2011 tarafından yapılan çalışmada ACC deaminaz içeren *Pseudomonas mendocina* suşunun, domates bitkisinin tuzluluğa karşı direnci üzerindeki etkisi araştırılmış, ACC deaminaz üreten rekombinant *P. mendocina* ile yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan domates bitkisinde bu bakterinin bitkideki etilen içeriğini azaltarak tuzluluk stresine karşı bitkinin direncini artırabileceği görülmüştür. Khosravi *et al.* 2008 tarafından yapılan bir çalışmada *Sinorhizobium meliloti* türünün ACC deaminaz içeren ve negatif kontrol olarak ACC deaminaz içermeyen suşlarının tuzluluktaki buğday gelişimi üzerine etkileri araştırılmış, ACC deaminaz içeren suşun inokülasyonun buğdayda sürgün uzunluğunu, sürgün ağırlığını, kök uzunluğunu ve kuru sürgün ağırlığını inokule edilmeyenlere göre arttırdığı belirlenmiştir.

Kuraklık stresi altındaki çemen otu bitkisiyle yapılan bir çalışmada ACC deaminaz aktivitesine sahip *Bacillus subtilis* uygulamalarının total klorofil içeriğini kontrole göre arttırdığı belirtilmiştir (Barnaval *et al.* 2013). Sıcaklığın düşük olduğu Himalaya topraklarından izole edilen psikotolerant *Pseudomonad* suşları soğuk şartlardaki buğday tohumlarına inokule edilmiş klorofil a, klorofil b ve total klorofil içeriğinin inokule edilmemiş olanlara göre arttığı gözlenmiştir (Mishra *et al.* 2011).

Yapılan literatür araştırmalarında bir takım eksiklikler tespit edilmiş ve bu doğrultuda söz konusu eksiklikleri gidermek adına çalışmada aşağıdaki yöntemler izelenmiştir;

1. Düşük sıcaklıklara dirençli yabani bitkiler toplanarak bu bitkilerin apoplastından bakteriler izole edilmiştir.
2. İzole edilen bu bakteriler düşük sıcaklıkta ve normal şartlarda yetiştirilen fasulye (*Phaseolus vulgaris*) kültür bitkisine inokule edilerek bu bitkinin apoplastında buz nükleasyon aktivitesi ve antioksidan enzim aktiviteleri incelenmiştir.
3. İzole edilen bakteriler hem normal şartlarda hem de düşük sıcaklıkta sıvı kültürde inkübe edildikten sonra bakterilerin salgıladıkları ekstraselüler proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezleri yapılmıştır.
4. Soğuğa dayanıklı yabani bitkilerin apoplastından izole edilen bakterilerin ACC deaminaz aktiviteleri tespit edilmiştir.

Bu bakımdan çalışma literatür ve bilim dünyası için özgün niteliği taşımaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

İklim dolabı	: Sanyo, Japonya ve Jenotech, Kore
Masa santrifüj	: Hettich EBA 21
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini-1240
pH metre	: WTW unilab pH metre
Hassas terazi	: Shimadzu AY220
Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-30°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	: Nuaire
Karıştırıcı	: Fisons Whirlimixer
Otomatik pipetler	: Nichipet EX ve Socorex
Çalkalayıcı	: Gallenkamp
Çalkalamalı inkübatör	: Zhicheng, CHINA, ZHWY-200B
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1
Sıcak su banyosu	: Wise Bath
Vakum pompası	: Edwards, İngiltere
Elektroforez	: Bio-Rad
Otoklav	: Hirayama, JAPAN, HVE 50
Etüv	: Memmert, GERMANY, INBE 410 1583
Işık mikroskobu	: Boeco BM-180, Germany
Vitek cihazı	: VITEK 2 Compact
Görüntüleme Cihazı	: Fusion Fx Vilber Lourmat
Multiscan	: Multiscan GO

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış biçimleri aşağıda sunulmuştur. Çalışmalarımızda kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Fluka'dan temin edilmiştir.

1. Arnon ve Hoagland 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. Total apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu için kullanılan çözelti (20 mM Askorbik asit + 20 mM CaCl_2 çözeltisi): 5.28 g CaCl_2 ve 7.4 g askorbik asit bir miktar saf suda çözülmüş ve son hacim saf su ile 2 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
3. Antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu (0.1 M KH_2PO_4 (pH: 7.0), %1 PVP, 1mM EDTA): 3.4 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N KOH kullanılarak pH 7.0'ye ayarlanmış ve sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanarak üzerine 2.5 g PVP ve 0.073 g EDTA ilave edilmiştir.
4. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon (103.5 mM KH_2PO_4 , pH: 7.5): 1.4 g KH_2PO_4 , 80 ml saf suda çözülmüş, 1 N KOH ile pH: 7.5'e ayarlanmış ve son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
5. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi (40 mM H_2O_2 çözeltisi): %30'luk 408 μl H_2O_2 hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
6. Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için (5 mM H_2O_2 çözeltisi): %30'luk H_2O_2 'den 41 μl alınmış hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
7. Peroksidaz aktivite ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi (0.1 M Na_2HPO_4 , pH: 5.5): Na_2HPO_4 'den 3.55 g alınarak 200 ml saf suda çözülmüş ve pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 250 ml'ye tamamlanmıştır.
8. Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi 54 μL quaiKol ve 15 μL H_2O_2 'den ($d=1.13$ g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 mL 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözülerek hazırlanmıştır.

9. SOD için tampon çözelti (50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8)): 1.7 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
10. SOD reaksiyon karışımı için (13 mM metionin çözeltisi): 0.586 g metionin alınır, 250 ml 50mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülmüştür.
11. SOD reaksiyon karışımı için (63 μM NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür): 0.0128 g NBT alınır, 250 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek hazırlanmıştır.
12. SOD reaksiyon karışımı için (0.1 mM EDTA-Etilen Diamin Tetra Asetik asit): 0.073 g EDTA alınır, 250 ml 50mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülmüştür.
13. SOD aktivitesi için 2. çözelti (13 μM riboflavin): 0.019 g riboflavin, 500 ml saf suda çözülmüş, 3 ml'lik reaksiyon karışımının 13 μM riboflavin içermesi için 390 μL riboflavin alınmıştır.
14. APX ölçümünde kullanılan tampon: 50 mM KH_2PO_4 tamponu, 0.2 mM EDTA, 250 mM H_2O_2 ihtiva etmektedir.
15. GR homojenizasyon tamponu: 50 mM K_2HPO_4 , 1 mM EDTA pH 7.0, %1 PVPP içermektedir.
16. GR ölçümünde kullanılan tampon: 200 μl 0.5 mM EDTA içerisinde hazırlanmış 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) ve 250 μl 1 mM oksitlenmiş glutatyon (GSSG) ve 500 μl 0.25 mM NADPH ihtiva eden karışım hazırlanmıştır.
17. Süperoksit anyonu miktarının belirlenmesinde kullanılan tampon (65 mM K_2HPO_4 , pH: 7.8) : 1,132 g K_2HPO_4 70 ml saf su da çözülmüş pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra saf su ile hacmi 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
18. Süperoksit anyonu miktarının ölçülmesi için (10 mM Hydroxilamine): 0,0069 g Hydroxilamine alınmış 10 ml saf suda çözülerek hazırlanmıştır.
19. Süperoksit anyonu miktarının ölçülmesi için (17 mM amonyum benzonosülfonik asit (ABSA): 0,1472 g ABSA alınmış ve 50 ml saf suda çözülerek hazırlanmıştır.
20. Süperoksit anyonu miktarının ölçülmesinde kullanılır (17 mM 1-Naftilamine): 0.243 g 1-Naftilamine alınmış 10 ml asetonda çözülmüş ve son hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

- 21.** Lipid peroksidasyon aktivitesi homojenat çözeltisi (%5'lik TCA (trikloroasetik asit): 5 g TCA 100 ml saf su içerisine ilave edilir. TCA tam olarak çözününceye kadar karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 22.** Lipid peroksidasyon aktivitesi reaksiyon çözeltisi (%0.5'lik TBA (tiobarbutirik asit): 20 gram TCA 100 ml saf su içinde çözülür ve içerisine %0.5 g TBA ilave edilir ve iyice karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 23.** H_2O_2 miktarının belirlenmesi için (%5'lik $Ti(SO_4)_2$ (titanyum disülfat çözeltisi): $Ti(SO_4)_2$ 'den 1 gram alınıp 20 ml saf suda çözülerek hazırlanmıştır.
- 24.** H_2O_2 miktarının belirlenmesi için (%19'luk NH_4OH): 4.16 ml NH_3 20 ml saf suda çözülerek hazırlanmıştır.
- 25.** H_2O_2 miktarının belirlenmesi için (2 M'lık H_2SO_4): %98'lik H_2SO_4 'den 40 ml alınmış ve 160 ml saf su içerisine ilave edildikten sonra 200 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 26.** Protein tayini için (0.05 M KH_2PO_4 (pH: 6.5): 1.7 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH'sı 6.5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
- 27.** Protein tayini için (Coomassie reaktifi): Coomassie Blue G-250'den 10 mg alınıp 5 ml etanolde çözülür ve üzerine 10 ml %85'lik fosforik asit ilave edilir son hacmi saf suyla 100 ml 'ye tamamlanmıştır.
- 28.** Elektroforezde jel hazırlamak için kullanılan çözelti (1 M Tris-HCl pH: 6.8): 12.1 g Tris bir miktar saf suda çözüldükten sonra pH'sı 6.8'e ayarlanmış ve son hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 29.** Elektroforezde jel hazırlamak için kullanılan çözelti (1 M Tris-HCl pH: 8.8): 12.1 g Tris bir miktar saf suda çözüldükten sonra pH'sı 8.8'e ayarlanmış ve son hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 30.** %10'luk SDS (Elektroforezde jel hazırlamak için kullanılan çözelti): 1 g SDS 9 ml saf suda çok hafif ısıtmak suretiyle, berraklaşmaya kadar karıştırılmıştır.
- 31.** %30'luk akrilamid çözeltisi (Elektroforez ayırma jelinin hazırlanmasında kullanılan): 30 g akrilamid ve 0.8 g bis-akrilamid 100 ml saf suda iyice çözülmüştür. Kullanım dışında renkli şişede 4°C'de saklanmıştır.
- 32.** SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu: 3 g Tris ile 14 g glisin ve 1 g SDS ilave edilerek 1L saf suda çözülmüştür.

- 33.** %0.1'lik brom timol mavisini: 0.1 g indikatör boya, 16 ml 0.1 N NaOH içerisinde çözöldükten sonra saf su ile hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 34.** 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.
- 35.** Fixing çözeltisi (Jeldeki proteinleri, boyama öncesi sabitleştirmek için kullanılan çözelti: 10 ml saf su üzerine 1 g TCA ilave edilerek iyice çözöldükten sonra, 50 ml izopropil alkol yavaş yavaş ilave edilmiş ve 40 ml saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 36.** Boyama çözeltisi (Elektroforez sonrası jeldeki proteinlerin boyanmasında kullanılan): 10 g TCA 58 ml saf suda iyice çözöldükten sonra üzerine 15 g amonyum sülfat ilave edilmiş 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 çözölmüş üzerine daha önce hazırlanan çözelti yavaş yavaş ilave edilerek karıştırılmış ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 37.** Yıkama çözeltisi (Boyama sonrası jeldeki fazla boyayı uzaklaştırmak için kullanılan): 10 ml asetik asit üzerine 90 ml saf su ilave edilerek hazırlanmıştır.
- 38.** Bakterilerin saklanması için (%25'lik Gliserin): 25 ml steril distile su içerisinde 25 ml gliserin ve 50 ml nutrient broth eklendikten sonra karıştırılarak çözünmesi sağlanmış ve 1'er ml'lik ependorf tüplerinde muhafaza edilmiştir
- 39.** %3'lük KOH çözeltisi: 3 gr KOH 100 ml steril distile saf su içerisinde çözölererek hazırlanmıştır.
- 40.** Kristal violet çözeltisi: 0.5 gr kristal violet, 100 ml saf suda çözölererek hazırlanmıştır.
- 41.** %0,25 Safranin çözeltisi: 0.25 gr safranin 100 ml steril saf su içerisinde çözölererek hazırlanmıştır.
- 42.** Gram iyodu: 1 gr iyot ve 2 gr KI, 5 ml distile suda çözönmüş ve bu karşıma 250 ml distile su, 60 ml %5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO₃) ilave edilerek hazırlanmıştır.
- 43.** 0.5 M ACC çözeltisi:10 ml steril saf suda 0.5055 g ACC çözölererek elde edilmiştir. Bu sıvı filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve -20°C'de saklanmıştır.

- 44.** 0.1 M Tris-HCl (pH 7,6): 1.21 g trizma base 80 ml steril saf suda çözülmüş, 0.1 M HCl ile pH 7.6'ya ayarlanmış, çözeltinin üzeri saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır
- 45.** 0.1 M Tris-HCl (pH 8,5): 1.21 g trizma base 80 ml steril saf suda çözülmüş, 0.1 M HCl ile pH 8.5'e ayarlanmıştır. Çözeltinin üzeri saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 46.** 0.56 M HCl: 1.7 ml %37'lik HCl steril saf suya katılmış ve üzeri 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 47.** Dinitrofenil hidrazin ayırıcı (2 M HCl'de %0,2): 6.13 ml HCl steril saf suya eklenmiş ve üzeri 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0.2 g dinitrofenil boyası katılıp yarım saat karıştırılarak çözülmesi sağlandıktan sonra süzme işlemi yapılmıştır.
- 48.** 2 N NaOH: 8 g NaOH 100 ml sterilize edilmiş saf suda çözülerek hazırlanmıştır.
- 49.** JNFb besiyeri ortamı; 5 gr malik asit; 0.6 gr K_2HPO_4 ; 1.8 gr KH_2PO_4 ; 0.2 gr $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.1 gr NCl ; 0.02 gr $CaCl_2$; 2 ml %0.5 lik bromtimol mavisi (0.2N KOH'ta çözülerek hazırlanır); 1 ml vitamin solüsyonu (100 ml saf suda 10 mg biotin ve 20 mg pyridoxol-HCl çözülerek hazırlanır); 2 ml mikronutrient solüsyonu (1 lt saf suda 0.4 gr $CuSO_4$; 0.12 gr $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 1.4 gr H_2BO_3 ; 1gr $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 1.5 gr $MnSO_4 \cdot H_2O$ çözülerek hazırlanır); 4 ml %1,64 FeEDTA solüsyonu; 1.9 gr agar 800 ml steril saf suda çözüldü, pH: 5.8'e ayarlandı ve son hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlanmış ve otoklavlanarak sterilize edilmiştir.
- 50.** 0.102 gr α -ketobütirat 100 ml saf suda çözüldü bundan 100 μ l alınarak ve 100 ml 0.1 M Tris-HCl (pH: 5.8) tamponunda çözülerek hazırlanmıştır (ACC deaminaz aktivite tayini için standart grafiğin hazırlanmasında kullanıldı).

3.3. Yöntemler

3.3.1. Soğuğa dayanıklı yabancı bitki örneklerinin toplanması

Çalışmada yaprak apoplastlarından düşük sıcaklığa toleranslı bakteri izole etmek, amacıyla 2011-2012 yılının Şubat-Mart ayında (-1/-20°C gündüz/gece) Erzurum İli Palandöken Dağından (39° 50' 56'' ve 41° 17' 54'', 2425 m) 10 adet, Atatürk Üniversitesi kampüsünden, (39° 54' 43'' ve 41° 15' 41'', 1874 m) 4 adet ve Erzincan İli şehir merkezinden (5/-2°C gündüz/gece) (39° 44' 34' ve 39° 27' 58'', 1203 m) 2 adet

olmak üzere toplam 16 soğuga dayanıklı yabani ve kültür bitkileri toplanmıştır. Toplanan bitki örnekleri steril torbalarda hızlıca laboratuvar ortamına getirilmiş ve aynı gün bitki yapraklarından steril şartlarda apoplastik sıvılar ekstrakte edilmiştir. Geri kalan bitki örnekleri ise herbaryumda saklanmıştır. Apoplastik sıvıların ekstraksiyonu için, bitki yaprakları yaklaşık 1 cm uzunlukta dikkatlice kesilerek elde edilen yaprak kesitleri (7 g), en az 5 kez bol su ile iyice yıkanmıştır (Hon *et al.* 1994; Atıcı ve Nalbatoğlu 1999a,b). Deneyde 7 g yaprak kesiti, içerisinde 20 mM askorbik asit ve 20 mM CaCl_2 çözeltisi bulunan vakumlanabilir bir desikatöre yerleştirilmiş ve desikatör bir vakum pompası ile 30 dakika vakumlanmıştır. Vakumlanan yapraklar enjektörlere (20 mL'lik) dikkatlice yerleştirilmiş sonra, enjektörler birer santrifüj tüpüne konulmuştur ve 2000xg'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjlemeden sonra, tüplerin dip kısmında biriken apoplastik sıvılardan uygun miktarlarda (200 μl) Nutrient agar besiyeri içeren petri ortamına ekimler yapılmıştır. Petriler bakteri üremesinin gerçekleşmesi için $+4^\circ\text{C}$ 'de 10 gün inkübe edilerek gelişen bakteriler saflaştırılmıştır. 20 bakteri izolatu elde edilmiştir. Bakteriler gliserinli ortamda ve nutrient agar içeren tüplerde $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

3.3.2. Bakterilerle ilgili yapılan çalışmalar

3.3.2.a. Gram reaksiyon testi

Bu test ile bakteri suşlarının hücre duvarlarındaki farklılığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla steril lam üzerine %3'lük KOH çözeltisinden bir-iki damla damlatılmış, daha sonra öze ile alınan bakteri KOH çözeltisi ile 5-10 sn karıştırıldıktan sonra öze yukarıya doğru kaldırılmıştır. Eğer mikroorganizma gram negatif özellikte ise hücre duvarındaki peptidoglikon tabakası tek katlı ve teiokoik asit içermediğinden dolayı KOH ile kolayca parçalanmış ve sitoplazması ile onun içerisindeki DNA'sı serbest hale geçmiştir. Bunun sonucunda iplik şeklinde, viskoz bir uzama görülmüştür. Gram pozitif bakterilerde, peptidoglikan katmanı kalın olduğundan ayrıca teiokoik ve teikronik asit içerdiğinden dolayı KOH ile reaksiyona girmemiş ve öze yukarı doğru

kaldırıldığı zaman sulu bir hal aldığı için uzama gözlemlenmemiştir. Bu sonuç negatif bir reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Saygılı 1995).

3.3.2.b. Hücre morfolojisi analizi

Stoklardan alınan saf bakteri izolatlarının 24 saatlik genç kültürleri nutrient agar besiyeri ortamında geliştirilmiş ve bu kültürlerden preparatlar hazırlanmıştır. Gram ve basit boyama yöntemleri ile boyanan preparatlar mikroskobun immersiyon objektifinde incelenerek bakterilerin gram özelliklerine bakılmıştır (Saygılı 1995).

3.3.2.c. Gram boyama

1884'te Hans Christian tarafından geliştirilmiş olan bu boyama şu şekilde yapılmıştır: Önceden hazırlanmış ve alevde tespit edilmiş mikroorganizma preparatı üzerine primer boya olarak kristal viyole uygulanmış (Bu boya preparattaki bütün renkleri mor renkte boyar). Daha sonra boyanın etkisini arttırmak ve sabitleştirmek için mordan olarak iyot çözeltisi (lugol) uygulanmıştır. İyot kristal viyole ile birleşir ve hücre içinde çözülemez bir kompleks oluşturur. Preparat üzerine renk giderici olarak alkol ya da alkol-aseton karışımı uygulanmıştır. Gram (+) organizmalarda kristal viyole boya kompleksi renk gidericiden etkilenmez ve hücrede alıkonulur. Ancak gram (-) organizmalarda ise kristal viyole kolayca yıkanarak uzaklaşır. Dolayısıyla gram (-) hücrelerde bu devrede renksiz hale gelirken Gram (+) ise renk aldığı gözlenmiştir. Zıt boya olarak kırmızı renkli safranin uygulanmıştır. Safranin renksiz gram negatif hücreleri kırmızı olarak boyar. Böylece gram pozitif hücreler mor renkli gram negatifler ise kırmızı renkte boyanmış olur.

3.3.3. ACC deaminaz aktivitesinin belirlenmesi

İzolatların ACC deaminaz aktivitesini tespit etmek amacıyla 10 ml nutrient broth ortamında 1 gece büyütülerek 4°C, 8000 rpm de santrifüj edilmiş, pelet steril fizyolojik su ile 2 kez yıkanmıştır sonra 5 mM ACC içeren 7.5 ml JNFb (Kirchhof 1997) ile

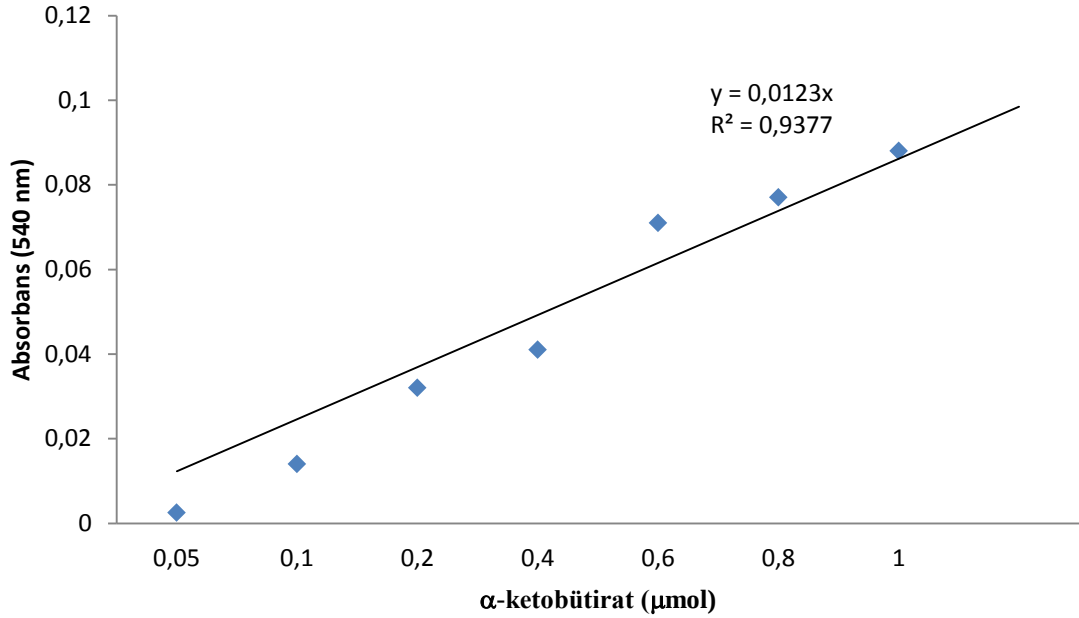
karıştırılmıştır. Tüpler 28°C de 120 rpm de 24 saat karıştırılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örnekler 8000 rpm de 4°C de 10 dk santrifüj edilmiştir. Pelet 0.1 M Tris-HCl (pH:7.6) tamponunun 1 ml sinde çözülmüştür. 15.000 rpm 4°C’de 15 dk santrifüj edilmiş ve pelet alınmış ve 0.1 M Tris-HCl (pH: 8.5) tamponunun 600µl sinde çözülmüştür. 30 µl toluen bu karışımın üzerine ilave edilmiş ve 30 sn en yüksek hızda vortekslenmiştir. Tüpler 1 saat 4°C’de bekletilerek 1200 rpm de 10 dk santrifüj edilmiş, toluen tabakası pipetle alınmıştır. Toluenize edilmiş hücreler 2 tüpe eşit olarak bölünmüş, ilk kısım protein tayini için (kısa süreli 4°C’de saklanabilir), diğer kısım da ACC deaminaz aktivitesi için kullanılmıştır. Toluenize edilmiş hücreler 200ml eppendrof tüpe alınarak üzerine 20 µl ACC (0.5 M ACC) ilave edilmiş, hafifçe karıştırılmış ve 15 dk 30°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 1 ml 0.56 M HCl ilave edilerek vortekslenmiş ve 12.000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantın 1 ml si alınarak başka bir tüpe konmuştur. Üzerine 800 µl 0.56 M HCl ilave edilerek hafifçe karıştırılmıştır. %2’lik 2,4-dinitrofenil hidrazinden bu tüpe 300 µl eklenip pipetlenerek karışım vortekslenmiş ve 30°C’de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 2 M’lık NaOH’ten 2 ml ilave edilmiş karıştırılmış ve karışımın absorbansı 540 nm’de ölçülmüştür (Shrivastava and Kumar 2013).

3.3.3.a. ACC deaminaz aktivite tayini için standart grafiğin hazırlanması

ACC deaminaz aktivitesi tespit edilirken ACC deaminaz’ın ACC’yi parçalaması esnasında oluşan α -ketobütirat miktarı ölçülmüştür. Bu reaksiyon sonucu oluşan α -ketobütiratın μ mol sayısı, örneğin 540 nm’de ölçülen absorbans değeri ile α -ketobütiratın 0.05-1 μ mol aralığındaki standart eğri değerleri karşılaştırılarak belirlenmiştir.

Bunun için 10 mM α -ketobütirat stok çözeltisi 0.1 M Tris-HCl (pH: 8,5) ile hazırlanmış ve stok çözelti dilüe edilerek 10 μ M’lık çözelti elde edilmiştir. Bilinen α -ketobütirat konsantrasyonlarına 300 µl 2,4- dinitrofenil- hidrazin ayırıcı eklenmiş, vortekslenmiş ve 30°C’de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Bu sırada α -ketobütiratın fenilhidrazona dönüşmesi beklenmiştir. Daha sonra üzerine 2 M 2 ml NaOH eklenip vortekslenerek

spektrofotometrede 540 nm’de ölçüm yapılmıştır. (Honma and Shimomura 1978) (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. ACC standart grafiği

3.3.4. Bakterilerin teşhisi

İzole edilen 17 bakteri izolatu, 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre tanımlanmıştır. 16S rRNA dizi analizinde DNA izolasyon kiti olarak Nanobiz Bakteriyal Genomik DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. PCR için; PCR: 50 uL hacimde; 1X Taq Buffer (Thermo), 0,2 mM dNTP (Thermo) 16S universal primer (27F ve 1492R), 1,5 mM MgCl, 0,2 U ThermoHot Start Taq Polimeraz, 150 ng bakteriyal genomik DNA kullanılmıştır. PCR şartları ise 95°C’de 5 dk. 30 X (94°C’de 30s+55°C’de 30s+72°C’de 45s) + 72°C’de 5 dk.dır. DNA dizi analizi için Bigdye Cycle Sequencing Kit v3.1 kullanılmış ve ABI 3100 XL Genetic Analyzer cihazında yürütülmüştür (Chaudhary *et al.* 2009) Filogenetik analiz için Mega Phylogenetic programı kullanılmıştır. Alignment için ClustalW kullanılmış ve Neighbour-joining yöntemi ile filogenetik ağacı çizilmiştir.

Üç bakteri ise PCR ile çoğaltılamadığı için Vitek tekniği ile teşhis edilmiştir. Bunun için VITEK 2 Compact cihazı kullanılmıştır. Çalışmada 3 ml steril salini (su içeriği %0.45 ila 0.50 NaCl, pH 45 ila 7) saydam plastik test tüpüne (12 mm x 75 mm) aseptik olarak aktarılmıştır. Daha sonra 24 saatlik taze kültür örneği bir çubuk veya pamuklu çubuk kullanılarak salin tüpüne aktarılmıştır. Kalibrasyonu yapılmış bir VITEK 2 Densi CHEK Plus kullanılarak yoğunluğu McFarland No. 0.50 ila 0.63'e eşdeğer homojen organizma süspansiyonu hazırlanmıştır. Süspansiyon tüpü ve vitek kartı kasete yerleştirilerek ve okunması için cihaza konulduktan sonra teşhis yapılmıştır (Aras 2011).

3.3.5. Bitkilerin büyütülmesi ve bakteri inokulasyonu

Araştırmamızda kültür bitkisi olarak Erzurum ve yöresinde yetiştiriciliği yapılan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Elkoca-05) kullanılmıştır. Tohumlar Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden temin edilmiştir. Fasulye bitkisine ait tohumlar, ekimden önce %5'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dk. yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş ve daha sonra 5 kez saf su ile yıkanarak, oda şartlarında saf su içerisinde 4 saat şişmeye bırakılmıştır. Tohumların ekimi ve yetiştirme ortamı olarak steril kum içeren saksılar (25x10 cm) kullanılmıştır. Ekim yapılacak kum %35'lik HCl ile yıkanmış sonra saf su ile iyice yıkanarak sterilize edilmiştir. Saksılar da %5'lik sodyum hipoklorit ile yıkanmış daha sonra alkol ve saf su ile sterilizasyon yapılmıştır. Her saksıya saf su ile şişirilmiş tohumlar eşit miktarda ekilmiştir. Çimlenme ve bitkilerin büyütülmesi bir iklim dolabında kontrol şartlarında (24/22°C) sıcaklık ve 16/8 saat ışık-karanlık periyodunda (20.000 lüks, %70 nem) 16 gün süreyle gerçekleştirilmiştir. Her saksı, hasat edileceği güne kadar, günlük eşit miktarda sulanmıştır. Daha sonra 10. gün bitkilerin bir kısmının yapraklarına eşit miktarda (50 ml) 10^8 CFU/ml konsantrasyonunda bakteri uygulanmıştır. Uygulamadan 3 gün sonra bakteri uygulanan ve bakteri uygulanmayan bitkiler soğuk şartlara (9/5°C, 16/8 saat ışık-karanlık periyodu ve %40 nem) transfer edilmiştir. Bitkiler soğuk şartlara transferden 3 gün sonra hasat edilmiştir. Apoplastik ekstraksiyon ve donma hasarı deneyleri için taze hasat edilmiş

yapraklar kullanılırken, diğer deneyler için yaprak örnekleri sıvı azotta dondurulduktan sonra -80°C’de saklanmıştır.

3.3.6. Yapraklarda % donma hasarının belirlenmesi

Kontrol, soğuk ve bakteri uygulamalı bitki yapraklarında % Donma hasarı ölçülerek, uygulanan bakterilerin yapraklarda donma hasarını engellemedeki rolü belirlenmiştir. Bu deney aşağıdaki şekilde yapılmıştır: 20 deney tüpünün her birine 0.1 g taze yaprak örneği konulmuştur. Tüpler -16°C’ye kadar ayarlanabilen bir su banyosuna (banyo için donmasını önlemek için su ile karışık alkol konulur) topluca yerleştirilmiş ve bütün tüpler, -1 den -16°C’ye kadar her bir derecede 10 dk. tutulmuştur. Sonra banyodan bir tüp alınmıştır. Banyodan alınan her tüpün içerisine 4 ml saf su konulmuştur ve bu tüpler 4°C’de 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra bu tüplerin içindeki dondurulmuş yaprağın çözülmesiyle saf suya geçen iyon miktarı, bir elektrik kondüktivimetre ile ölçülmüştür ve değerler % donma hasarına çevrilmiştir (Griffith *et al.* 1992; Taşgın vd 2003).

3.3.7. Apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesinin (BNA) belirlenmesi

Kontrol, soğuk ve bakteri uygulamalı bitki yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesine etkisi ölçülerek, apoplastik proteinlerin ve uygulanan bakterilerin donma toleransındaki rolü belirlenmiştir. Bu deneyin yapılışı şu şekildedir; ependorf tüplerdeki apoplastik proteinler 1 ml saf su içinde çözülmüştür. Daha sonra, bu tüpler topluca sıcaklığı, -20°C’ye kadar ayarlanabilen bir su banyosuna (donmayı önlemek için, su ile karışık alkol içerir) yerleştirilmiştir. Sıcaklık -1°C’den başlayarak 15 er dakika aralıklarla 1’er derece düşürülmüştür. Her bir tüp içindeki protein çözeltisinin donma noktası belirlenmiştir. Saf suyun donma noktası ile protein çözeltisinin donma noktaları arasındaki fark, buz nükleasyon aktivitesi olarak kabul edilmiştir (Griffith *et al.* 1992; Taşgın vd 2003).

3.3.8. Apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu

Apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu için, bitki yaprakları yaklaşık 1 cm uzunlukta dikkatlice kesilerek elde edilen yaprak kesitleri (7 g), en az 5 kez bol su ile iyice yıkanmıştır. Böylece yaprakların kesilen bölgelerinden gelebilecek hücresel protein kontaminasyon önlenmiş olur (Hon *et al.* 1994; Atıcı ve Nalbatoğlu 1999a,b). Deneyde 7 g yaprak kesiti, içerisinde 20 mM askorbik asit ve 20 mM CaCl_2 çözeltisi bulunan vakumlanabilir bir desikatöre yerleştirilmiş ve desikatör bir vakum pompası ile 30 dakika vakumlanmıştır. Vakumlanan yapraklar enjektörlere (20 mL'lik) dikkatlice yerleştirilmiş sonra, enjektörler birer santrifüj tüpüne konulmuştur ve 2000xg'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjlemeden sonra, tüplerin dip kısmında biriken apoplastik ekstrakt, apoplastik proteinlerin elde edilmesi için kullanılmıştır (Atıcı ve Nalbatoğlu 1999a,b; Taşgın vd 2003). Apoplastik proteinlerin izolasyonu için apoplastik ekstraktlara hacimlerinin 1.5 katı soğuk (-18°C) aseton ilave edilmiş ve karışım -18°C 'de 1 gece bekletilmiştir. İkinci gün, örnekler 3500xg'de 20 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra apoplastik protein peleti elde edilmiştir. Pelet, ilk önce %96'lık sonra %70'lik etanol ile birer kez dikkatlice yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Tamamen kurumuş olan pelet apoplastik enzim aktivitelerinin belirleneceği zamana kadar -80°C 'de saklanmıştır (Griffith *et al.* 1992; Hon *et al.* 1994; Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b; Taşgın vd 2003). Hücresel protein kontaminasyonu olup olmadığını belirlemek için G6PD (Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz) enzim aktivitesi yapılarak kontrol edilmiştir.

Enzim aktivitesi ölçümü yapılacağı zaman, apoplastik protein peletleri, 1 mL 0.2 M (pH: 7.5) Na_2HPO_4 tamponu içinde iyice çözölmüş ve apoplastik antioksidan enzim aktivitelerinin ölçümü için hazır hale getirilmiştir.

3.3.9. Hücresel proteinlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu

Hücresel proteinlerin ekstraksiyonu için, yapraklardan 0.5 g alınıp soğuk bir havan içine konulmuş ve üzerine sıvı azot ilave edilerek toz haline gelinceye kadar öğütölmüştür.

Sonra üzerine 5 ml soğuk homojenizasyon tamponu (%1 PVP ve 1 mM EDTA ihtiva eden 0.1 M KH_2PO_4 pH: 7.0) ilave edilmiş ve karışım bir santrifüj tüpüne aktararak 15000xg ve +4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda elde edilen süpernatant hücrel antioksidan enzimlerin aktivite ölçümleri için kullanılmıştır (Angelini and Federico 1989; Angelini *et al.* 1990; Mutlu 2005).

3.3.10. Lipid peroksidasyon seviyesinin belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu için 0.5 g yaprak alınmış %5'lik 5 ml TCA içinde homojenize edilmiş ve sonra elde edilen homojenat 10.000 xg'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmından 4 mL alınarak üzerine %0.5'lik Tiobarbutirik asitten (TBA) 1 mL ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyon tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durdurulmuştur. Örnekler tekrar 10000 xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı alınarak absorbansı 532 nm'de okunmuş ve daha sonra 600 nm'deki non-spesifik absorpsiyon için absorbans değeri ölçülmüştür.

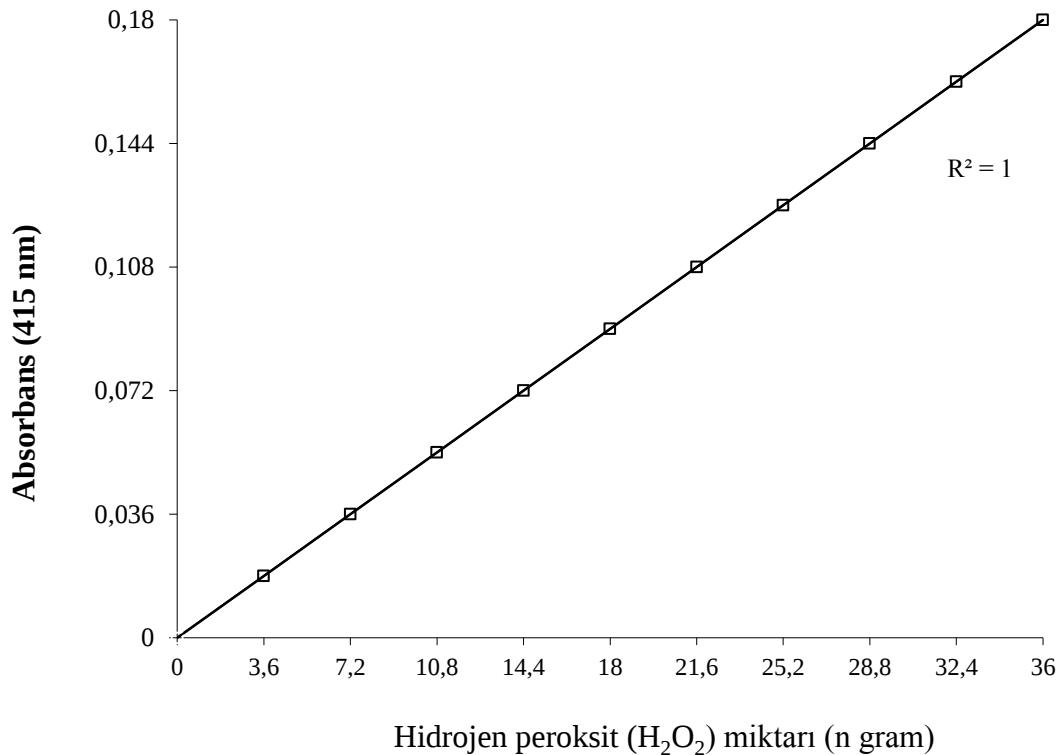
Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm'de belirlenen değeri çıkarılıp ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/ml): $[(A_{532} - A_{600})/155000] \times 10^6$ formülüyle hesaplanmıştır. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde verilmiştir (Ananieva *et al.* 2002).

3.3.11. Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarının belirlenmesi

Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarının belirlenmesi için 0.5 gram yaprak alınarak 10 ml soğuk aseton içinde homojenize edilmiş ve sonra homojenat 10.000 xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra 1.5 ml süpernatant üzerine 0.15 ml %5'lik $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ (titanyum disülfat) ve 0.3 ml %19'luk NH_4OH (amonyum hidroksit) eklenerek karıştırılmıştır. Çökelek oluştuktan sonra karışım 10.000 xg'de 10 dakika daha santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet 3 ml 2 M'lık H_2SO_4 (sülfürik asit) içinde çözülmüş ve 415 nm'de absorbansı ölçülerek

kaydedilmiştir. Bu ortalama absorbans değerleri, daha önceden hazırlanacak standart grafik yardımıyla nanogram cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürülmüştür. Sonuçlar g yaprak başına düşen H_2O_2 miktarı (n gram /g yaprak) olarak verilmiştir (He *et al.* 2005).

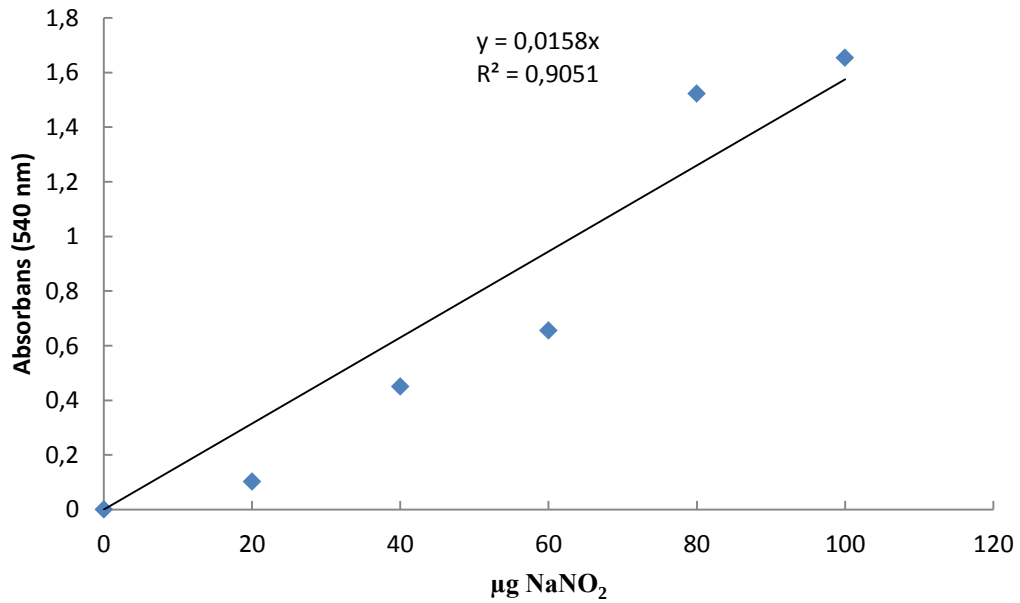
H_2O_2 miktarını belirlemede kullanılan H_2O_2 standardı için 3-mM'lık %35'lik H_2O_2 stok çözeltisinden Eppendorf tüplerine sırasıyla; 3.6, 7.2, 10.8, 14.4, 18, 21.6, 25.2, 28.8, 32.4 ve 36 ng olacak şekilde konulmuştur. Tüpün hacmi aseton ile 1.5 ml'ye tamamlanmış ve her bir tüpe 0.15 ml %5'lik $Ti(SO_4)_2$ ve 0.3 ml %19'luk NH_4OH ilave edilmiştir. Çökelek oluşuktan sonra karışım 10.000 x g'de 5 dakika daha santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet, 3 ml 2 M'lık H_2SO_4 içinde çözülmüş ve küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 415 nm'de absorbansı köre karşı okunmuştur. Absorbans değerlerine karşılık gelen ng H_2O_2 değerleri kullanarak standart grafik elde edilmiştir.



Şekil 3.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.12. Süperoksit anyon miktarının belirlenmesi

Yaprak örnekleri (0.5 g) sıvı azot ile toz haline getirildikten sonra üzerine 2 ml 65 mM (pH: 7.8) fosfat tamponu ile homojenize edilmiştir. Homojenat 5000 x g'de 10 dk +4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 1 ml alınmış ve 10 mM hydroxilaminden 0.1 mL ve 0.9 ml fosfat tamponunu ile karıştırılıp 25°C'de 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyona bırakılan karışımdan 1 ml alınıp üzerine 1 ml 17 mM aminobenzen sülfonik asit ve 1 mL 17 mM 1-naftilamin eklenmiş ve tekrar 25°C'de 20 dk inkübe edildikten sonra de 530 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar NaNO₂ standart grafiğine bakılarak değerlendirilmiştir (Eltner and Heupel 1976).



Şekil 3.3. Süperoksit anyonu miktarı standart grafiği

3.3.13. Apoplastik ve hücrel antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

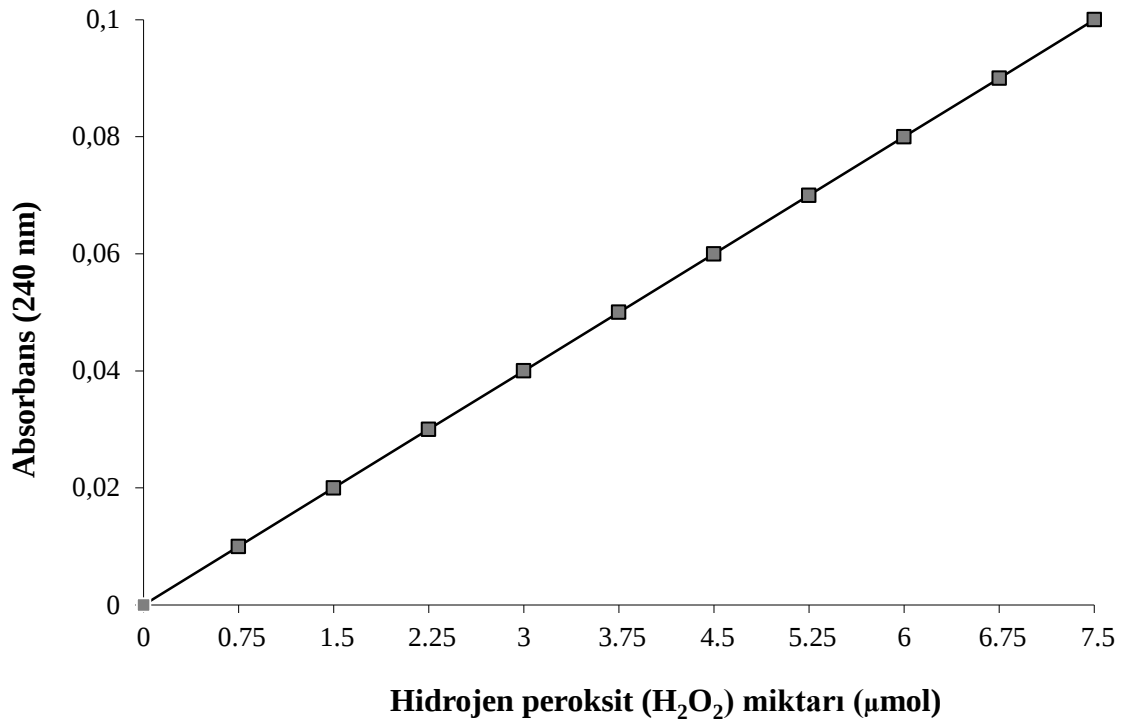
Kontrol, soğuk ve bakteri uygulamalı bitki yapraklarından elde edilen apoplastik proteinler içindeki antioksidan enzimlerin (katalaz, peroksidaz, süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz) aktiviteleri aşağıdaki yöntemlere göre tespit edilmiştir. Yukarıda (3.3.8) belirtildiği gibi elde edilen apoplastik proteinler fosfat

tamponunda (pH:6.5) çözülerek spektrofotometrik yöntemlerle enzimlerin aktiviteleri belirlenmiştir. Her bir antioksidan enzim için kullanılan kimyasallar ve yöntemler aşağıda belirtilmiştir.

3.3.13.a. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

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

Reaksiyonda azalan H_2O_2 miktarını belirlemek için öncelikle standart grafik hazırlanır. Standart grafik hazırlamak için, 5 mM H_2O_2 çözeltisinden 3 ml'lik spektrofotometre küvetine 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 saf 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 (Şekil 3.4). Aktivite ölçümü için 3 ml'lik spektrofotometre küvetine, 103 mM 1.475 ml KH_2PO_4 tamponundan ve 40 mM'lık H_2O_2 substrat çözeltisinden 1.5 mL konulduktan sonra, 25 μ l enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Tüplerin spektrofotometrede 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı 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. Hesaplama 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/mg protein) olarak belirtilmiştir.



Şekil 3.4. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik

3.3.13.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POX) aktivite tayini, guaikol ve H₂O₂'nin substrat olduğu reaksiyonun bir ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır.

Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 100 ml (0.1 M), NaH₂PO₄ (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol ve 5mM H₂O₂ içeren substrat çözeltisinden 3 mL konulduktan sonra, üzerine 10 μl enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Deneyde 470 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedilmiş ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanmıştır. Hesaplama 25°C'de 1 dakikada, absorbansı 0.01 artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/mg protein) olarak verilmiştir (Yee *et al.* 2002).

3.3.13.c. Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazolium (NBT)'un süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Reaksiyon karışımı (3 mL); 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 63 μM NBT, 0.1 mM EDTA ve 13 μM riboflavin içermektedir. Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine (3 ml) riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2.58 ml alınmış ve üzerine 30 μl enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 13 μM 'lık riboflavin çözeltisinden 390 μl pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmesiyle birlikte başlatılmıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk tutulmuş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. Daha sonra 15 dk içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okunmuştur. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir. Değerler EU/mg protein olarak sunulmuştur (Agarwal and Pandey 2004).

3.3.13.d. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayini

Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de absorbanstaki azalışa bağlı olarak belirlenmiştir (Nakano and Asada; 1981). Enzim aktivitesi, 50 mM KH_2PO_4 tamponu (pH 7.0), 250 μM askorbik asid (ASC), 5 mM H_2O_2 ve 20 μl enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de askorbik asit için $2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplanmıştır. Sonuçlar EU/mg protein olarak ifade edilmiştir.

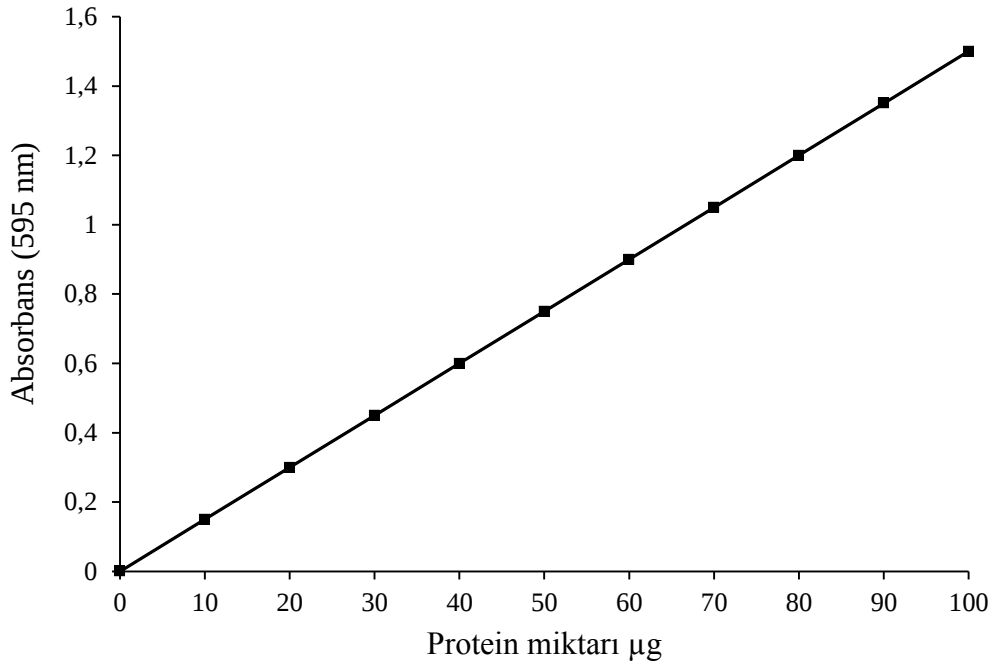
3.3.13.e. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tayini

Glutasyon redüktaz aktivitesi Foyer and Halliwell (1976)'e göre belirlenmiştir. Substrat olarak 1 mM oksitlenmiş glutasyon (GSSG) ve 0.25 mM NADPH kullanılmıştır. Yükseltgenmiş glutasyonun enzim tarafından indirgenmesi için NADPH indirgeyici

faktör olarak kullanılmıştır. Aktivite tayini için, 200 µl 0,5 mM EDTA içerisinde hazırlanmış 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 250 µl GSSG ve 500 µl NADPH ihtiva eden karışıma 50 µl enzim ekstraktı ilave edilmiş ve NADPH'ın oksidasyonu 340 nm'de 5 dakika boyunca azalmanın ölçülmesiyle belirlenmiştir. GR aktivitesi EU/mg protein olarak ifade edilmiştir.

3.3.14. Çözünebilir protein miktarının tayini

Bitkinin yapraklarından 0.5 g'lık örnekler kullanılarak Bradford (1976) metoduna göre protein tayini yapılmıştır. Sonuçlar µg protein/g taze doku cinsinden hesap edilmiştir. Her bir muameleye ait bitkilerin yapraklarından 0.5 g alınarak 10 misli hacimdeki 0.05 M fosfat tamponunda (pH:6.5) havanda ezilerek homojenizasyon yapılmıştır. Homojenat dört katlı tülbentten süzölmüş ve süzöntü santrifüj tüplerine alınıp 15.000 rpm'de 20 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Protein tayini için tüplerin süpernatant kısmı kullanılmıştır. Protein miktarı spektrofotometrik yolla tayin edilmiştir. Bu metot için gerekli standart grafik şu şekilde hazırlanmıştır; 1 ml'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albumin (BSA) çözeltisinden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg protein içeren hacimler tüplere aktarılmış ve saf su ile bütün tüplerin hacimleri 0.2 ml'ye tamamlanmıştır. Bu tüplere 3'er ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ilave edilip vorteks ile iyice karıştırılmıştır. Kör numune olarak ise 0.2 ml aynı tampondan ve 3 ml Coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanılmıştır. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, 595 nm'deki absorbans değerlerine karşılık gelen protein değerlerinden yararlanarak standart grafik elde edilmiştir (Şekil 3.5). Standart grafik hazırlama çalışmasında olduğu gibi bitki organlarından elde edilen özütlerden 0.2 ml alınıp, 3 ml Coomassie reaktifiyle karıştırılmış ve 595 nm'de absorbansları ölçülerek, standart grafikten yararlanılıp 0.2 ml özütteki protein miktarları belirlenmiştir. Daha sonra, gerekli hesaplamalar yapılarak protein miktarları µg protein/g doku olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Protein tayini için kullanılan standart grafik

3.3.15. Total klorofil içeriğinin belirlenmesi

Fasulye bitkisinin yapraklarında klorofil a, klorofil b, karotenoid ve toplam pigment miktarlarını belirlemek için Witham *et al.* (1971) tarafından verilen prosedür uygulanmıştır. Fasulye bitkisinden alınan yaprak örnekleri 1'er gram olacak şekilde tartılmış ve %80'lik soğuk aseton içerisinde son hacim 10 ml olacak şekilde homojenize edilmiştir. Daha sonra homojenat filtre kağıdından süzülerek elde edilen ekstrakt 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatantlar alınarak 450, 645 ve 663 nm'de absorbans değerleri kaydedilmiştir. Süpernatantların üç farklı dalga boyunda kaydedilen absorbans değerleri aşağıda verilen eşitliklerde yerine konulmasıyla bitki yaprak dokusunun 1 g'da bulunan klorofil a, klorofil b, total klorofil miktarları mg/doku olarak hesaplanmıştır.

$$\text{mg klorofil a / g doku: } ((12,7*(D_{663}) - 2,69*(D_{645})). (V/1000*W))$$

$$\text{mg klorofil b/ g doku: } ((22,9*(D_{645}) - 4,68*(D_{663})). (V/1000*W))$$

$$\text{mg toplam klorofil / g doku: } ((20,2*(D_{645}) + 8,02*(D_{663})). (V/1000*W)$$

Eşitliklerde;

D: Klorofil ekstraktının belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerini

V: %80'lik asetonun son hacmini

W: Ekstre edilen dokunun gram olarak yaş ağırlığının göstermektedir.

3.3.16. İzole edilen bakterilerden ekstrasellüler proteinlerin izolasyonu ve analizi

Bu işlem için Nutrient agar besiyerinde 24 saat inkübe edilen bakteriler, üretim ortamı olan 100 ml Nutrient broth besiyerinde normal şartlar için 30°C'de 225 rpm'de 18 saat, soğuk şartlar için ise 4°C'de 36 saat inkübe edilmiştir. Hem kontrol hem de soğuktaki bakteriler aynı yoğunlukta olması sağlanmıştır. İnkübasyon sonrası alınan örnekler, 4°C'de, 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek elde edilen süpernatantlar 0.2 µm'lık millipordan geçirilmiştir. Bakteri ekstrasellüler ortamına hücre içi proteininin karışıp karışmadığını belirlemek için G6PD (Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz) enzim aktivitesi yapılmıştır. Her bir bakterinin protein tayini yapılmıştır ve elde edilen sonuçlara göre proteinler soğuk (-20°C) asetonunda 1 gece inkübe edilmiş ve sonra 3000 rpm de santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet bakteri protein miktarına göre her birinde 30µg protein olacak şekilde SDS-PAGE numune tamponu ile karıştırılmıştır. 10 dk denatürasyon işlemi yapıldıktan sonra kuyulara 40 µl örnek yüklenmiş, yürütme sonucu protein bantları coomassie boyama yapılarak gözlenmiştir.

3.3.17. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi

Bu araştırmada bakterilerden elde edilen ekstraselüler proteinlerin profillerindeki değişim, Laemmli tarafından önerildiği şekilde elektroforez yapılarak değerlendirilmiştir (Laemmli 1970).

Elde edilmiş ekstraselüler proteinler 40 µL numune tamponu içinde çözüldükten sonra elektroforez için hazırlanmıştır. Elektroforez için %5-12 kesikli sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid (SDS-PAGE) jeli hazırlanmıştır.

Ayırma jelini hazırlamak için, bir behere %30'luk akrilamid - %0,8'lik bisakrilamid çözeltisinden 3.2 ml alınmış ve üzerine sırasıyla 1 M'lık Tris-HCl (pH:8.8)'den 2.03 ml %10'luk SDS'den 80 µl, 4 µL %5'lik TEMED ve 2.61 ml saf su konularak karıştırılmıştır. Bu karışımın üzerine en son 1 g (110 µl) amonyum persülfat hızlıca pipetlenmiştir.

Yığılma jelini hazırlamak için bir behere %30'luk akrilamid - %0,8'lik bisakrilamid çözeltisinden 830 µl alınmış ve üzerine sırasıyla 1 M'lık Tris-HCl (pH:6.8)'den 630 µl, %10'luk SDS'den 50 µl, %10'luk 5 µl TEMED ve 3.4 ml saf su konularak karıştırılmıştır. Bu karışımın üzerine taze hazırlanmış %10'luk amonyum persülfattan 50 µl ilave edilmiştir.

Elektroforez işlemi şu şekilde yapılmıştır. Elektroforez cam plakaları önce alkol ve sonra saf su ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Cam plakalar aparata yerleştirilmiştir. Ayırma jeli hazırlandıktan hemen sonra ince bir pipet yardımıyla pipetlenmiş ve bunun üzerine jelin üstünün pürüzsüz olması için hemen izopropil alkol den bir miktar dökülmüştür. Ayırma jeli polimerize oluncaya kadar yaklaşık 30 dk beklenmiştir. Katılaştıktan sonra jelin üzerindeki izopropil alkol dökülerek saf su ile yıkanmış kurutma kağıdı ile jele dokunmayacak şekilde kurutulmuştur. Yığılma jeli hazırlanmış ve ayırma jelinin üzerine dökülüp tarak yerleştirilmiş ve yaklaşık 30 dk sonra tarak jelden dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Hazırlanan plakaların kuyuları önce saf su ile sonra yürütme tamponu ile yıkanıp elektroforez tankına yerleştirilmiştir (Mutlu 2009; Esim 2011) .

Protein numuneleri, her bir kuyuya toplam hacim 40 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu amaçla 30 µg protein tüplerde hazırlanıp 10 dakika kaynar suda inkübe edilmiş ve oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Numuneler bir mikroenjektörle jelin kuyularına

tatbik edilmiştir. Molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerde 30 µL tamponda çözülerek numunelerle birlikte jele yüklenmiştir. Tank kapağı kapatılarak elektroforez tankının alt ve üst kısmına yeterince yürütme tamponu konulmuş ve elektrik bağlantıları yapılmıştır. Daha sonra numuneler ayırma jelinin hizasına kadar 80 voltta yürütülmüştür. Ayırma jeline geldikten sonra 120 voltta yaklaşık 2 saat yürütmeye devam edilmiştir. Yürüme işlemi bittiğinde akım kesilerek jel, camlar arasından dikkatlice çıkarılmış ve sabitleme çözeltisinde hafif hızda 30 dakika çalkalanmıştır. Yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere özel kabına konulmuştur. Daha sonra, jel boyama çözeltisine alınmış ve bir saat tekrar çalkalanmıştır. Boyama çözeltisinden alınan jel protein bantları iyice görülünceye kadar yıkama çözeltisinde yıkanmıştır. Belirli zaman peryotlarında değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalanmıştır. Jel, yıkama çözeltisinden çıkarıldıktan sonra görüntüleme cihazından görüntüsü elde edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmada, 2011-2012 yılının Şubat-Mart aylarında Erzurum İli Palandöken Dağından, Atatürk Üniversitesi kampüsünden (-1/-20°C gündüz/gece) ve Erzincan İli şehir merkezinden (5/-2°C gündüz/gece) soğuğa dayanıklı yabani (14) ve kültür bitkileri (2) (*Onosma isauricum*, *Verbascum cheiranthifolium*, *Chenopodium botrys*, *Chenopodium foliosum*, *Myosotis alpestris* sp., *Capsella bursa-pastoris* sp., *Artemisia austriaca*, *Draba nemorosa*, *Raphanus raphanistrum*, *Trifolium repens*, *Fragaria vesca*, *Taraxacum sieheanum*, *Galanthus gracilis*, *Colchicum speciosum*, *Scilla siberica*, *Erodium cicutarium*) (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1) toplanmıştır. Bu bitkilerin yaprak apoplastlarından bakteriler izole edilmiş ve saflaştırma yaptıktan sonra 16S rRNA dizi analizi ve vitek tekniğine göre tür teşhisleri yapılmıştır. Filogenetik olarak sınıflandırılan bakterilerin akrabalık dereceleri Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Bakterilerin izole edildiği bitkiler, habitatları, 16S ve Vitek verilerine göre bilimsel adları ve Gram özellikleri

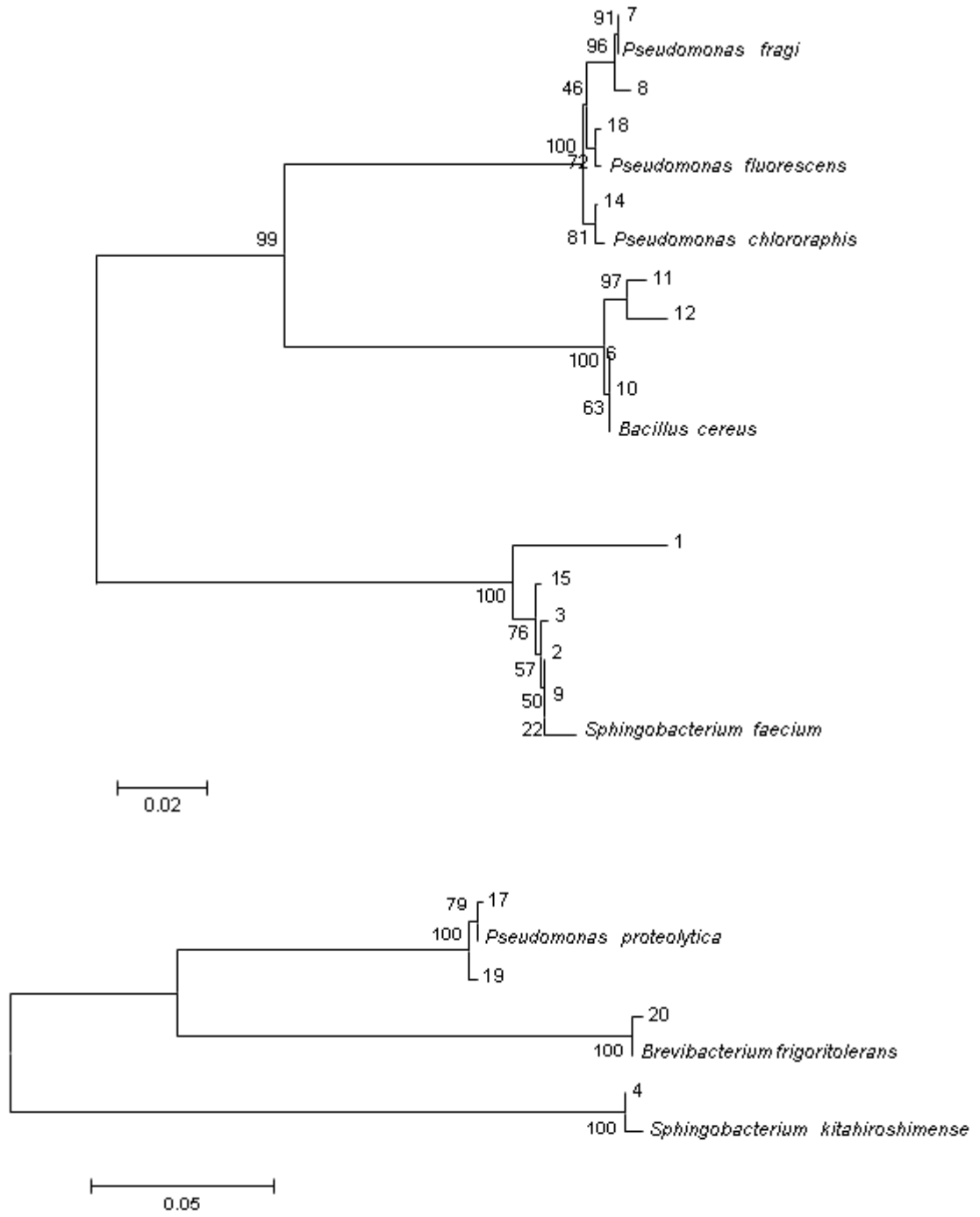
İzolat No	Toplandığı Bölge	Bitki Türünün Bilimsel Adı	Bitki Türünün Türkçe Adı	16S ve Vitek (V) Sonuçlarına Göre Bakteri İsmi	Gram Özelliği
DT-1	Erzurum Palandöken Dağı (39° 50' 56'' ve 41° 17' 54'', 2425 m)	<i>Onosma isauricum</i>	Kül emcek	<i>Sphingobacterium faecium</i>	-
DT-2	Erzurum Palandöken Dağı (39° 50' 56'' ve 41° 17' 54'', 2425 m)	<i>Verbascum cheiranthifolium</i>	Bozkulak	<i>Sphingobacterium faecium</i>	-
DT-3	Erzurum Palandöken Dağı (39° 50' 56'' ve 41° 17' 54'', 2425 m)	<i>Chenopodium botrys</i>	Kızılbacak	<i>Sphingobacterium faecium</i>	-
DT-4	Erzurum Palandöken Dağı (39° 50' 56'' ve 41° 17' 54'', 2425 m)	<i>Chenopodium foliosum</i>	Cülek	<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i>	-
DT-5	Erzurum Palandöken Dağı (39° 50' 56'' ve 41° 17' 54'', 2425 m)	<i>Myosotis alpestris</i> sp.	Boncuk otu	<i>Staphylococcus intermedius</i> (V)	+
DT-6	Erzurum Palandöken Dağı (39° 50' 56'' ve 41° 17' 54'', 2425 m)	<i>Capsella bursa-pastoris</i> sp.	Çoban çantası	<i>Bacillus cereus</i>	+
DT-7	Erzurum Palandöken Dağı (39° 50' 56'' ve 41° 17' 54'', 2425 m)	<i>Artemisia austriaca</i>	Yavşan	<i>Pseudomonas fragi</i>	-
DT-8	Erzurum Palandöken Dağı (39° 50' 56'' ve 41° 17' 54'', 2425 m)	<i>Draba nemorosa</i>	Orman dolaması	<i>Pseudomonas fragi</i>	-
DT-9	Erzurum Atatürk Üniv. Kampüs (39° 54' 43'' ve 41° 15' 41'', 1874 m)	<i>Raphanus raphanistrum</i>	Eşek turpu	<i>Sphingobacterium faecium</i>	-
DT-10	Erzurum Atatürk Üniv. Kampüs (39° 54' 43'' ve 41° 15' 41'', 1874 m)	<i>Trifolium repens</i>	Aküçgül	<i>Bacillus cereus</i>	+

Çizelge 4.1 (devam)

İzolat No	Toplandığı Bölge	Bitki Türünün Bilimsel Adı	Bitki Türünün Türkçe Adı	16S ve Vitek (V) Sonuçlarına Göre Bakteri İsmi	Gram Özelliği
DT-11	Erzurum Atatürk Ünv. Kampüs (39° 54' 43'' ve 41° 15' 41'', 1874 m)	<i>Fragaria vesca</i>	Çilek	<i>Bacillus cereus</i>	+
DT-12	Erzurum Atatürk Ünv. Kampüs (39° 54' 43'' ve 41° 15' 41'', 1874 m)	<i>Taraxacum sieheanum</i>	Sarısütlü	<i>Bacillus cereus</i>	+
DT-13	Erzincan ili şehir merkezi (39° 44' 34' ve 39° 27' 58'', 1203 m)	<i>Galanthus gracilis</i> CELAK	İnce kardelen	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (V)	-
DT-14	Erzincan ili şehir merkezi (39° 44' 34' ve 39° 27' 58'', 1203 m)	<i>Galanthus gracilis</i> CELAK	İnce kardelen	<i>Pseudomonas chloropaphis</i>	-
DT-15	Erzincan ili şehir merkezi (39° 44' 34' ve 39° 27' 58'', 1203 m)	<i>Galanthus gracilis</i> CELAK	İnce kardelen	<i>Sphingobacterium faecium</i>	-
DT-16	Erzurum Palandöken Dağı (39° 50' 56'' ve 41° 17' 54'', 2425 m)	<i>Colchicum speciosum</i>	Şepart	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
DT-17	Erzurum Palandöken Dağı (39° 50' 56'' ve 41° 17' 54'', 2425 m)	<i>Colchicum speciosum</i>	Şepart	<i>Pseudomonas proteolytica</i>	-
DT-18	Erzurum Palandöken Dağı (39° 50' 56'' ve 41° 17' 54'', 2425 m)	<i>Scilla siberica</i>	Camışkiran	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (V)	-
DT-19	Erzurum Palandöken Dağı (39° 50' 56'' ve 41° 17' 54'', 2425 m)	<i>Scilla siberica</i>	Camışkiran	<i>Pseudomonas proteolytica</i>	-
DT-20	Erzincan ili şehir merkezi (39° 44' 34' ve 39° 27' 58'', 1203 m)	<i>Erodium cicutarium</i>	İğnelik	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	+



Şekil 4.1. Soğuğa dayanıklı yabani ve kültür bitkileri (*Raphanus raphanistrum* ve *Galanthus gracilis* kaynak: www.turkiyebitkileri.com)



Şekil 4.2. Bakteri izolatlarının yakınlığını gösteren dendrogram

Bu çalışmada daha çok yöremizde ekimi yapılan soğuğa duyarlı fasulyenin (*Phaseolus vulgaris* L.) Elkoca-05 çeşidi kullanılmıştır. Bitkiler kontrol şartlarında 25/22°C sıcaklık ve 16/8 saat ışık-karanlık periyodunda (15000 lüks, %70 nem) 16 gün süreyle büyütülmüştür. Her saksı, hasat edileceği güne kadar, günlük eşit miktarda sulanmıştır. Bitkilerin bir kısmının yapraklarına 10. gün eşit miktarda (50 ml) 10^8 CFU/ml bakteri uygulanmıştır. Uygulamadan 3 gün sonra bakteri uygulanan ve bakteri uygulanmayan bitkiler (kontrol) soğuk şartlara (9/5°C) transfer edilmiştir. Soğuk şartlarda 3 gün kaldıktan sonra (Şekil 4.8) bitkiler hasat edilmiştir. Apoplastik sıvının ekstraksiyonu, apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktiviteleri ve donma hasarı deneyleri için taze hasat edilmiş yapraklar kullanılmıştır. Ayrıca, apoplastik ve hücrel antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT, POX, APX, GR), H_2O_2 ve O_2^- , MDA miktarları belirlenmiştir. Ekstraselüler bakteri proteinlerinin SDS-PAGE elektroforez yöntemiyle profillerini belirleme ve ACC deaminaz enzim aktivitesinin belirlenmesi deneyleri yapılmıştır.

Bulgular çizelgelerde ayrıntılı olarak verilmiş ve farklılıkların daha iyi anlaşılabilmesi için de grafiklerle desteklenmiştir. Öncelikle düşük sıcaklığın kontrol grubuna göre daha sonra ise bakteri uygulamalarının düşük sıcaklığa göre yaptığı değişimler ayrıntılı olarak karşılaştırılmıştır. Böylece hem düşük sıcaklığın hem de düşük sıcaklık öncesi uygulanan bakterilerin stres cevabında aldığı roller açık bir şekilde ve istatistiksel olarak ortaya konmaya çalışılmıştır.

4.1. Kök ve Gövdelerindeki Kuru Ağırlık Miktarına Ait Bulgular

Fasulye bitkisinde farklı bakteri izolatlarının uygulamasının kök ve gövde kuru ağırlık üzerindeki etkileri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6'de verilmiştir.

Normal şartlarda yetiştirilen bitkinin kökünde kontrole göre bakteri uygulamaları kuru ağırlık miktarını genelde artırmıştır. Örneğin; DT-14 bakteri izolatı kontrole göre %97, DT-18 bakteri izolatı %73, DT-20 bakteri izolatı ise %81 oranında artırmıştır. DT-8, DT-12, DT-13, DT-19 bakteri izolatları sırasıyla %41, %60, %33, %48 oranında düşürmüştür. Normal şartlarda yetiştirilen bitkinin gövdesinde kontrole göre bakteri

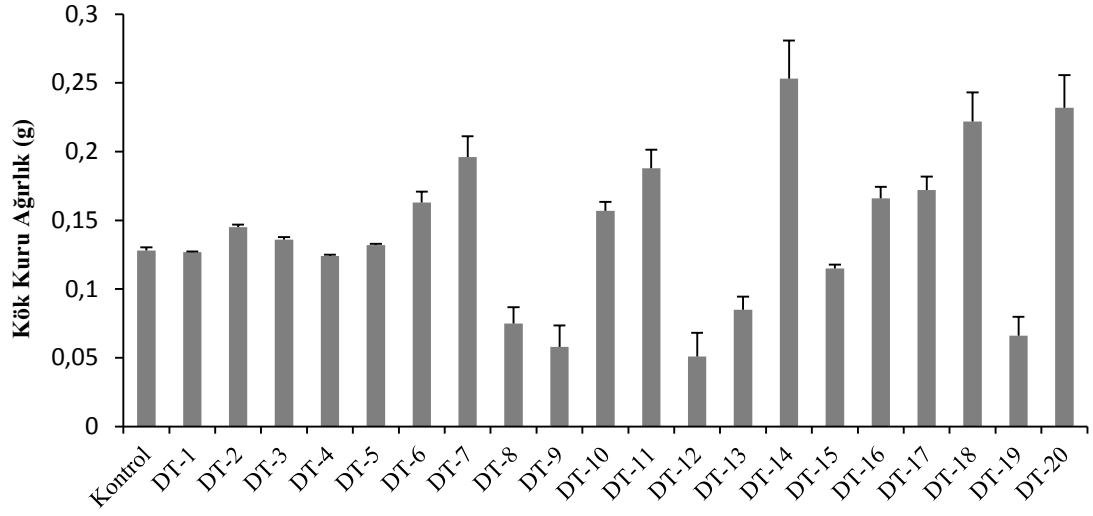
uygulamaları kuru ağırlık miktarını genelde artırmıştır; DT-9 bakteri izolatu %34, DT-14 bakteri izolatu %68, DT-18 bakteri izolatu %77 oranında kuru ağırlık miktarını artırmıştır. DT-2, DT-7, DT-8, DT-10, DT-17 bakteri uygulamaları ise %54, %25, %34, %61, %36 oranında düşüşe neden olmuştur (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3, 4.5).

Düşük sıcaklık şartlarında yetiştirilen fasulye bitkisinin kuru ağırlık miktarına bakacak olursak kökte kontrole göre bakteri uygulamaları kuru ağırlık miktarını genelde artırmıştır. DT-13 bakteri izolatu bu artışı %80, DT-15 bakteri izolatu %58, DT-3 bakteri izolatu %51 oranında yapmıştır. DT-4, DT-6, DT-9, DT-14, DT-17, DT-18, DT-20 bakterileri %15, %21, %15, %34, %34, %61, %13 oranında düşürmüştür. Gövdede de kökte olduğu gibi bakteri uygulamaları kuru ağırlık miktarını genelde artırmıştır. DT-3 bakteri izolatu bu artışı %73, DT-8 bakteri izolatu %73, DT-15 bakteri izolatu %70 oranında yapmıştır. DT-6, DT-17, DT-18, DT-20 bakteri uygulamaları ise %35, %28, %20, %33 oranında kuru ağırlık miktarında düşüşe neden olmuştur (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4, 4.6).

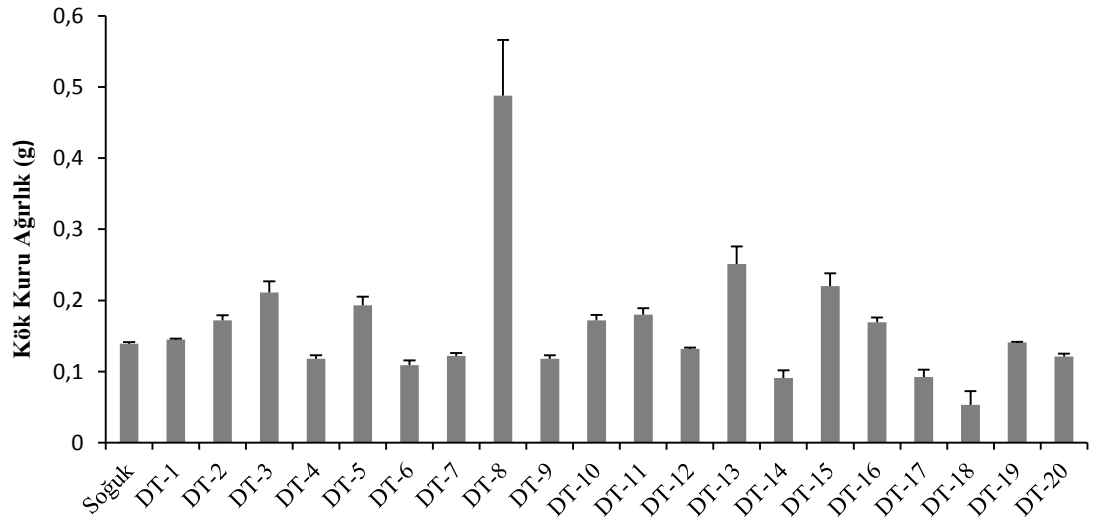
Çizelge 4.2. Kuru Ağırlık sonuçları. Sonuçlar gr doku cinsinden verilmiştir

İzolat No	Kontrol (25/22 °C)		Soğuk (9/5 °C)	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
Kontrol	0,128±0,0024	0,371±0,0543	0,139±0,00205	0,279±0,0313
DT-1	0,127±0,00043	0,362±0,020	0,145±0,0013	0,364±0,019*
DT-2	0,145±0,0018	0,172±0,044*	0,172±0,007	0,305±0,016*
DT-3	0,136±0,0018	0,384±0,029	0,211±0,016*	0,411±0,029*
DT-4	0,124±0,00097	0,338±0,073	0,118±0,0047	0,260±0,004
DT-5	0,132±0,00037	0,386±0,033	0,193±0,012*	0,364±0,019*
DT-6	0,163±0,0078	0,356±0,033	0,109±0,0067	0,181±0,021*
DT-7	0,196±0,01521*	0,238±0,029*	0,122±0,0038	0,287±0,0018
DT-8	0,075±0,0118*	0,244±0,028*	0,488±0,0780*	0,684±0,090*
DT-9	0,058±0,01566*	0,500±0,028*	0,118±0,0047	0,323±0,0098
DT-10	0,157±0,0064	0,143±0,050*	0,172±0,0073	0,231±0,0107
DT-11	0,188±0,0134*	0,463±0,020	0,180±0,0091	0,361±0,0183*
DT-12	0,051±0,0172*	0,421±0,011*	0,132±0,0016	0,304±0,0056
DT-13	0,085±0,0096*	0,423±0,011*	0,251±0,025*	0,366±0,0019*
DT-14	0,253±0,0279*	0,626±0,057*	0,091±0,0107*	0,334±0,012
DT-15	0,115±0,0029	0,324±0,010	0,220±0,0181*	0,477±0,044*
DT-16	0,166±0,0085*	0,477±0,023*	0,169±0,0067	0,278±0,00043
DT-17	0,172±0,0098*	0,238±0,029*	0,092±0,0105*	0,211±0,015
DT-18	0,222±0,0210*	0,660±0,064*	0,053±0,0192*	0,222±0,012
DT-19	0,066±0,0138*	0,406±0,078*	0,141±0,00058	0,389±0,024*
DT-20	0,232±0,0236*	0,532±0,036*	0,121±0,0043	0,188±0,020*

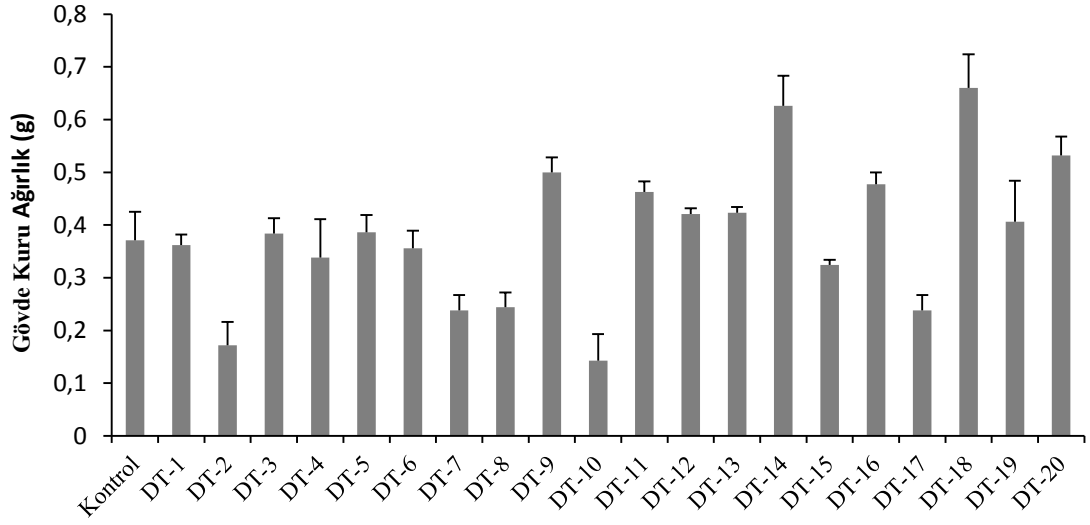
*Duncan Testine göre P<0.05 hata seviyesinde kontrol değerinden önemli farklılığı ifade eder



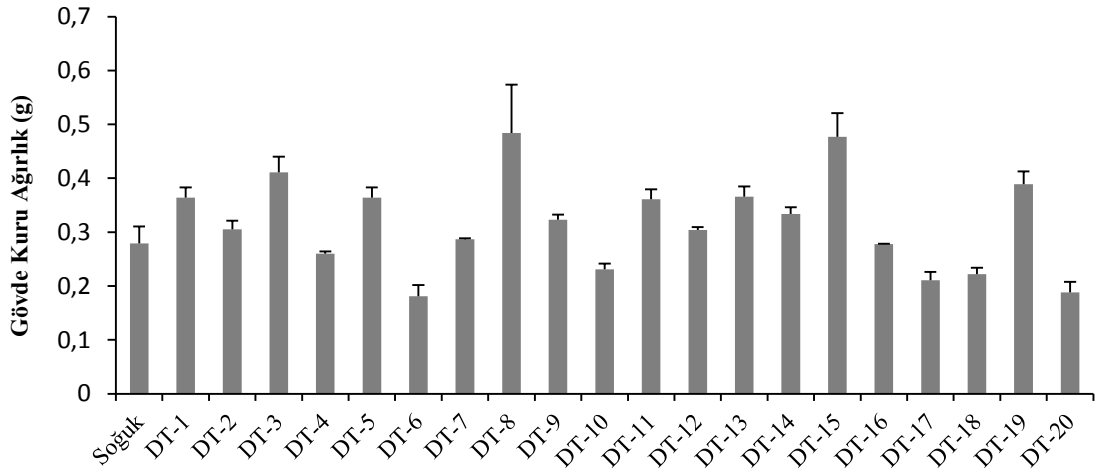
Şekil 4.3. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye (*Phaseolus vulgaris*) yapraklarından elde edilen kök kuru ağırlık miktarı



Şekil 4.4. Düşük sıcaklıkta yetiştirilen fasulye (*Phaseolus vulgaris*) yapraklarından elde edilen kök kuru ağırlık miktarları



Şekil 4.5. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye (*Phaseolus vulgaris*) yapraklarından elde edilen gövde kuru ağırlık miktarı

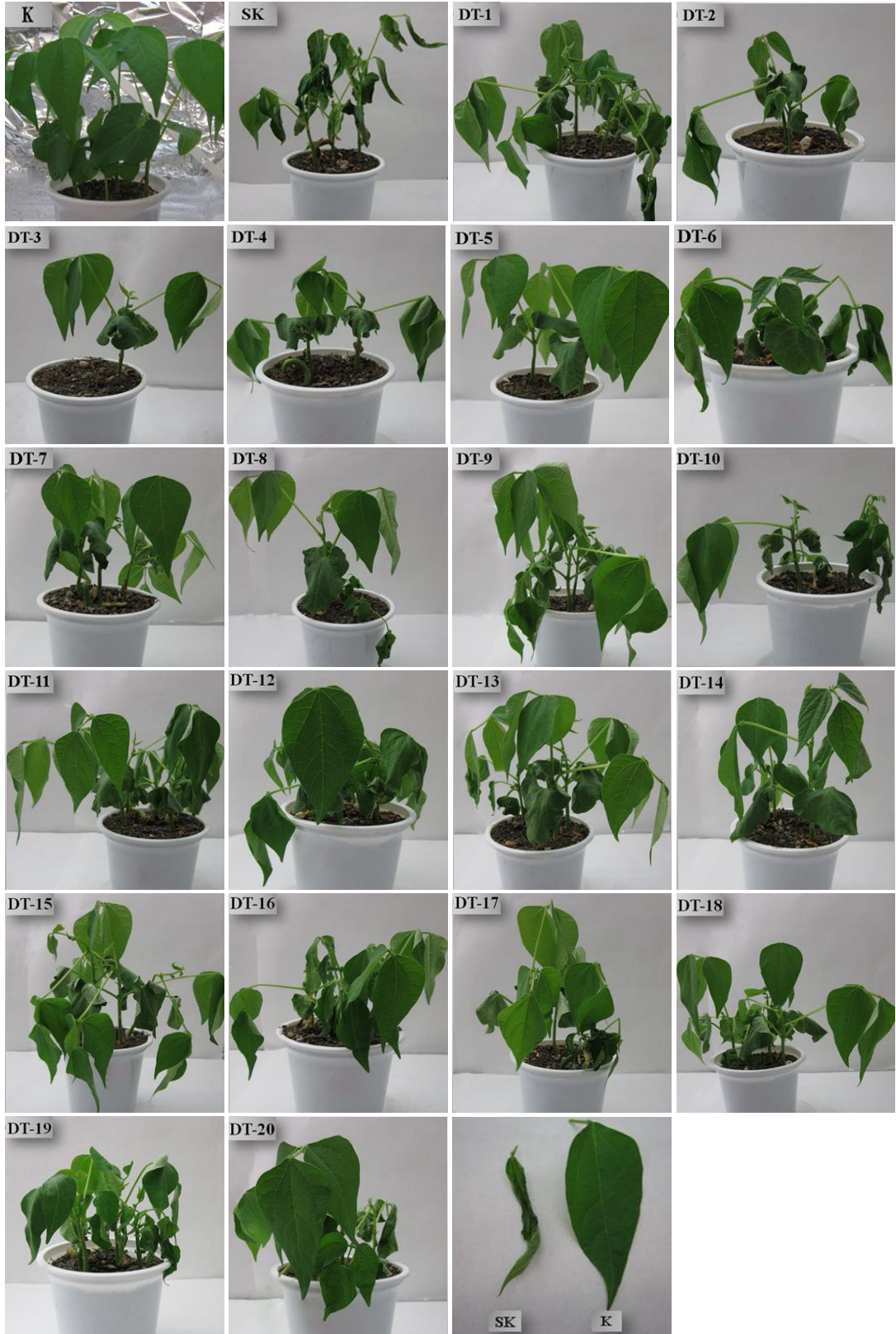


Şekil 4.6. Düşük sıcaklıkta yetiştirilen fasulye (*Phaseolus vulgaris*) yapraklarından elde edilen gövde kuru ağırlık miktarı

4.2. % Donma Hasarı Bulguları

Donma hasarı deneylerinde çok sayıda veri olmasından dolayı bazı durumlarda sonuçların sunulmasında zorluklar yaşanmaktadır. Bu nedenle donma hasarı verilerinin sunumunda daha çok iki soruya cevap verilmeye çalışılmıştır. Birinci olarak yapraklarda %50 hasara sebep olan sıcaklık hangisidir? Çünkü %50'lik bir hasar artık geriye dönüşümü olmayan hasar olarak değerlendirilmektedir. Hasarın bu noktaya gelmesini sağlayan sıcaklık hem kontrolde hem de uygulamalarda özellikle karşılaştırılmıştır. İkinci olarak Genelde kontrol ile uygulamalar arasında ortalama % Donma Hasarı (%DH) farklılığı nedir? Bu da kontrol ve deney gruplarını genel olarak karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.3 incelendiğinde, düşük sıcaklık uygulaması kontrole göre donma hasarını artırmış ve ayrıca donma hasarının daha erken derecelerde başlamasına neden olmuştur. Örneğin -8°C'de kontrol bitki yapraklarındaki %DH 68 iken, soğuk uygulamasıyla 83 olmuştur. Ayrıca kontrolde %DH en fazla 75 olurken, soğuk uygulamasıyla %100'e kadar ulaşmıştır. Aynı çizelgeye tekrar dikkat edilirse, düşük sıcaklık öncesi uygulanan bakteri izolatları yapraklarda %DH'nı önemli ölçüde ($P<0.05$) düşürmüştür.

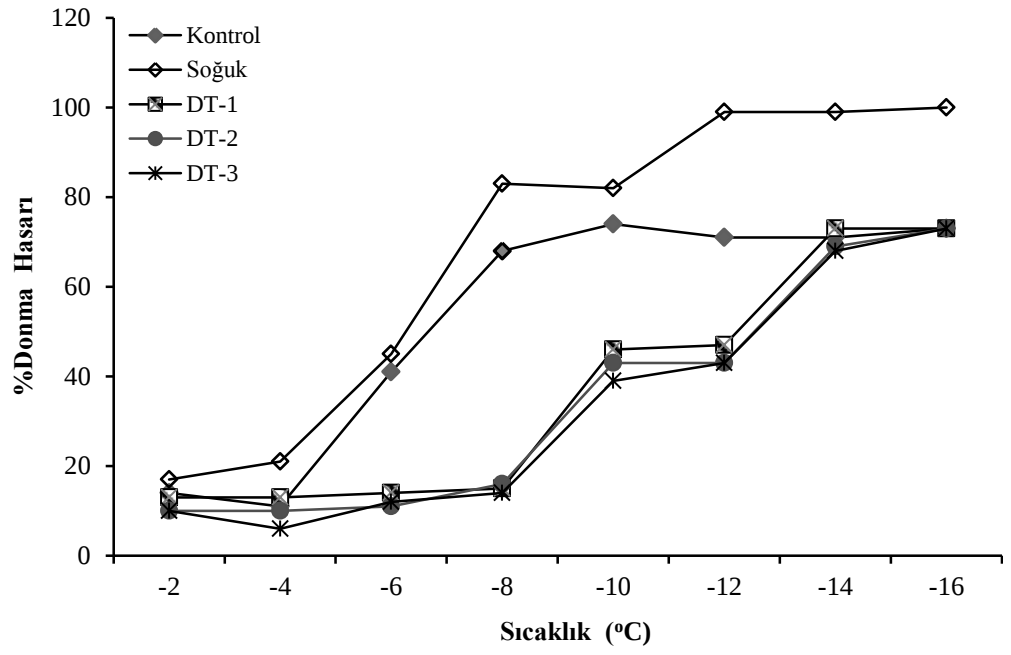
Bunlarla ilgili çarpıcı birkaç örnek vermek gerekirse, tek başına soğuk uygulaması yapılmış yapraklarda %DH'ı -8°C'de %83 iken, DT-1, DT-2, DT-3, DT-10, DT-11 bakteri izolatlarında hasar sırasıyla %15, %16, %14, %14, %13 olmuştur (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.8, 4.11). Uygulanan bakteriler sadece donma hasarını değil aynı zamanda donma noktalarını da geciktirmiştir. Düşük sıcaklık uygulamasında -8°C'de hasar %50'nin üzerine çıkarken bakteri uygulamalarında ise genelde -10°C'de bu değere ulaşmıştır (Çizelge 4.3). Ayrıca -14°C'de bile hemen hemen bütün bakteri izolatları düşük sıcaklığa göre donma hasarını azaltmıştır (Çizelge 4.3). Özetle düşük sıcaklık stresinden önce fasulye yapraklarına uygulanan bakteri izolatlarının hemen hepsi yapraklarda DH'nı geciktirmiş ve genelde düşürmüştür. Bu veriler çalıştığımız fasulyede düşük sıcaklık stresi toleransının artırıldığına katkı yapıldığını göstermektedir.



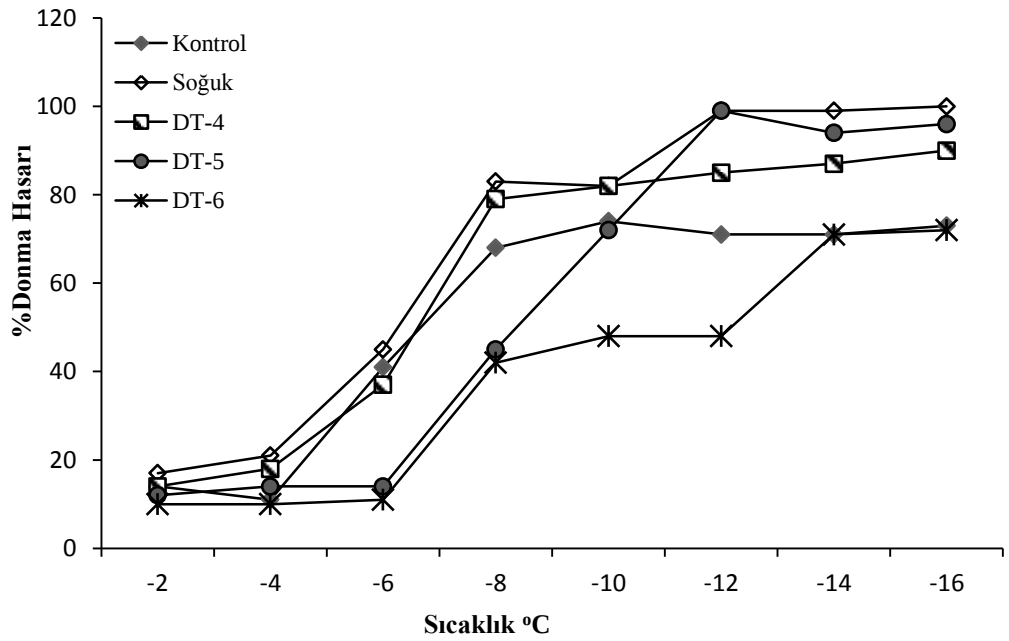
Şekil 4.7. Bakteri uygulanmış ve uygulanmamış fasulye fidelerinin hasattan önceki görsel durumları (K: Kontrol, SK: Soğuk kontrol)

Çizelge 4.3. Kontrol şartlarında büyütülen fasulye fidelerine 10. gün bakteri uygulanmış ve hasattan 3 gün önce soğuğa (9/5°C) transfer edildikten sonra 16. günde kesilen yapraklardan elde edilen % donma hasarı değerleri (K: Kontrol, S: Soğuk).

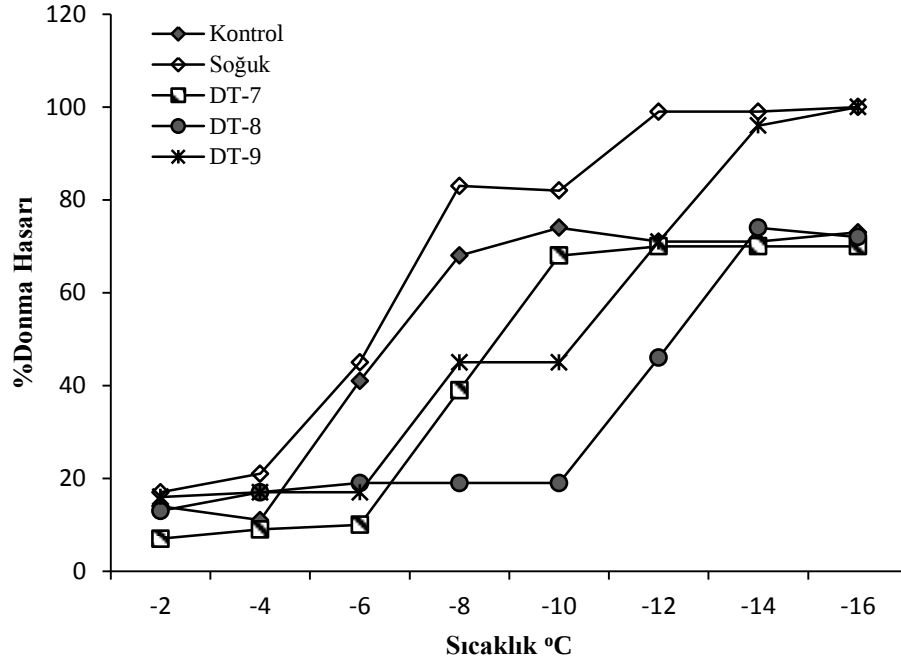
Sıcaklık (°C)	%Donma Hasarı (µS/cm)																					
	K	S	DT-1	DT-2	DT-3	DT-4	DT-5	DT-6	DT-7	DT-8	DT-9	DT-10	DT-11	DT-12	DT-13	DT-14	DT-15	DT-16	DT-17	DT-18	DT-19	DT-20
-2	14	17	13	10	10	14	12	10	7	13	16	11	16	10	13	14	13	16	16	17	9	17
-4	11	21	13	10	6	18	14	10	9	17	17	16	16	14	13	12	15	17	18	18	9	20
-6	41	45	14	11	12	37	14	11	10	19	17	13	18	13	16	17	15	20	15	18	13	41
-8	68	83	15	16	14	79	45	42	39	19	45	14	13	68	48	73	47	46	73	68	40	64
-10	74	82	46	43	39	82	72	48	68	19	45	65	45	98	48	75	46	60	74	75	74	95
-12	71	99	47	43	43	85	99	48	70	46	71	63	70	97	73	96	46	97	99	73	98	95
-14	71	99	73	69	68	87	94	71	70	74	96	96	77	96	75	99	71	97	99	76	97	95
-16	73	100	73	73	73	90	96	72	70	72	100	96	96	98	77	101	78	98	99	76	101	101



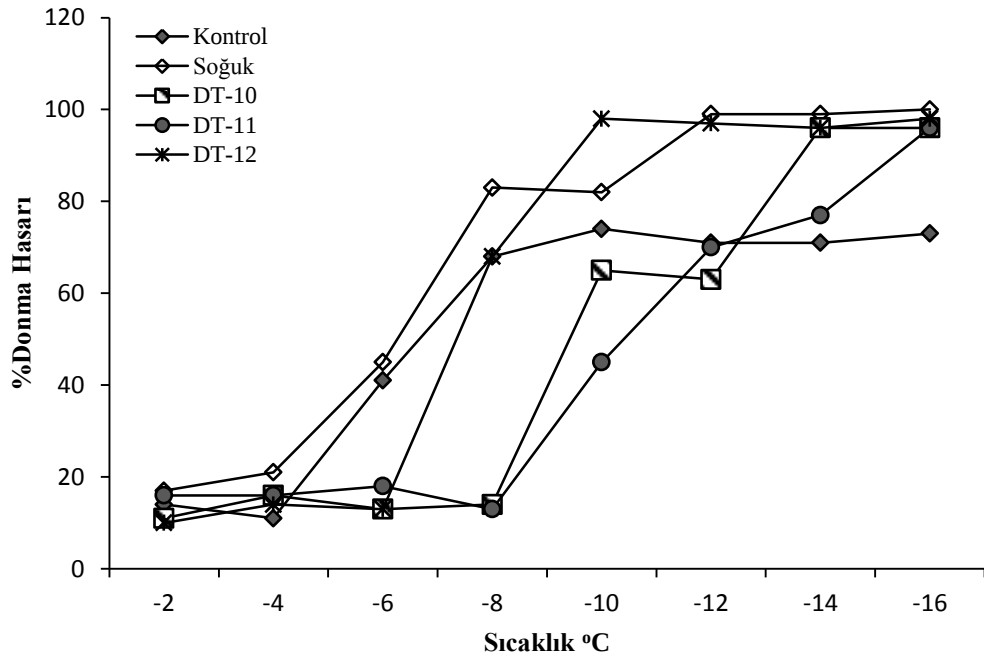
Şekil 4.8. Fasulye yapraklarındaki % donma hasarı değerleri



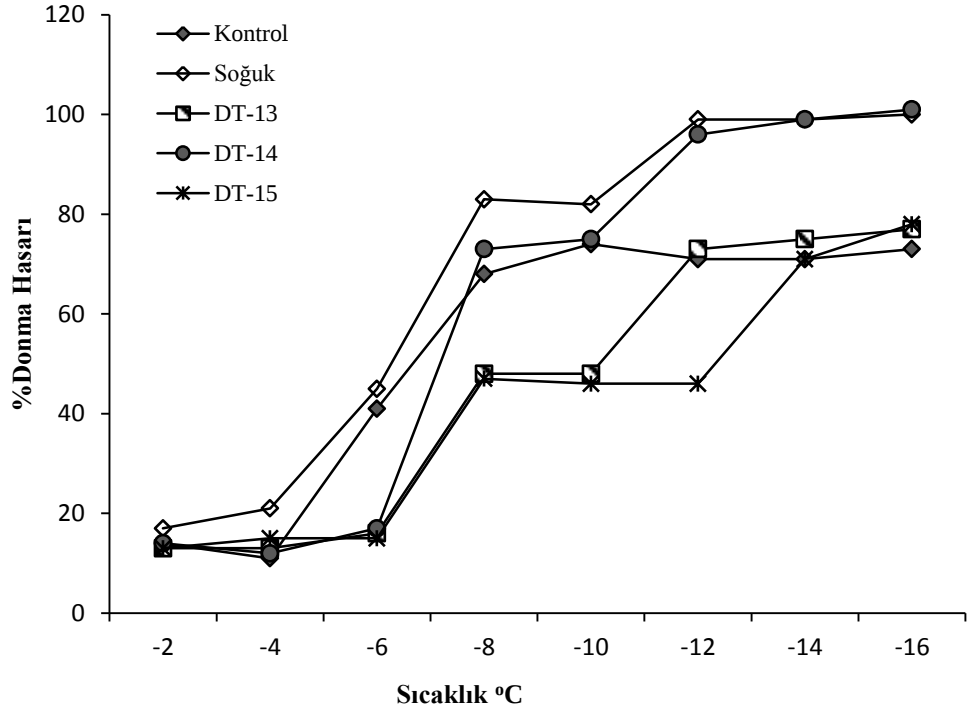
Şekil 4.9. Fasulye yapraklarındaki % donma hasarı değerleri



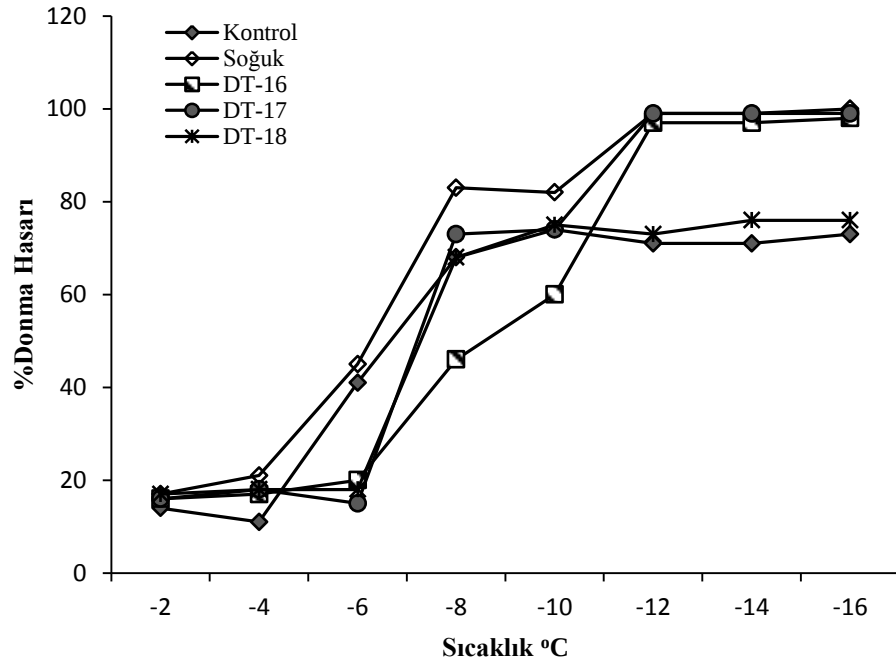
Şekil 4.10. Fasulye yapraklarındaki % donma hasarı değerleri



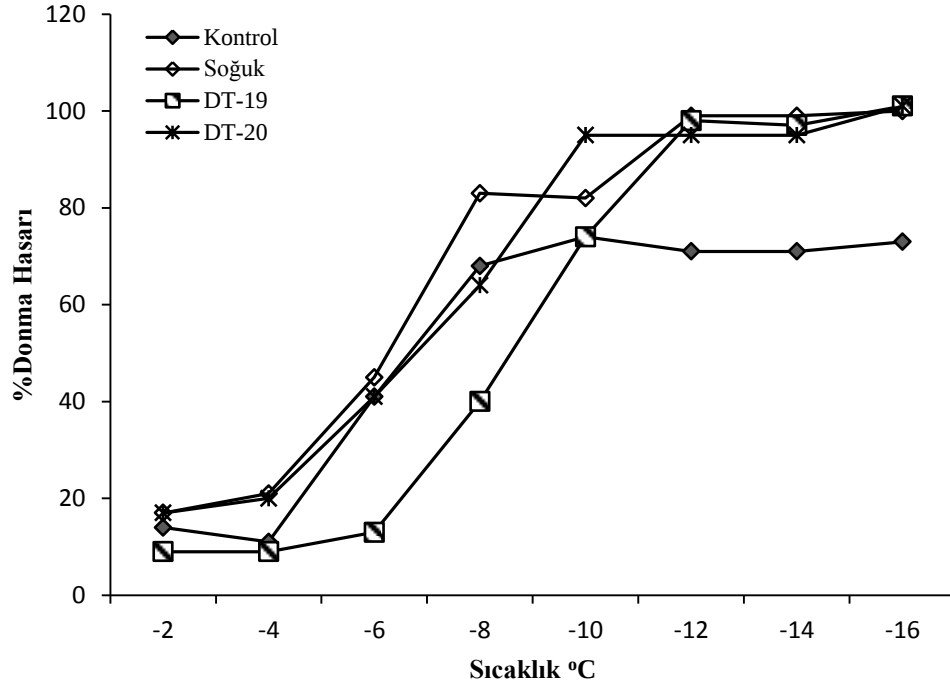
Şekil 4.11. Fasulye yapraklarındaki % donma hasarı değerleri



Şekil 4.12. Fasulye yapraklarındaki % donma hasarı değerleri



Şekil 4.13. Fasulye yapraklarındaki % donma hasarı değerleri



Şekil 4.14. Fasulye yapraklarındaki % donma hasarı değerleri

4.3. Buz Nükleasyon Aktivitesi (BNA) Sonuçları

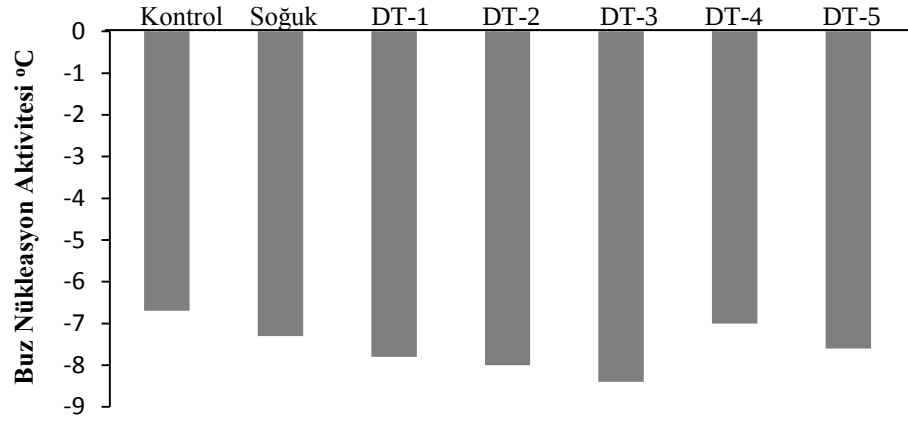
Apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi (donma noktasının geciktirilmesi) sonuçları Çizelge 4.4 ve Şekil 4.15, 4.16, 4.17, 4.18’de sunulmuştur. Buz nükleasyon aktivitesi (BNA), soğuk ve soğuk+bakteri uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir.

Kontrol şartlarındaki bitki yaprak apoplastik proteinlerin donma noktası (BNA) $-6,7^{\circ}\text{C}$ olarak belirlenmiştir. Ancak soğuğa maruz kalmış bitki yaprak BNA ise $-7,3^{\circ}\text{C}$ olmuştur. Bu durum soğuk şartlarda yaprak apoplastik alanına bazı ekstra proteinlerin salgılandığını ve bu proteinlerin donma noktasını düşürmede rol aldığına işaret eder. Soğuk+bakteri uygulamaları tek başına soğuk uygulama ile kıyaslandığında BNA’inde önemli bir artışa (donma noktasının düşüşüne) neden olmuştur, yani donma noktası önemli derecede ($P<0.05$) geciktirilmiştir. Örneğin; DT-3 bakteri uygulaması düşük sıcaklığa göre aktiviteyi %15 artırarak donma noktasını $1,1^{\circ}\text{C}$ geciktirmiştir. DT-12 ve DT-14 bakteri uygulamaları düşük sıcaklığa göre aktiviteyi %22 oranında artırarak

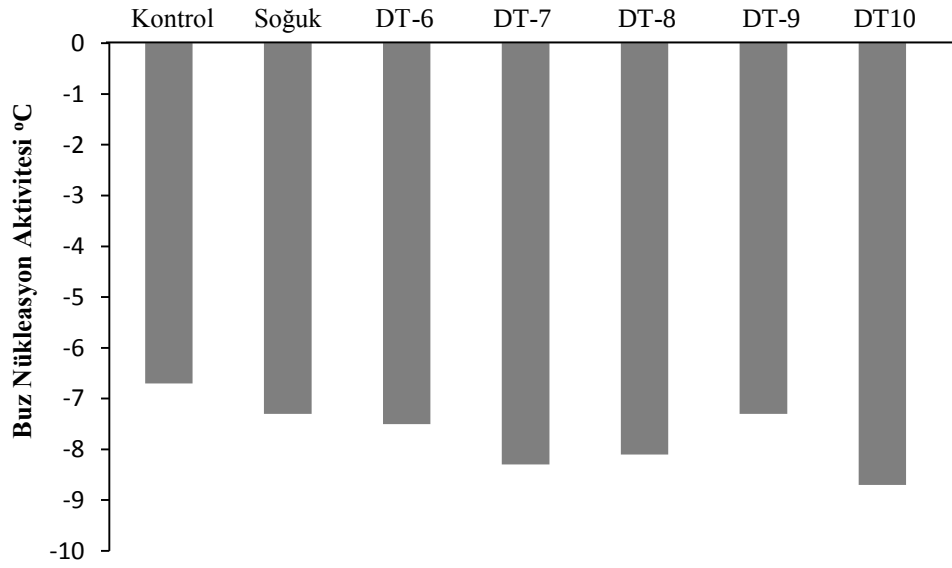
donma noktasını 1.6°C geciktirmiştir. DT-18 bakterisi aktiviteyi %24.6 arttırarak donma noktasını 1.8°C geciktirmiş, DT-16 bakteri uygulaması da aktiviteyi %28.7 arttırarak donma noktasını 2.1°C geciktirmiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.15, 4.17, 4.18). Özetle düşük sıcaklık stresinden önce fasulye yapraklarına uygulanan bakteri izolatlarının hemen hepsi, apoplastik proteinlerin BNA'ni arttırmıştır. Bu veriler çalıştığımız bakteri uygulamaları ile fasulyede düşük sıcaklık stresi toleransının arttırıldığına katkı yapıldığına işaret eder.

Çizelge 4.4. Fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik buz nükleasyon değerleri

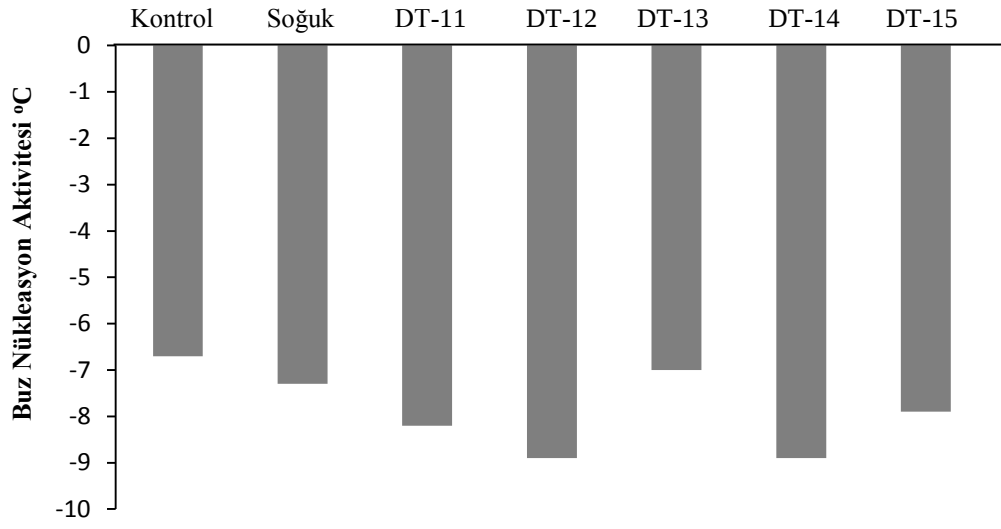
İzolat No	Sıcaklık (°C)
Kontrol	-6,7
Soğuk	-7,3
DT-1	-7,8
DT-2	-8,0
DT-3	-8,4
DT-4	-7,0
DT-5	-7,6
DT-6	-7,5
DT-7	-8,3
DT-8	-8,1
DT-9	-7,3
DT-10	-8,7
DT-11	-8,2
DT-12	-8,9
DT-13	-7,0
DT-14	-8,9
DT-15	-7,9
DT-16	-9,1
DT-17	-7,9
DT-18	-9,4
DT-19	-8,8
DT-20	-7,5



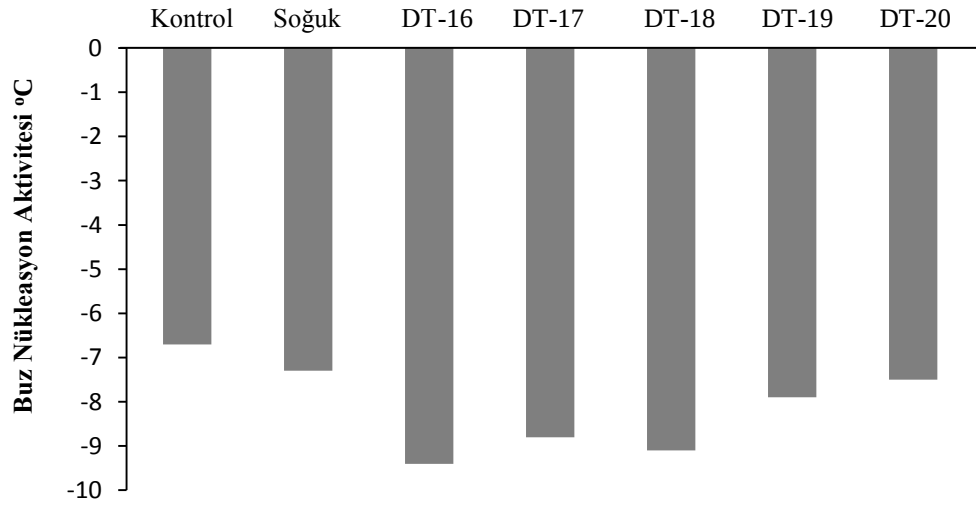
Şekil 4.15. Fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik buz nükleasyon aktivite değerleri



Şekil 4.16. Fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik buz nükleasyon aktivite değerleri



Şekil 4.17. Fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik buz nükleasyon aktivite değerleri



Şekil 4.18. Fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik buz nükleasyon aktivite değerleri

4.4. Antioksidan Enzimlerin Aktivitelerine Ait Bulgular

4.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi bulguları

4.4.1.a. Apoplastik SOD aktivitesi bulguları

Apoplastik SOD aktivitesi fasulye bitkisi yapraklarında hem soğuk hem de soğuk+bakteri uygulamalarından önemli ($P<0.05$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.20).

Normal şartlarda yetiştirilen bitkilerin bakteri uygulamaları kontrole göre SOD aktivitesinde genelde artışa neden olmuştur. Örneğin; Kontrol bitkisinin yapraklarındaki apoplastik SOD aktivitesi $462.32 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken, DT-18 bakteri uygulaması bu değer %95'lik artışla $902.21 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-10 bakteri uygulaması ile %70'lik artışla $788.75 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-17 bakteri uygulaması ile %94'lük artışla $900.39 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Diğer bakterilerde de benzer artışlara neden olmuştur (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.19).

Düşük sıcaklık ise kontrole göre apoplastik SOD aktivitesinde önemli ($P<0.05$) bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki apoplastik SOD aktivitesi $462.32 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %41'lik bir artışla $651.19 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bakteri uygulamaları ile aktivitede yine artış gözlenmiştir. Düşük sıcaklıkla apoplastik SOD aktivitesi $651.19 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken, bu değer DT-8, DT-10, DT-13, DT-15 bakteri uygulamaları ile sırayla %75'lik artışla $1145.39 \text{ EU.mg}^{-1}$, %44'lük artışla $939.15 \text{ EU.mg}^{-1}$, %70'lik artışla $1107.46 \text{ EU.mg}^{-1}$, %57'lik artışla $1026.74 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Diğer bakteri uygulamaları da aktivitede artışa neden olmuştur (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.20).

4.4.1.b. Hücresel SOD aktivitesi bulguları

Hücresel SOD aktivitesi fasulye bitkisi yapraklarında hem soğuk hem de soğuk+ bakteri uygulamalarından önemli ($P<0.05$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.22).

Normal şartlarda yetiştirilen bitkilerin bakteri uygulamaları kontrole göre SOD aktivitesinde genelde artışa neden olmuştur. Örneğin; Kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücresel SOD aktivitesi $454.15 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken, DT-8 bakteri uygulaması bu değer %77'lik artışla $807.35 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-10 bakteri uygulaması ile %100'den fazla artışla $919.45 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-17 bakteri uygulaması ile %79'luk artışla $813.20 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. DT-19 bakterisi ise %23'lük bir düşüşe neden olmuştur (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.21).

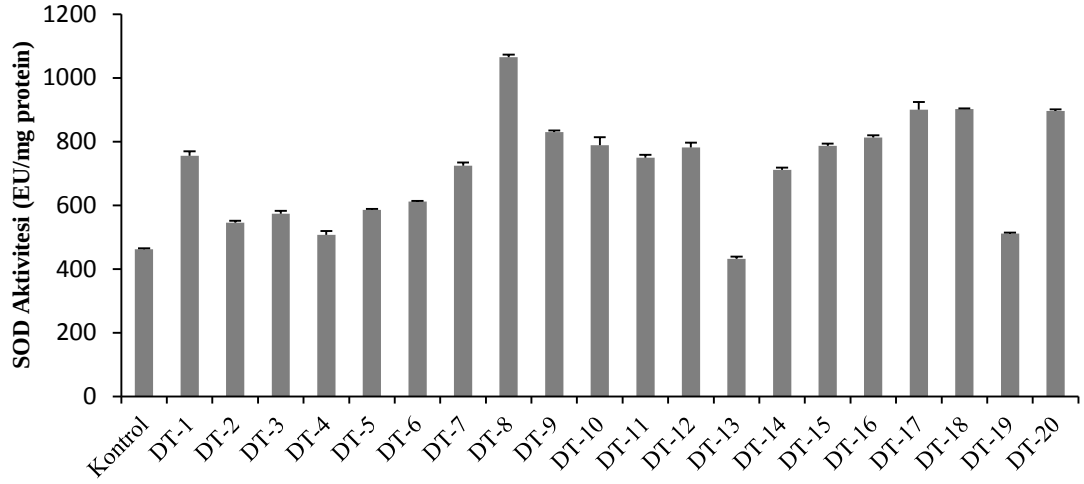
Düşük sıcaklık kontrole göre hücresel SOD aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarında hücresel SOD aktivitesi $454.15 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %50'lik bir artışla $685.17 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

Bakteri uygulamaları ile hücresel SOD aktivitesinde genelde artış gözlenmiştir. Düşük sıcaklık ile hücresel SOD aktivitesi $685.17 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken, bu değer DT-12 bakteri uygulaması ile %59'luk bir artışla $1091.62 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-15 bakteri uygulaması ile %49'luk artışla $1026.31 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak gözlenmiştir. Ancak, DT-19 bakterisi ile %30'luk aktivite düşüş ile 49.55 EU.mg^{-1} , DT-20 bakterisi ile %14'lük düşüş ile $587.91 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. DT-18 bakteri uygulaması ise istatistiki olarak önemli olmayan düşüşe neden olmuştur (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.22).

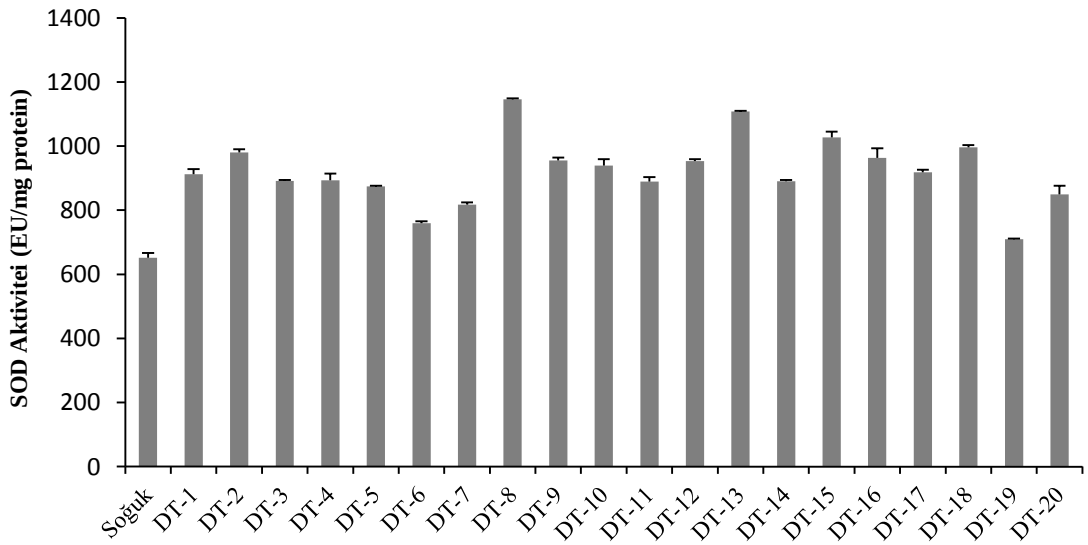
Çizelge 4.5. Apoplastik ve Hücresel SOD aktivitesi sonuçları. Sonuçlar EU/mg protein cinsinden verilmiştir

İzolat No	Kontrol (25/22°C)		Soğuk (9/5°C)	
	Apoplast	Hücresel	Apoplast	Hücresel
Kontrol	462,32±3,11	454,15±4,36	651,19±15,74	685,17±7,53
DT-1	755,12±14,01*	711,39±3,23*	911,82±16,68*	925,98±32,26*
DT-2	545,72±5,21	511,33±3,74	980,27±9,37*	960,26±26,71*
DT-3	573,28±9,77	540,59±6,00	891,50±3,13*	856,24±3,45
DT-4	507,58±11,31	481,69±4,98	893,53±21,02*	789,02±2,82
DT-5	585,39±3,14*	548,16±2,33	874,63±2,12	824,31±1,29
DT-6	611,92±1,52*	586,59±2,96	759,61±6,24	738,14±15,47
DT-7	724,03±10,68*	718,61±9,35*	817,84±6,75	813,66±0,54
DT-8	1064,74±7,73*	807,35±4,45*	1145,39±3,21*	872,07±5,19*
DT-9	829,80±4,51*	1000,10±2,14*	955,33±8,53*	1077,9±5,49*
DT-10	788,75±2,23*	919,45±8,04*	939,15±19,96*	1042,10±2,49*
DT-11	749,73±8,18*	862,14±19,10*	889,36±13,45*	1042,71±9,14*
DT-12	781,48±14,70*	889,89±10,27*	953,61±5,45*	1091,62±6,35*
DT-13	432,24±6,21	410,55±7,14	1107,46±2,26*	1079,99±50,06*
DT-14	711,01±6,86*	659,47±5,30*	890,54±3,37*	834,35±7,87
DT-15	786,67±6,50*	701,93±6,60*	1026,74±18,70*	1026,31±37,19*
DT-16	812,84±6,76*	805,27±8,40*	963,47±30,01*	950,89±46,31*
DT-17	900,39±23,59*	813,20±15,30*	917,81±8,21*	874,20±13,66*
DT-18	902,21±2,20*	615,45±3,37*	996,44±6,24*	678,29±2,23
DT-19	511,19±3,37	346,57±1,39	709,98±1,89	479,55±2,88*
DT-20	895,72±4,94*	589,26±3,89	849,02±27,10*	587,91±12,48

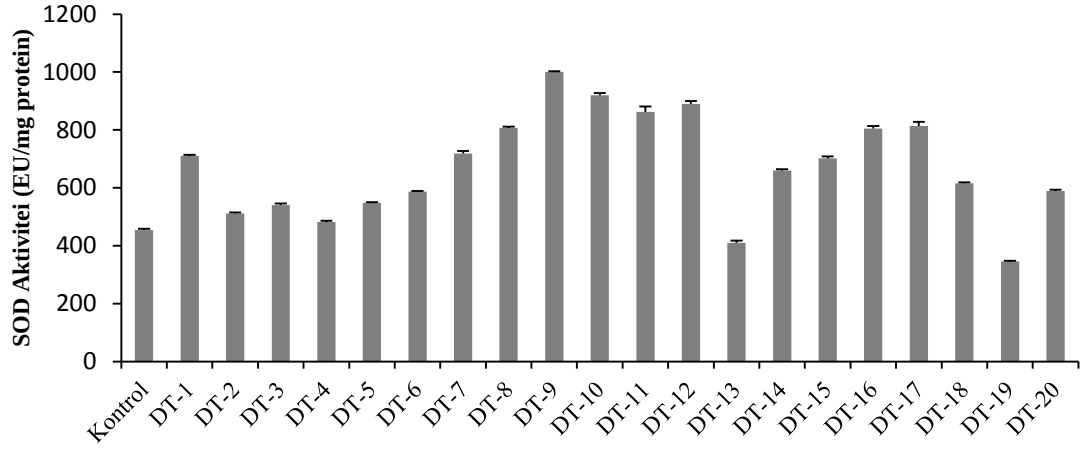
*Duncan Testine göre P<0.05 hata seviyesinde kontrol değerinden önemli farklılığı ifade eder. ± Standart hatayı gösterir



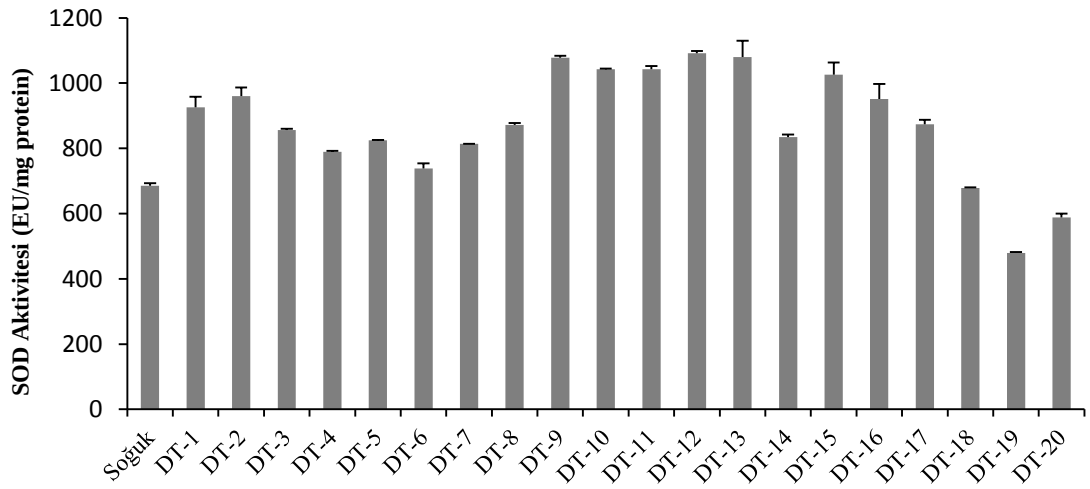
Şekil 4.19. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen apoplastik SOD aktivitesi değerleri



Şekil 4.20. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik SOD aktivitesi değerleri



Şekil 4.21. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen hücresel SOD aktivitesi değerleri



Şekil 4.22. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen hücresel SOD aktivitesi değerleri

4.4.2. Katalaz (CAT) aktivitesi bulguları

4.4.2.a. Apoplastik CAT aktivitesi

Apoplastik CAT aktivitesi fasulye bitkisi yapraklarında hem soğuk hem de soğuk+bakteri uygulamalarından önemli ($P<0.05$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.23, 4.24).

Normal şartlarda yetiştirilen bitkilere bakteri uygulamaları kontrole göre CAT aktivitesinde genelde artışa neden olmuştur. Örneğin; kontrol bitkisinin yapraklarındaki apoplastik CAT aktivitesi 1.317 EU.mg^{-1} iken, DT-12 bakteri uygulaması bu değer %15'lik artışla 1.51 EU.mg^{-1} , DT-3 bakteri uygulaması ile %22'lik artışla 1.609 EU.mg^{-1} olarak belirlenmiştir. DT-2, DT-10, DT-13, DT-20 bakterilerinde aktivite artışı %100'ün üzerinde olmuştur DT-1, DT-9, DT-14, DT-18, DT-19 bakterileri ise aktiviteyi sırasıyla %36, %49, %25, %40, %51 oranında düşürmüştür (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.23).

Düşük sıcaklık ise kontrole göre apoplastik CAT aktivitesinde önemli ($P<0.05$) bir düşüşe neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki apoplastik CAT aktivitesi 1.317 EU.mg^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulaması ile bu değer %27'lik önemli ($P<0.05$) bir düşüşle 0.950 EU.mg^{-1} olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan bazı bakteri uygulamaları düşük sıcaklıkta Apoplastik CAT aktivitesini düşürürken, bazıları da artırmıştır. Örneğin, düşük sıcaklıkla apoplastik CAT aktivitesi 0.950 EU.mg^{-1} iken, bu değer DT-5 bakteri uygulaması için %37'lik düşüşle 0.596 EU.mg^{-1} , DT-3 bakteri uygulaması için %44'lük önemli bir düşüşle 0.532 EU.mg^{-1} olarak belirlenmiştir. DT-2, DT-14 gibi bakteri izolatları düşük sıcaklıkla azalan CAT aktivitesini sırasıyla %86, %95'lik önemli ($P<0.05$) bir artışla 1.769 EU.mg^{-1} , 1.860 EU.mg^{-1} olarak belirlenmiştir. DT-4, DT-9, DT-10, DT-20 bakterileri de düşük sıcaklığa göre %100'den daha fazla oranda aktiviteyi artırmıştır DT-1, DT-3, DT-5, DT-6, DT-8 bakteri izolatları ise aktiviteyi %32, %44, %37, %17, %23 oranında düşürmüştür (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.24).

4.4.2.b. Hücresel CAT aktivitesi

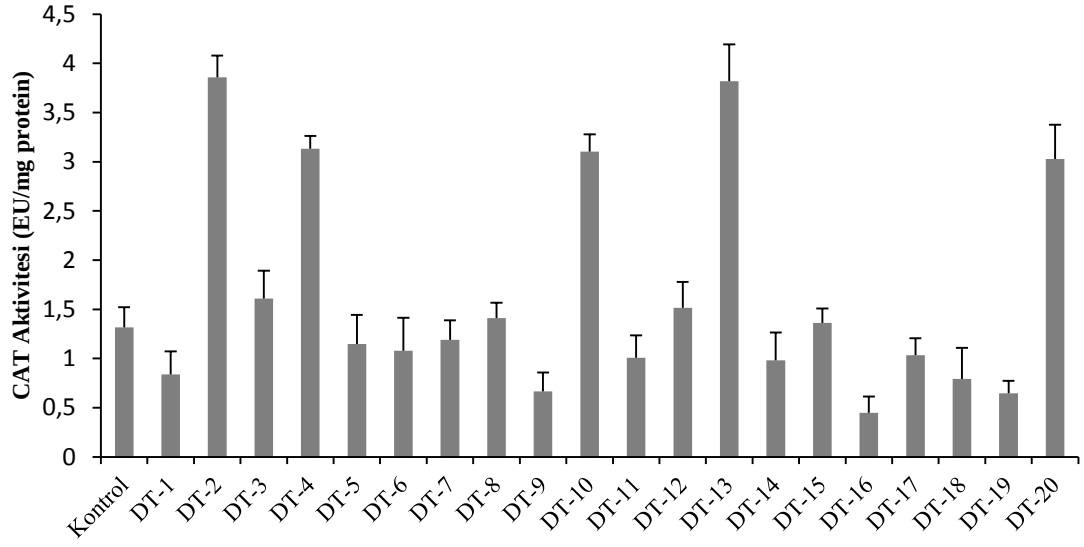
Normal şartlardaki bitkilere yapılan bakteri uygulamaları, hücresel CAT aktivitesinde önemli ($P<0.05$) bir artışa neden olmuştur. Örneğin, kontrol yapraklarındaki CAT aktivitesi 5.398 EU.mg^{-1} iken, DT-8 bakteri uygulaması ile bu değer %25'lik artışla 6.772 EU.mg^{-1} , DT-9 bakteri uygulaması ile %38'lik artışla 7.795 EU.mg^{-1} , DT-19 bakteri uygulaması ile %31'lik artışla 7.095 EU.mg^{-1} olarak belirlenmiştir. Hücresel CAT aktivitesinde düşüşte gözlenmiştir. Örneğin; DT-13, DT-14, DT-15, DT-17 bakteri izolatları kontrole göre aktiviteyi sırasıyla %48, %30, %40, %34 oranında düşürmüştür (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.25).

Düşük sıcaklık kontrole göre, hücresel CAT aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Örneğin, kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücresel CAT aktivitesi 5.398 EU.mg^{-1} iken düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %77'lik önemli ($P<0.05$) bir artışla 9.576 EU.mg^{-1} olarak belirlenmiştir. Bakteri uygulamalarının düşük sıcaklıkla artan CAT aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile CAT aktivitesi 9.576 EU.mg^{-1} iken, bu değer DT-8 bakterisi için %46'lık önemli ($P<0.05$) bir düşüşle 5.086 EU.mg^{-1} , DT-10 bakterisi için %48'lik düşüşle 4.927 EU.mg^{-1} , DT-14 bakterisi için ise %64'lük düşüşle 3.438 EU.mg^{-1} olarak belirlenmiştir. Diğer bakterilerde de düşüş gözlenmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.26).

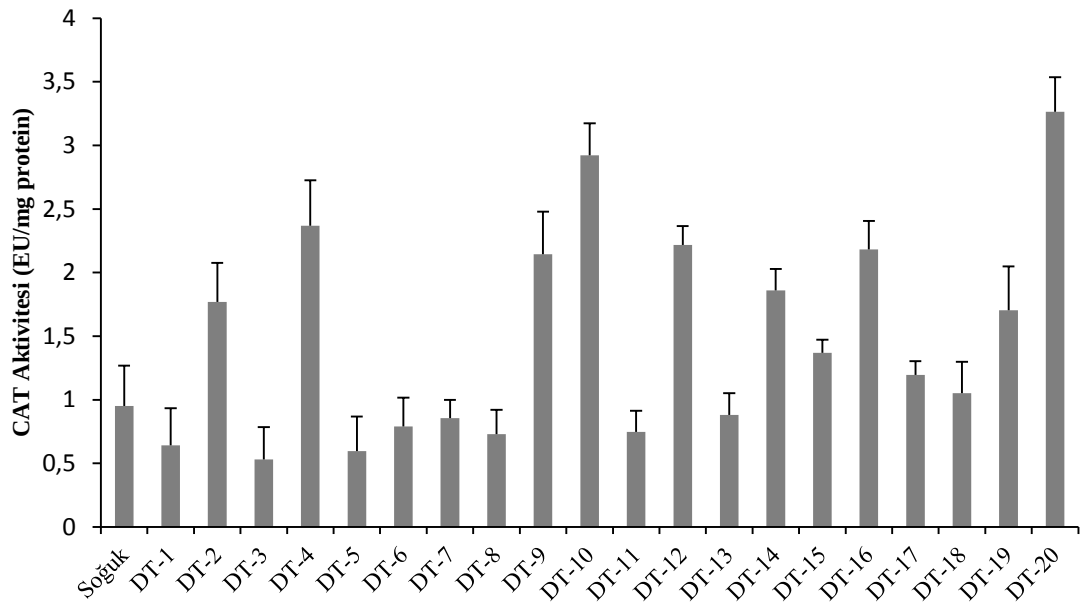
Çizelge 4.6. Apoplastik ve hücresel CAT aktivitesi sonuçları. Sonuçlar EU/mg protein cinsinden verilmiştir

İzolat No	Kontrol (25/22°C)		Soğuk (9/5°C)	
	Apoplast	Hücresel	Apoplast	Hücresel
Kontrol	1,317±0,21	5,398±0,27	0,950±0,32	9,576±0,40
DT-1	0,838±0,23*	5,353±0,17*	0,641±0,29*	10,737±0,32
DT-2	3,859±0,22*	5,566±0,15	1,769±0,31*	8,603±0,34
DT-3	1,609±0,28*	6,185±0,18*	0,532±0,25*	8,695±0,15
DT-4	3,132±0,13*	4,633±0,19*	2,367±0,36*	6,228±0,20*
DT-5	1,148±0,30	3,772±0,36*	0,596±0,27*	7,543±0,15
DT-6	1,079±0,34*	5,936±0,31	0,790±0,23*	5,332±0,16*
DT-7	1,190±0,20	6,216±0,24	0,856±0,14	6,512±0,20*
DT-8	1,410±0,16	6,772±0,49	0,729±0,19*	5,086±0,21*
DT-9	0,666±0,19*	7,495±0,20	2,144±0,33*	7,850±0,13
DT-10	3,102±0,18*	6,037±0,24*	2,921±0,25*	4,927±0,22*
DT-11	1,007±0,23*	6,842±0,11*	0,747±0,17	5,395±0,11*
DT-12	1,514±0,26	5,938±0,32	2,217±0,15*	4,223±0,13*
DT-13	3,818±0,37*	3,028±0,13*	0,882±0,17	4,165±0,13*
DT-14	0,982±0,28*	3,755±0,19*	1,860±0,17*	3,438±0,66*
DT-15	1,361±0,15	3,246±0,31*	1,368±0,11*	4,052±0,11*
DT-16	0,448±0,16*	4,986±0,36*	2,182±0,22*	6,227±0,33*
DT-17	1,032±0,17*	3,549±0,20*	1,195±0,11*	4,245±0,26*
DT-18	0,793±0,31*	4,184±0,26*	1,051±0,25	3,613±0,56*
DT-19	0,645±0,13*	7,095±0,45	1,704±0,35*	7,624±0,21
DT-20	3,028±0,35*	5,279±0,45*	3,265±0,27*	8,066±0,39

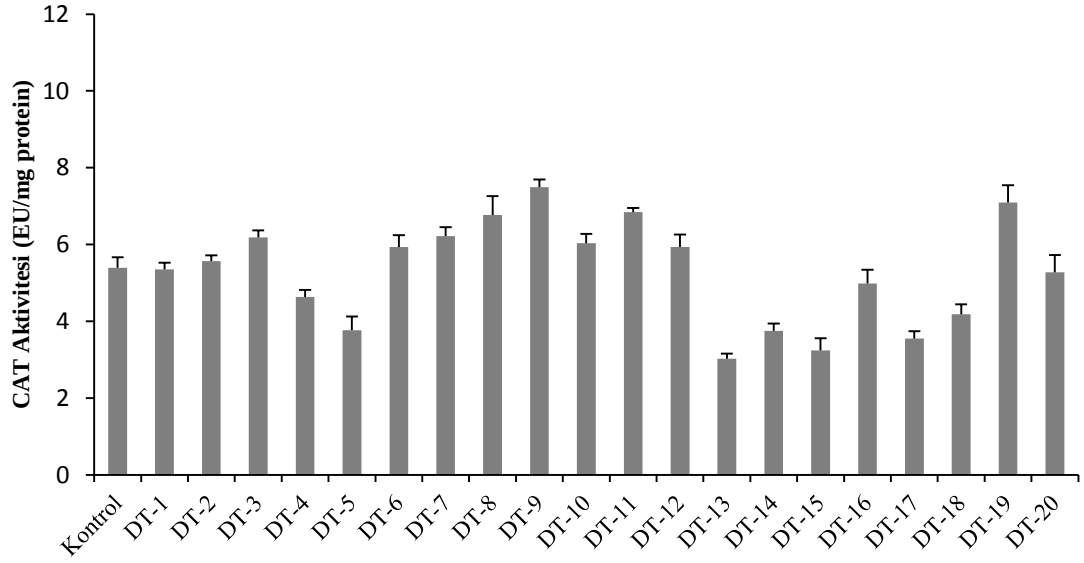
*Duncan Testine göre P<0.05 hata seviyesinde kontrol değerinden önemli farklılığı ifade eder. ± Standart hatayı gösterir



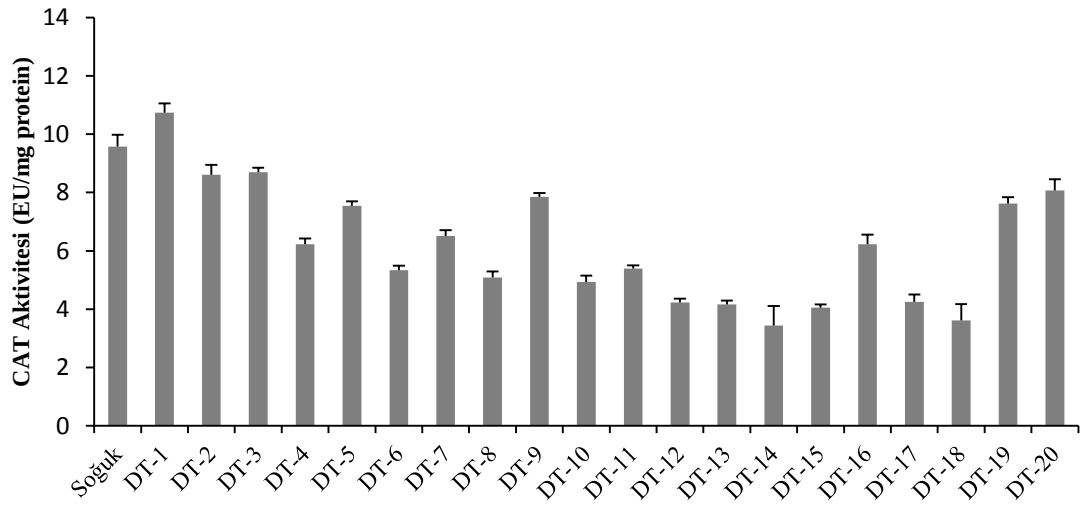
Şekil 4.23. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen apoplastik CAT aktivitesi değerleri



Şekil 4.24. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik CAT aktivitesi değerleri



Şekil 4.25. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen hücresel CAT aktivitesi değerleri



Şekil 4.26. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen hücresel CAT aktivitesi değerleri

4.4.3. Peroksidaz (POX) aktivitesi bulguları

4.4.3.a. Apoplastik POX aktivitesi

Apoplastik POX aktivitesi yapraklarda hem soğuk hem de soğuk+bakteri uygulamalarından önemli ($P<0.05$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.28).

Normal şartlarda yetiştirilen bitkilerin bakteri uygulamaları kontrole göre POX aktivitesinde genelde artışa neden olmuştur. Örneğin; Kontrol bitkisinin yapraklarındaki apoplastik POX aktivitesi $1059.42 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken, DT-6 bakteri uygulaması bu değer %78'lik artışla $1867.59 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-18 bakteri uygulaması ile %59'luk artışla $1691.91 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.27).

Düşük sıcaklık uygulaması kontrole göre POX aktivitesinde önemli ($P<0.05$) bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki apoplastik POX aktivitesi $1059.42 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer, $2297.14 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile apoplastik POX aktivitesi $2297.14 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken, bu değer DT-1 bakterisi için %52'lik düşüşle $1083.06 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-15 bakterisi için %44'lük düşüşle $1276.23 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-9 bakterisi için %69'luk artışla $3882.48 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-10 bakterisi için %39'luk artışla $3191.30 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. DT-2, DT-5, DT-11,DT-12, DT-20 bakterilerinde de önemli olmayan artışlar gözlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.28).

4.4.3.b. Hücrel POX aktivitesi

Normal şartlarda yetiştirilen bitkilerde kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücrel POX aktivitesi $1375.90 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken, DT-14 bakteri uygulaması bu değer %24'lük artışla $1714.93 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-16 bakteri uygulaması ile %25'lik artışla $1730.35 \text{ EU.mg}^{-1}$, olarak belirlenmiştir. DT-13, DT-15, DT-17, DT-19, DT-20 bakteri uygulamalarında da artış gözlenmiştir. Ancak DT-1, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12 izolatlarında sırasıyla %44,

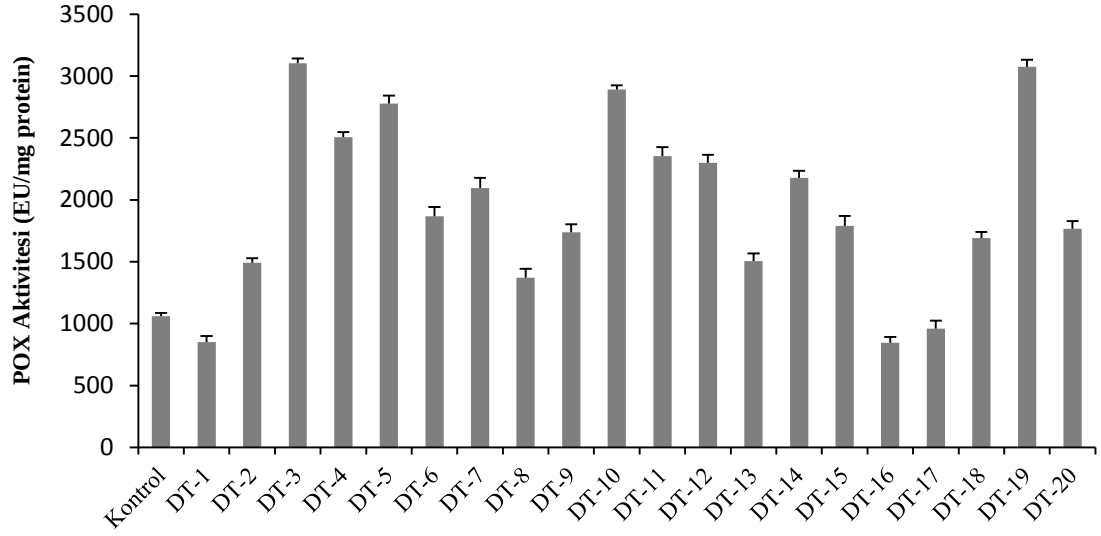
%29, %50, %44, %55, %63, %57, %49, %49 oranında kontrole göre aktivitede düşüş gözlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.29).

Düşük sıcaklık kontrole göre hücrel POX aktivitesinde önemli ($P<0.05$) düşüşe neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücrel POX aktivitesi $1375.90 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer $1321.27 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bakteri uygulamaları da aktivitede azalmaya yol açmıştır. Örneğin, düşük sıcaklık ile hücrel POX aktivitesi $1321.27 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken bu değer DT-3 bakterisi için %66'lık düşüşle $451.09 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-9 bakterisi için %54'lük düşüşle $598.52 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-14 bakterisi için %34'lük artışla $1772.70 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-20 bakterisi için %24'lük artışla $1640.72 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir, DT-15 ve DT-16 bakterilerinde de artış gözlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.30).

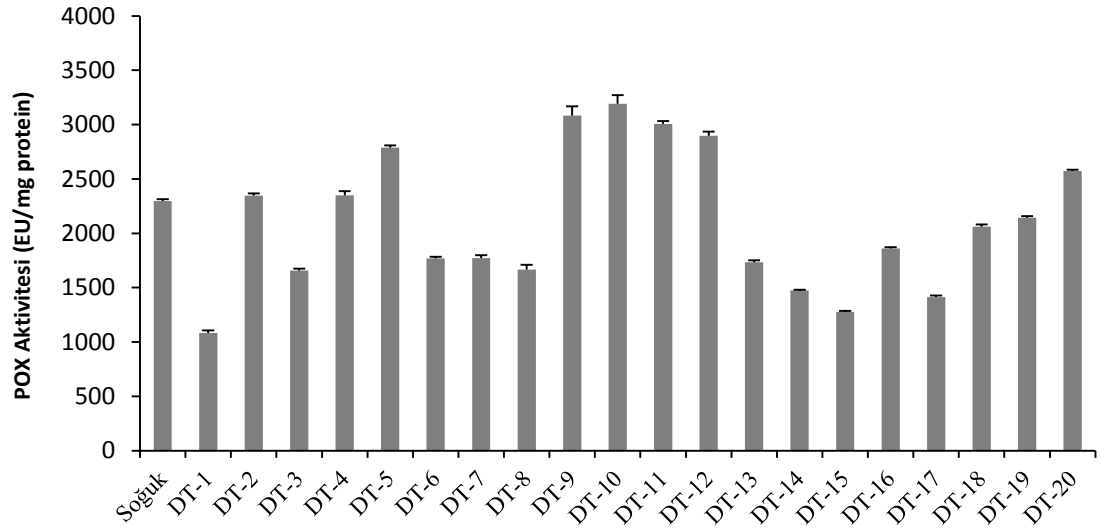
Çizelge 4.7. Apoplastik ve Hücresel POX aktivitesi sonuçları. Sonuçlar EU/mg protein cinsinden verilmiştir

İzolot No	Kontrol (25/22 °C)		Soğuk (9/5 °C)	
	Apoplast	Hücresel	Apoplast	Hücresel
Kontrol	1059,42±26,82	1375,90±94,44	2297,14±18,37	1321,27±26,16
DT-1	851,50±48,81*	770,84±72,05*	1083,06±24,72*	1009,61±36,13
DT-2	1491,05±37,74*	1007,29±51,47*	2345,13±20,65	620,69±22,36*
DT-3	3103,37±38,95*	976,59±60,77*	1658,01±16,92*	451,09±16,62*
DT-4	2505,91±40,91*	690,30±23,64*	2348,48±38,96	746,35±39,06*
DT-5	2777,77±64,09*	1061,91±39,59	2789,30±19,40	672,90±20,26*
DT-6	1867,59±75,46*	1362,62±66,79	1768,44±14,96	867,24±32,75*
DT-7	2094,90±82,58*	767,19±37,81*	1772,35±26,45	709,79±48,49*
DT-8	1370,018±73,73*	622,22±24,07*	1665,02±44,73*	1090,79±44,81
DT-9	1736,41±65,68*	501,07±50,01*	3882,48±84,59*	598,52±70,29*
DT-10	2889,78±34,16*	591,79±44,23*	3191,30±79,46*	618,40±82,90*
DT-11	2354,42±72,24*	695,62±75,59*	3004,80±28,80*	468,75±39,46*
DT-12	2299,25±65,17*	699,84±60,12*	2897,95±37,78*	622,32±80,30*
DT-13	1504,27±63,15*	1713,58±82,32	1734,65±16,97	693,49±69,74*
DT-14	2178,33±54,64*	1714,93±37,52	1473,96±7,8*	1772,70±41,30*
DT-15	1788,32±81,77*	1514,37±20,70	1276,23±11,24*	1353,85±33,72
DT-16	845,01±46,81	1730,35±30,90	1860,94±10,89	1570,19±39,54
DT-17	959,75±63,57	1451,83±26,57	1412,66±15,92*	1217,06±29,79
DT-18	1691,91±48,77*	1129,14±99,65	2061,26±21,35	878,70±53,70*
DT-19	3073,69±57,56*	1377,19±98,41	2144,22±13,64	863,32±28,10*
DT-20	1766,38±61,20*	1560,51±38,60	2572,68±13,48	1640,72±39,05

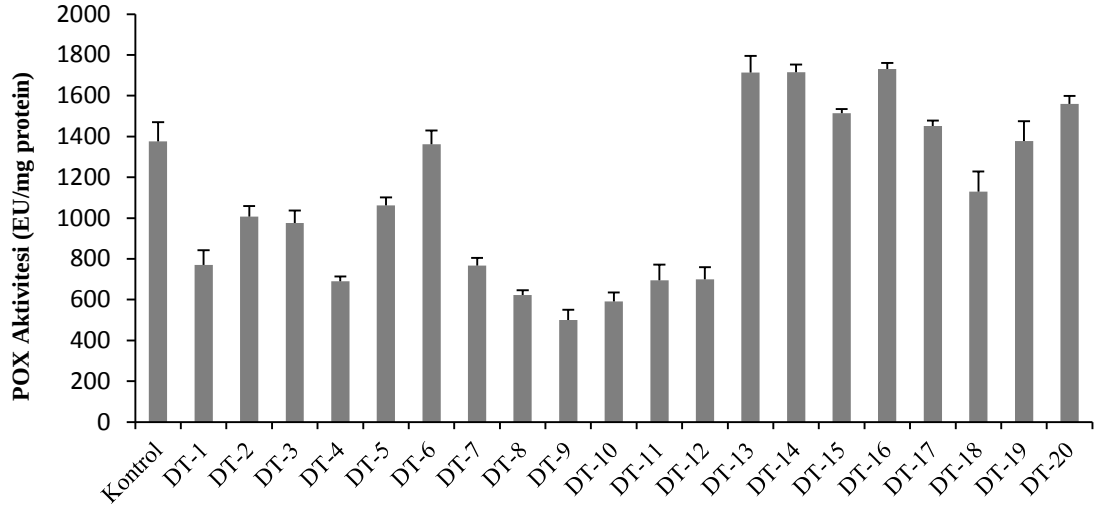
*Duncan Testine göre P<0.05 hata seviyesinde kontrol değerinden önemli farklılığı ifade eder. ± Standart hatayı gösterir



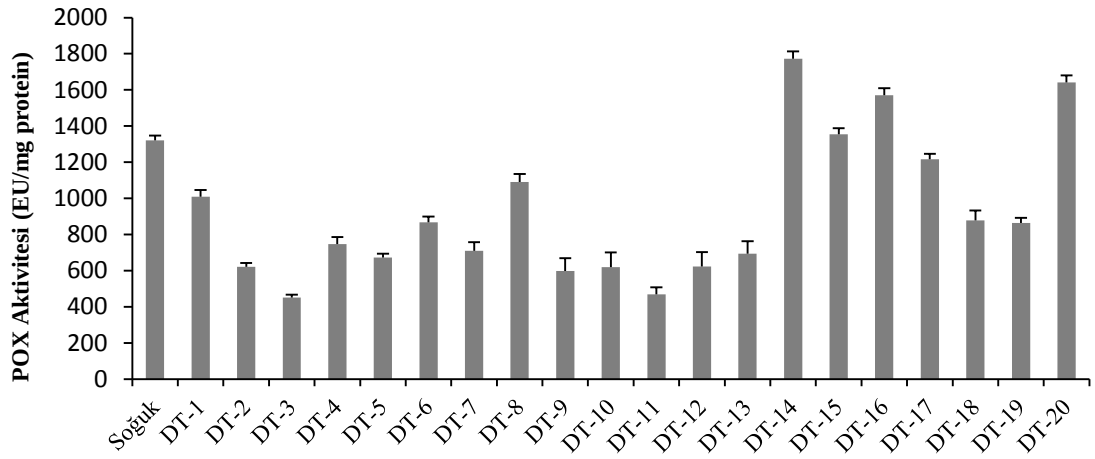
Şekil 4.27. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen apoplastik POX aktivitesi değerleri



Şekil 4.28. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik POX aktivitesi değerleri



Şekil 4.29. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen hücresel POX aktivitesi değerleri



Şekil 4.30. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen hücresel POX aktivitesi değerleri

4.4.4. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi bulguları

4.4.4.a. Apoplastik APX aktivitesi bulguları

Normal şartlarda yetiştirilen bitkilerin bakteri uygulamaları kontrole göre APX aktivitesinde genelde düşüşe neden olmuştur. Yalnızca DT-8, 10, 15, bakteri uygulamalarında önemli ($P<0.05$) olmayan bir artış olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki apoplastik APX aktivitesi $345.017 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken, DT-8 bakteri uygulaması bu değer %13'lük artışla $390.828 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-10 bakteri uygulaması ile %3.4'lük artışla $356.930 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-15 bakteri uygulaması ile %4.5'lik artışla $360.730 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.31).

Düşük sıcaklık kontrole göre apoplastik APX aktivitesinde önemli bir düşüşe neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarında apoplastik APX aktivitesi $345.017 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken, düşük sıcaklıkla bu değer %89'luk önemli ($P<0.05$) bir düşüşle $34,144 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.32).

Düşük sıcaklığa göre bakteri uygulamaları APX aktivitesini genelde artırmıştır. Örneğin; DT-2 bakteri uygulaması ile %80'lik artışla $65.309 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-20 bakteri uygulaması ile %66'lık aktivite artışı ile $60.088 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. DT-11 ve DT-15 bakteri izolatları ise önemli olmayan düşüşe neden olmuşlardır (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.32).

4.4.4.b. Hücresel APX aktivitesi bulguları

Normal şartlarda yetiştirilen bitkilerin bakteri uygulamaları kontrole göre APX aktivitesinde genelde düşüşe neden olmuştur. Yalnızca DT-3, 9, 10, 11 bakterileri uygulamalarında önemli ($P<0.05$) olmayan artış olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücresel APX aktivitesi $294.526 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken, DT-9 bakteri uygulaması bu değer %14'lük artışla $335.609 \text{ EU.mg}^{-1}$, DT-10 bakteri uygulaması ile

%12'lik artışla 330.040 EU.mg⁻¹, DT-11 bakteri uygulaması ile %19'luk artışla 352.797 EU.mg⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.33).

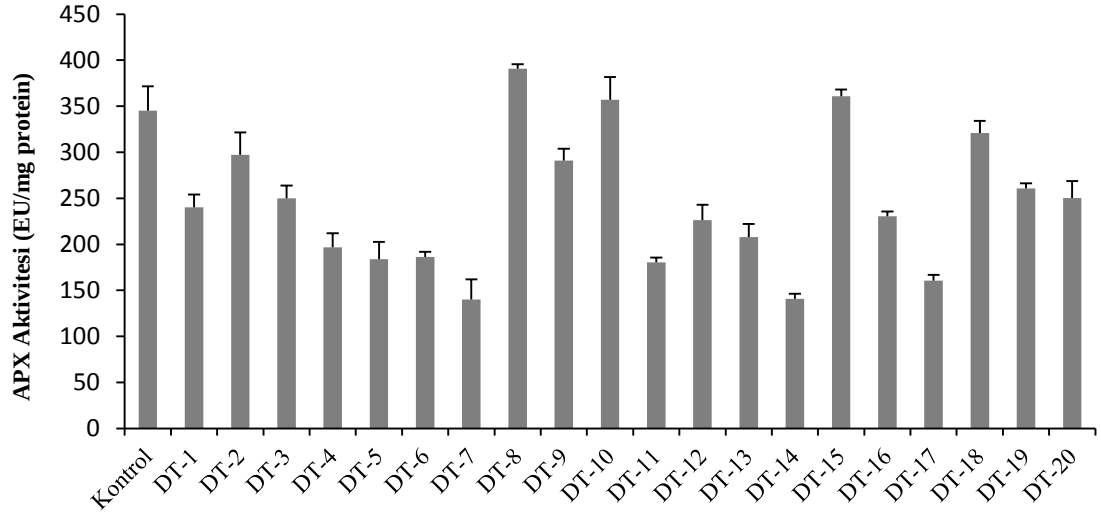
Düşük sıcaklık kontrole göre hücresel APX aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki apoplastik APX aktivitesi 294.526 EU.mg⁻¹ iken düşük sıcaklıkta bu değer %40'luk bir artışla 412.697 EU.mg⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.34).

Düşük sıcaklığa göre bakteri uygulamaları aktiviteyi genelde düşürmüştür sadece DT-11 bakteri uygulaması ile %2.6'luk artışla 423.551 EU.mg⁻¹, DT-17 bakterisi ile %4.3'lük artışla 430.800 EU.mg⁻¹, DT-18 bakterisi ile %13'lük artışla 466.363 EU.mg⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.34).

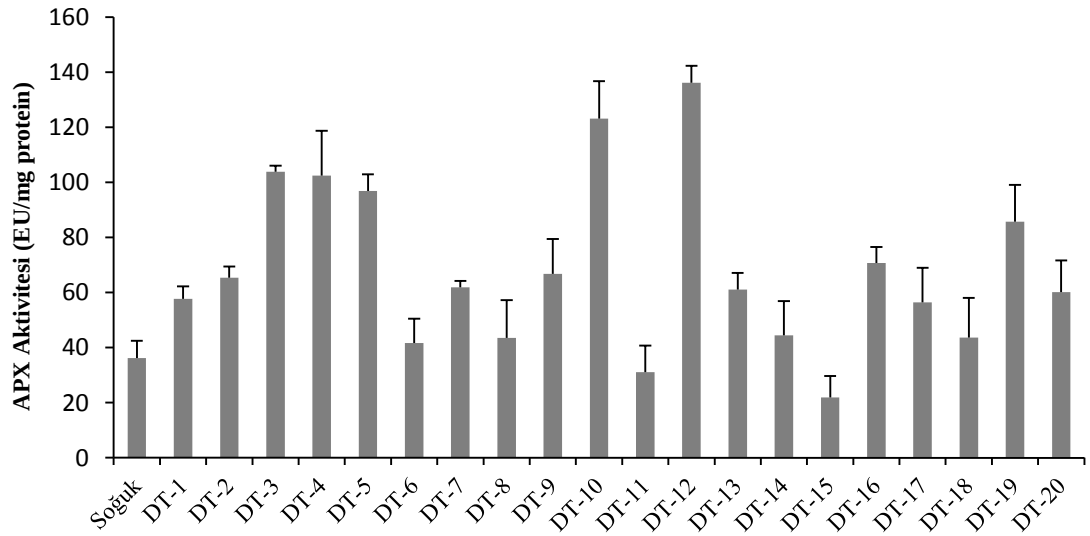
Çizelge 4.8. Apoplastik ve Hücresel APX aktivitesi sonuçları. Sonuçlar EU/mg protein cinsinden verilmiştir.

İzolat No	Kontrol (25/22°C)		Soğuk (9/5°C)	
	Apoplast	Hücresel	Apoplast	Hücresel
Kontrol	345,017±26,55	294,526±34,70	36,144±6,28	412,697±38,02
DT-1	240,166±13,91*	203,512±21,92	57,740±4,44*	357,025±51,00
DT-2	297,107±24,47	143,051±33,62*	65,309±4,08*	234,706±29,65*
DT-3	249,752±14,04*	302,516±36,67	103,850±2,21*	172,916±17,54*
DT-4	196,624±15,55*	166,734±17,11*	102,386±16,31*	123,295±4,66*
DT-5	183,819±18,66*	136,162±29,68*	96,868±5,98*	157,692±9,82*
DT-6	186,409±5,54*	132,003±8,47*	41,665±8,78	93,853±9,39*
DT-7	140,022±21,79*	137,276±11,97*	61,857±2,37*	177,859±41,69*
DT-8	390,828±4,69	114,800±22,35*	43,539±13,71	237,292±18,60*
DT-9	290,962±12,83	335,609±36,59	66,796±12,64*	356,247±25,84*
DT-10	356,930±24,74	330,040±26,26	123,139±13,52*	327,675±9,10*
DT-11	180,293±5,23*	352,797±38,65	31,045±9,67	423,551±31,28
DT-12	226,380±16,46*	246,503±2,52	136,131±6,19*	301,140±14,87*
DT-13	207,733±14,46*	295,200±28,41	61,025±6,10*	412,938±21,24
DT-14	140,573±5,83*	93,270±14,57*	44,457±12,38	126,353±4,05*
DT-15	360,730±7,48	81,937±7,48*	21,847±7,88	124,529±10,01*
DT-16	230,302±5,32*	82,472±10,64*	70,706±5,85*	165,718±10,13*
DT-17	160,675±6,30*	90,522±2,38*	56,387±12,56	430,800±9,83
DT-18	320,946±13,06	132,946±3,00*	43,636±14,43	466,363±4,72
DT-19	260,777±5,36	85,689±5,36*	85,640±13,43*	344,682±11,17*
DT-20	250,273±18,57*	130,521±8,08*	60,088±11,51*	239,013±14,90*

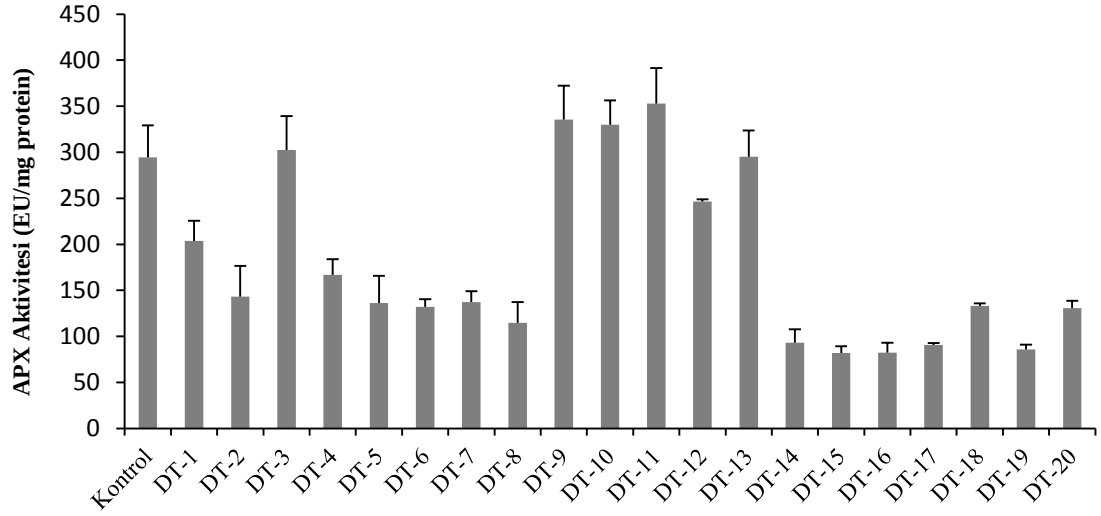
*Duncan Testine göre $P < 0.05$ hata seviyesinde kontrol değerinden önemli farklılığı ifade eder. $\pm$ Standart hatayı gösterir



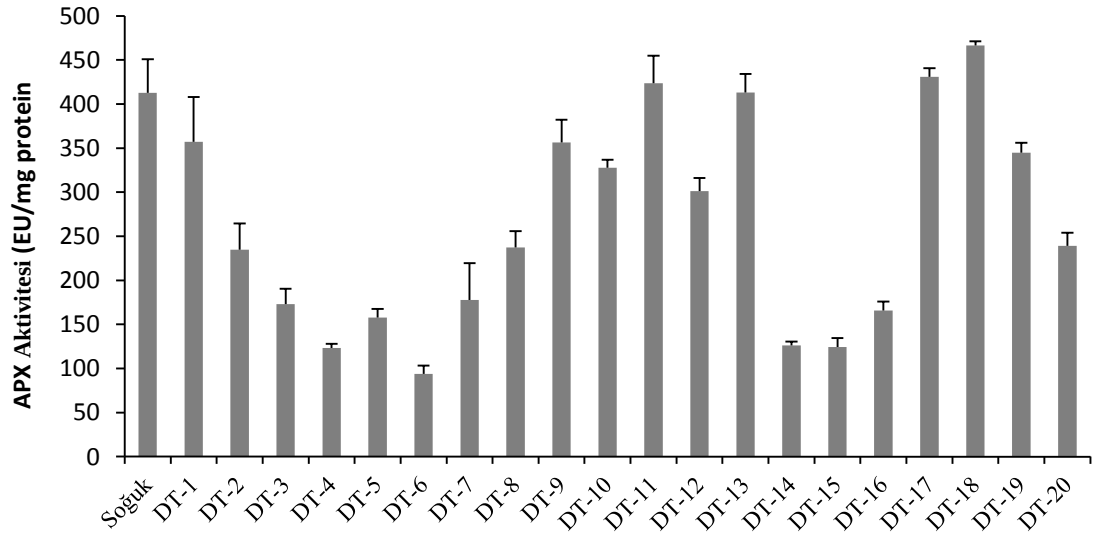
Şekil 4.31. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen apoplastik APX aktivitesi değerleri



Şekil 4.32. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik APX aktivitesi değerleri



Şekil 4.33. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen hücresel APX aktivitesi değerleri



Şekil 4.34. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen hücresel APX aktivitesi değerleri

4.4.5. Glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi bulguları

4.4.5.a. Apoplastik GR aktivitesi

Normal şartlarda yetiştirilen bitkilerde kontrol bitkisinin yapraklarındaki apoplastik GR aktivitesi $12.162 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken DT-13 ve DT-19 bakteri uygulamaları aktiviteyi %100'den daha fazla oranda artırdığı belirlenmiştir. DT-3, DT-4, DT-10, DT-15 bakteri izolatları ise aktiviteyi sırasıyla %58, %45, %31, %61 oranında düşürmüştür (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.35).

Düşük sıcaklık kontrole göre apoplastik GR aktivitesini %4 azaltmıştır. Kontrol bitkisinin GR aktivitesi 12.162 EU/mg iken düşük sıcaklıkta bu değer 11.695 EU/mg olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.36).

DT-8, DT-11, DT-14, DT-17 bakterileri düşük sıcaklığa göre GR aktivitesini önemli ($P<0.05$) oranda artırmıştır. Bu artış sırasıyla %82'lik artışla $21.356 \text{ EU.mg}^{-1}$, %77'lik artışla $20.777 \text{ EU.mg}^{-1}$, %88'lik artışla $22.085 \text{ EU.mg}^{-1}$, %90'lik artışla $22.276 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. DT-2 ve DT-4 bakterileri de GR aktivitesini önemli ($P<0.05$) oranda düşürmüştür. Bu düşüş %70'lik düşüş ile 3.441 EU.mg^{-1} , %45'lik düşüş ile 6.374 EU.mg^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.36).

4.4.5.b. Hücresel GR enzim aktivitesi

Normal şartlarda yetiştirilen bitkilerin bakteri uygulamaları kontrole göre GR aktivitesinde genelde düşüşe neden olmuştur. Yalnızca DT-19 bakteri uygulamasında önemli ($P<0.05$) artış olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücresel GR aktivitesi $51.691 \text{ EU.mg}^{-1}$ iken DT-19 bakteri uygulaması bu değer %49'luk artışla $77.406 \text{ EU.mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. DT-6, 13, 18 bakterileri ise önemli olmayan artışa neden olmuşlardır (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.37).

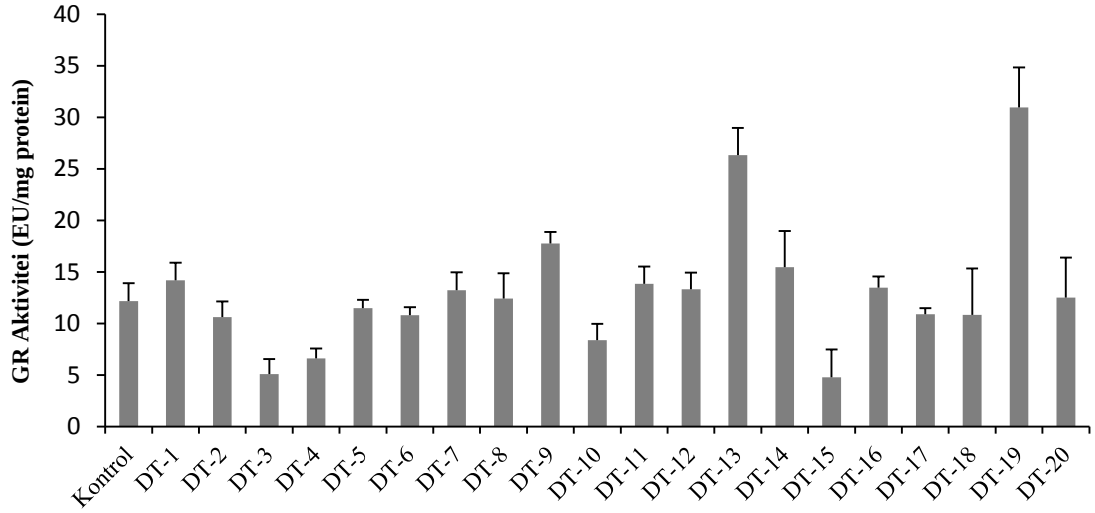
Düşük sıcaklık kontrole göre hücresel GR aktivitesini %15 azaltmıştır. Kontrol bitkisinin GR aktivitesi 51.691 EU/mg iken düşük sıcaklıkta bu değer 43.859 EU/mg olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.38).

DT-18, DT-19, DT-20, bakterileri düşük sıcaklığa göre GR aktivitesini önemli ($P<0.05$) oranda artırmıştır. Bu artış sırasıyla %22'lik artışla 53.872 EU.mg⁻¹, %39'luk artışla 60.993 EU.mg⁻¹, %26'lık artışla 55.604 EU.mg⁻¹ olarak belirlenmiştir. DT-1 ve DT-9 bakterileri de hücresel GR aktivitesini önemli ($P<0.05$) oranda düşürmüştür. Bu düşüş %48'lik düşüş ile 22.435 EU.mg⁻¹, %51'lik düşüş ile 21.454 EU.mg⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.38).

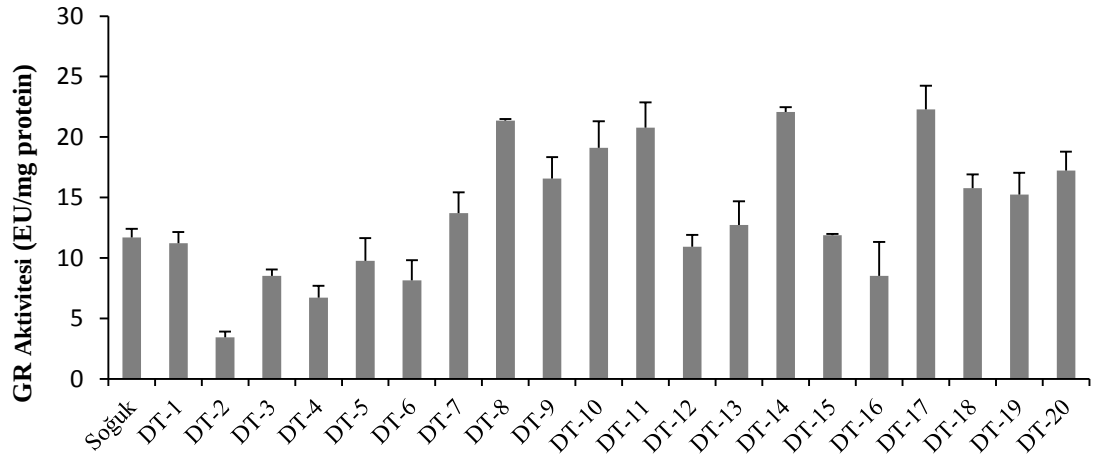
Çizelge 4.9. Apoplastik ve Hücresel GR aktivitesi sonuçları. Sonuçlar EU/mg protein cinsinden verilmiştir.

İzolat No	Kontrol (25/22 °C)		Soğuk (9/5 °C)	
	Apoplast	Hücresel	Apoplast	Hücresel
Kontrol	12,162±1,76	51,691±1,76	11,695±0,73	43,859±1,63
DT-1	14,191±1,71	36,123±1,29*	11,217±0,93	22,435±1,60*
DT-2	10,603±1,53	30,925±2,34*	3,441±0,49*	33,923±2,25
DT-3	5,084±1,47*	38,978±2,60*	8,516±0,53*	29,274±1,41*
DT-4	6,619±0,95*	37,825±0,95*	6,734±0,97*	27,497±1,12*
DT-5	11,480±0,82	27,060±3,76*	9,768±1,88	27,133±0,54*
DT-6	10,793±0,77	54,736±1,88	8,154±1,66*	48,929±1,88
DT-7	13,227±1,75	26,455±1,32*	13,710±1,71	41,131±1,71
DT-8	12,416±2,46	40,070±0,56	21,356±0,14*	20,452±3,15*
DT-9	17,766±1,11*	22,763±1,11*	16,578±1,76*	21,454±1,29*
DT-10	8,368±1,58*	28,693±1,04*	19,105±2,19*	22,121±0,50*
DT-11	13,849±1,67	23,921±1,67*	20,777±2,09*	20,833±1,60*
DT-12	13,330±1,60	17,571±2,64*	10,931±0,99	22,358±3,75*
DT-13	26,337±2,63*	55,308±6,03	12,740±1,96	30,380±6,43*
DT-14	15,446±3,51*	29,489±2,11*	22,085±0,39*	28,182±1,49*
DT-15	4,764±2,72*	42,879±1,33	11,894±0,09	32,103±2,63*
DT-16	13,458±1,11	26,916±2,22*	8,516±2,82*	22,355±3,63*
DT-17	10,903±0,57	25,823±1,99*	22,276±1,96	35,859±4,31
DT-18	10,822±4,51	54,112±3,30	15,767±1,14*	53,872±1,31
DT-19	30,962±3,87*	77,406±4,47*	15,248±1,79*	60,993±4,48*
DT-20	12,498±3,89	36,761±1,47*	17,229±1,57*	55,604±2,07*

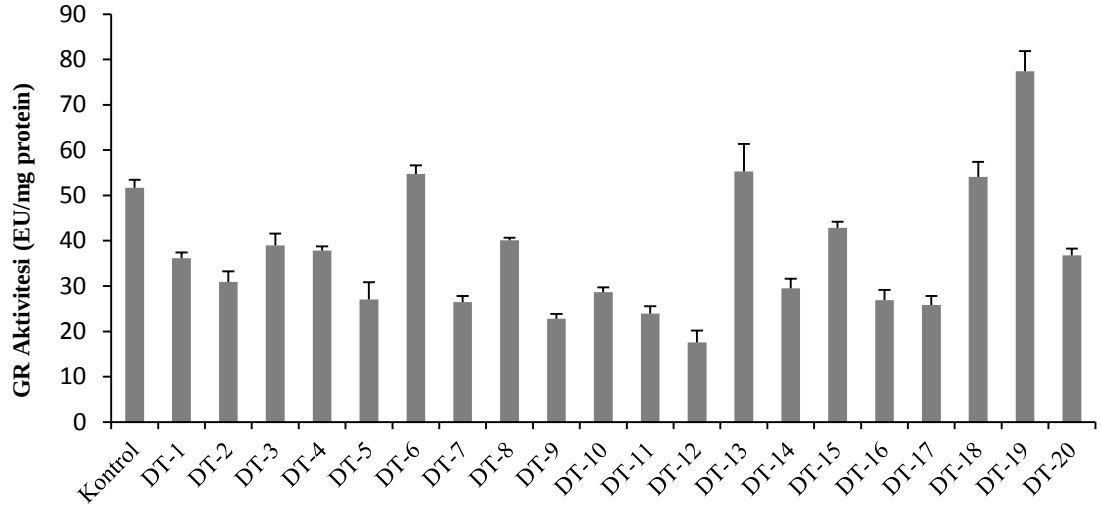
*Duncan Testine göre P<0.05 hata seviyesinde kontrol değerinden önemli farklılığı ifade eder. ± Standart hatayı gösterir



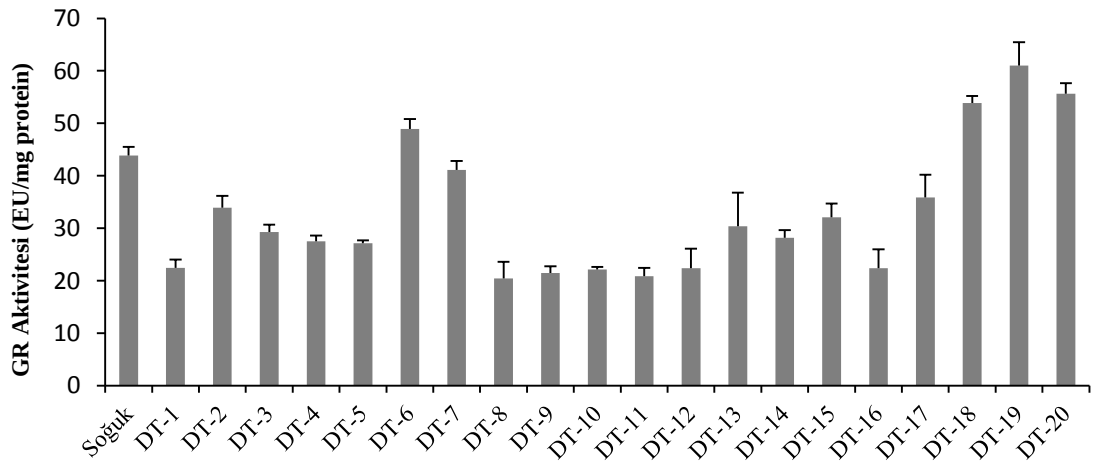
Şekil 4.35. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen apoplastik GR aktivitesi değerleri



Şekil 4.36. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen apoplastik GR aktivitesi değerleri



Şekil 4.37. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen hücresel GR aktivitesi değerleri



Şekil 4.38. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen hücresel GR aktivitesi değerleri

4.5. Lipid Peroksidasyon Seviyesi (MDA miktarı) Bulguları

Normal şartlarda yetiştirilen bitkilerin bakteri uygulamaları kontrole göre MDA miktarını genelde düşürmüştür. DT-4, DT-13, DT-17 bakterileri kontrole göre MDA miktarını sırasıyla %32, %34, %36 olarak düşürmüştür. Kontrolde $16.954 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak belirlenen MDA miktarı DT-4, DT-13, DT-17 bakteri uygulamaları ile sırasıyla $11.406 \text{ nmol.g}^{-1}$, $11.070 \text{ nmol.g}^{-1}$, $10.761 \text{ nmol.g}^{-1}$ 'ye kadar azalmıştır. Yalnızca DT-10 ve DT-11 bakteri izolatları MDA miktarını %17 ve %12 oranında artırmıştır (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.39).

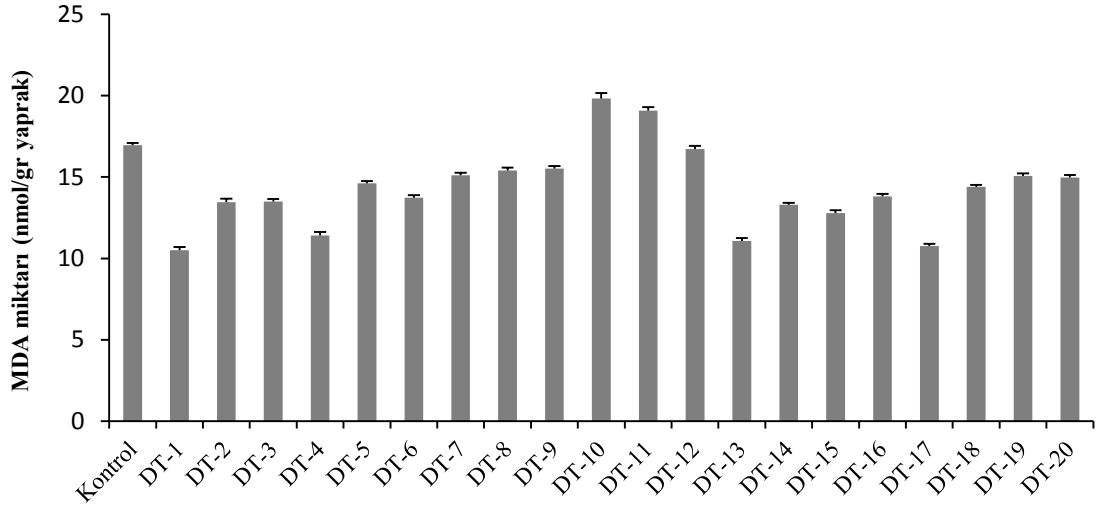
Düşük sıcaklık kontrole göre fasulye bitkisinin yapraklarında MDA miktarında önemli artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinde MDA miktarı $16.954 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak ölçülürken, bu değer düşük sıcaklık uygulamasıyla $20.903 \text{ nmol.g}^{-1}$ 'ye kadar artmıştır (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.40).

Bakteri uygulamaları MDA miktarını genelde düşürmüştür. DT-17, DT-18, DT-20 bakterileri düşük sıcaklık uygulamasına göre MDA miktarını sırasıyla %49, %35, %37 olarak düşürmüştür. Düşük sıcaklık uygulamasıyla $20.903 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak belirlenen MDA miktarı DT-17, DT-18, DT-20 bakteri uygulamaları ile sırasıyla $10.709 \text{ nmol.g}^{-1}$, $13.419 \text{ nmol.g}^{-1}$, $13.109 \text{ nmol.g}^{-1}$ 'ye kadar azaldığı belirlenmiştir. DT-10 ve DT-12 bakteri izolatları MDA miktarını %17 oranında artırmıştır. DT-1 ve DT-2 ise önemli olmayan artışa neden olmuştur (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.40).

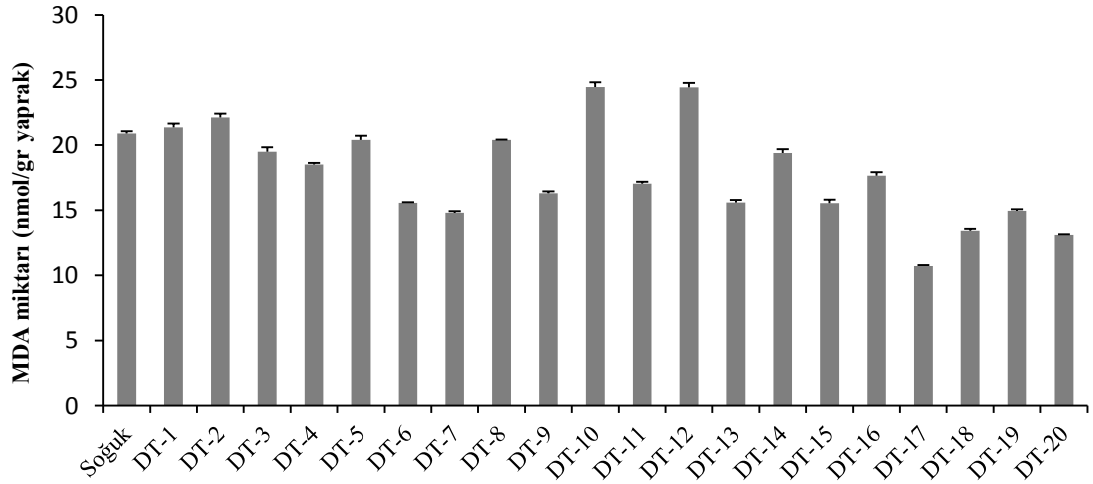
Çizelge 4.10. Hücresel MDA aktivitesi sonuçları. Sonuçlar nmol.g^{-1} cinsinden verilmiştir

İzolat No	Kontrol (25/22°C)	Soğuk (9/5°C)
	Hücresel	Hücresel
Kontrol	16,954±0,13	20,903±0,15
DT-1	10,503±0,19*	21,367±0,29
DT-2	13,445±0,22	22,116±0,31
DT-3	13,496±0,16	19,483±0,36
DT-4	11,406±0,22*	18,503±0,13
DT-5	14,606±0,14	20,412±0,31
DT-6	13,729±0,16	15,561±0,04*
DT-7	15,096±0,16	14,812±0,11*
DT-8	15,406±0,16	20,412±0,03
DT-9	15,509±0,17	16,309±0,14
DT-10	19,819±0,34	24,464±0,37
DT-11	19,070±0,22	17,032±0,15
DT-12	16,722±0,19	24,438±0,33
DT-13	11,070±0,19*	15,587±0,19*
DT-14	13,290±0,11	19,406±0,29
DT-15	12,774±0,19	15,535±0,27*
DT-16	13,806±0,16	17,651±0,28
DT-17	10,761±0,13*	10,709±0,09*
DT-18	14,400±0,12	13,419±0,14*
DT-19	15,070±0,16	14,941±0,12*
DT-20	14,967±0,15	13,109±0,05*

*Duncan Testine göre $P<0.05$ hata seviyesinde kontrol değerinden önemli farklılığı ifade eder. ± Standart hatayı gösterir



Şekil 4.39. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen MDA miktarı



Şekil 4.40. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen MDA miktarı

4.6. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarına Ait Bulgular

Normal şartlarda yetiştirilen bitkilerin bakteri uygulamaları kontrole göre H₂O₂ miktarını genelde düşürmüştür. DT-14, DT-18, DT-20 bakterileri kontrole göre H₂O₂ miktarını sırasıyla %42, %57, %60 olarak düşürmüştür. Kontrolde 51.771 ng.g⁻¹ olarak belirlenen H₂O₂ miktarı DT-14, DT-18, DT-20 bakteri uygulamaları ile sırasıyla 30.057 ng.g⁻¹, 21.828 ng.g⁻¹, 20.514 ng.g⁻¹'ye kadar azalmıştır. DT-13, DT-15, DT-16, DT-17 bakteri izolatları H₂O₂ miktarını %22, %26, %24, %16 oranında artırmıştır (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.41).

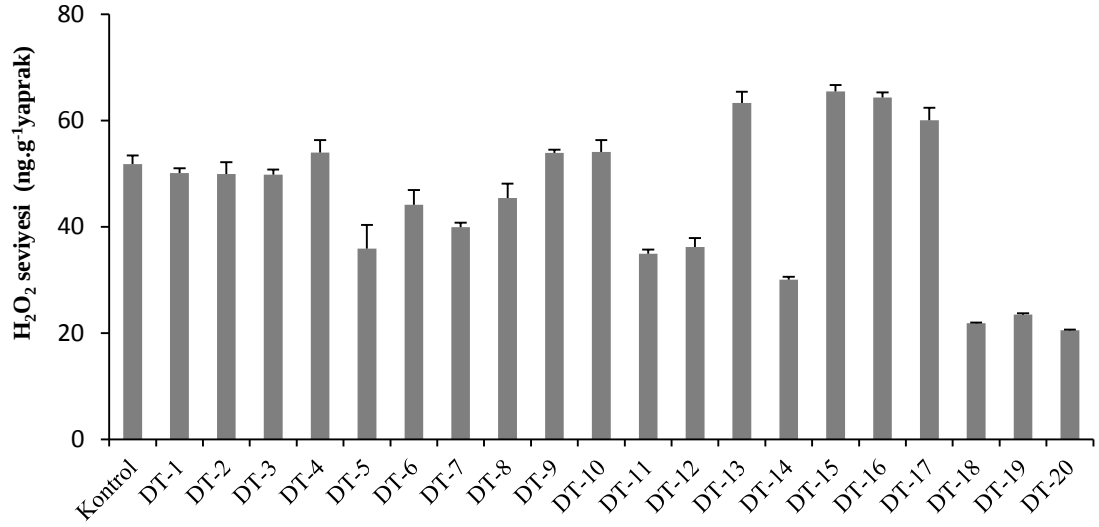
Düşük sıcaklık uygulaması kontrole göre fasulye bitkisinin yapraklarının H₂O₂ miktarında önemli artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinde H₂O₂ miktarı 51.771 ng.g⁻¹ olarak ölçülürken, bu değer düşük sıcaklık uygulaması ile 70.457 ng.g⁻¹'a kadar artmıştır (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.42).

Bakteri uygulamaları H₂O₂ miktarını genelde düşürmüştür. DT-10, DT-19, DT-20 bakterileri düşük sıcaklık uygulamasına göre H₂O₂ miktarını sırasıyla %57, %69, %55 olarak düşürmüştür. Düşük sıcaklık uygulamasıyla 70.457 ng.g⁻¹ olarak belirlenen H₂O₂ miktarı DT-10, DT-19, DT-20 bakteri uygulamaları ile sırasıyla 29.828 ng.g⁻¹, 21.257 ng.g⁻¹, 31.542 ng.g⁻¹'ye kadar azaldığı belirlenmiştir. Diğer bakterilerde de benzer düşüş gözlenmiştir. DT-15 ve DT-17 bakteri izolatları ise H₂O₂ miktarını %21 ve %53 oranında artırmıştır (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.42).

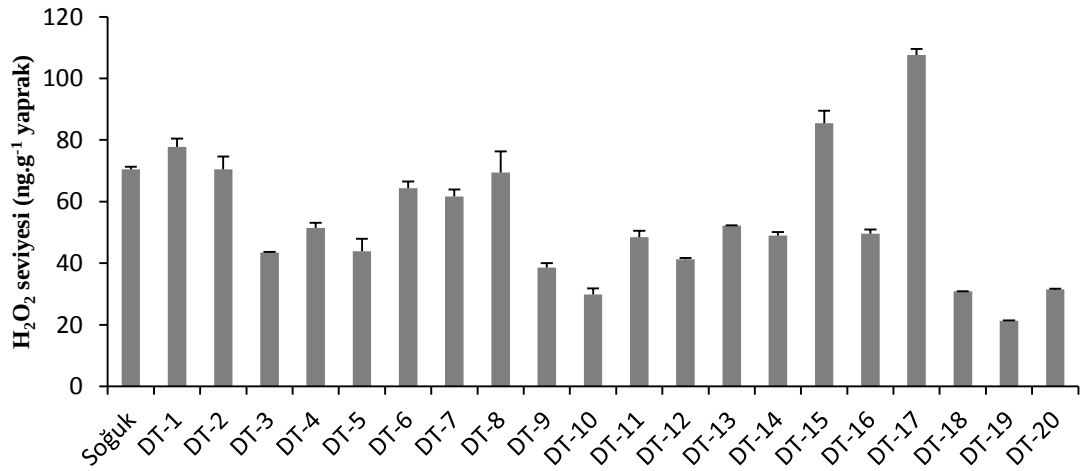
Çizelge 4.11. Hücresel H₂O₂ seviyesi sonuçları. Sonuçlar ng.g⁻¹ cinsinden verilmiştir.

İzolat No	Kontrol (25/22 °C)	Soğuk (9/5 °C)
	Hücresel	Hücresel
Kontrol	51,771±1,64	70,457±0,81
DT-1	50,114±0,89	77,714±2,73
DT-2	49,942±2,23	70,457±4,18
DT-3	49,771±0,99	43,428±0,21*
DT-4	53,942±2,38	51,428±1,65*
DT-5	35,885±4,43*	43,828±4,06*
DT-6	44,114±2,80	64,342±2,23
DT-7	39,942±0,81	61,600±2,29
DT-8	45,428±2,68	69,485±6,85
DT-9	53,885±0,60	38,571±1,44*
DT-10	54,057±2,26	29,828±1,99*
DT-11	34,914±0,81*	48,457±2,09*
DT-12	36,171±1,69*	41,257±0,37*
DT-13	63,314±2,06	52,228±0,06*
DT-14	30,057±0,55*	48,914±1,19*
DT-15	65,428±1,24*	85,428±4,04
DT-16	64,342±0,94*	49,542±1,34
DT-17	60,057±2,30	107,600±1,99*
DT-18	21,828±0,15*	30,828±0,06*
DT-19	23,485±0,25*	21,257±0,17*
DT-20	20,514±0,11*	31,542±0,15*

*Duncan Testine göre P<0.05 hata seviyesinde kontrol değerinden önemli farklılığı ifade eder. ± Standart hatayı gösterir



Şekil 4.41. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen H₂O₂ seviyesi



Şekil 4.42. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen H₂O₂ seviyesi

4.7. Süperoksit Anyonu (O_2^-) Miktarı Bulguları

Normal şartlarda yetiştirilen bitkilerin bakteri uygulamaları kontrole göre O_2^- miktarını genelde düşürmüştür. DT-13, DT-18, DT-19 bakterileri kontrole göre O_2^- miktarını sırasıyla %58, %58, %53 olarak düşürmüştür. Kontrolde 16.35 mg.g^{-1} olarak belirlenen O_2^- miktarı DT-13, DT-18, DT-19 bakteri uygulamaları ile sırasıyla 6.78 mg.g^{-1} , 6.81 mg.g^{-1} , 7.68 mg.g^{-1} 'a kadar azalmıştır. Yalnızca DT-11 ve DT-16 bakteri izolatları %11 ve %18 oranında artırmıştır (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.43).

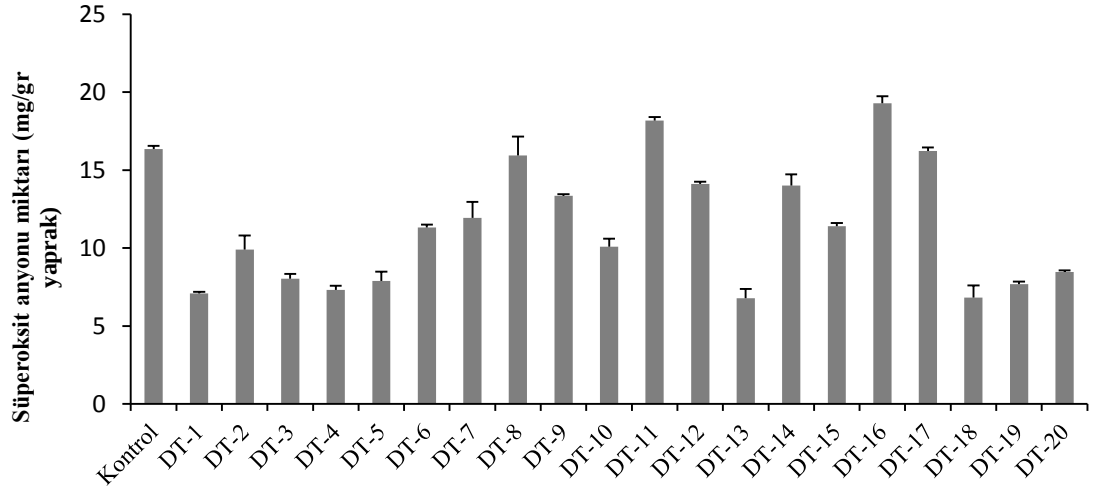
Düşük sıcaklık uygulaması kontrole göre fasulye bitkisinin yapraklarının O_2^- miktarında artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinde O_2^- miktarı 16.35 mg.g^{-1} olarak ölçülürken, bu değer düşük sıcaklık uygulaması ile 19.98 mg.g^{-1} 'a kadar artmıştır (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.43).

Düşük sıcaklığa göre bütün bakteri uygulamaları O_2^- miktarını düşürmüştür. DT-8, DT-17, DT-19 bakterileri düşük sıcaklık uygulamasına göre O_2^- miktarını sırasıyla %51, %49, %62 olarak düşürmüştür. Düşük sıcaklık uygulamasıyla 19.98 mg.g^{-1} olarak belirlenen O_2^- miktarı DT-8, DT-17, DT-19 bakteri uygulamaları ile sırasıyla 9.63 mg/g , 10.11 mg.g^{-1} , 7.43 mg.g^{-1} 'a kadar azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.44).

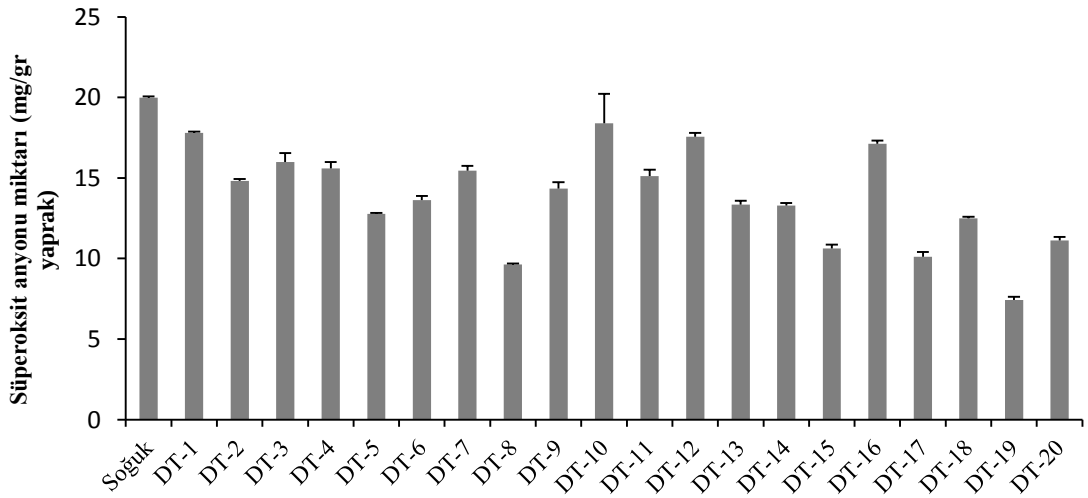
Çizelge 4.12. Hücresel Süperoksit Anyonu aktivitesi sonuçları. Sonuçlar ng.g^{-1} cinsinden verilmiştir

İzolat No	Kontrol (25/22°C)	Soğuk (9/5°C)
	Hücresel	Hücresel
Kontrol	16,35±0,08	19,98±0,21
DT-1	7,08±0,11*	17,79±0,08
DT-2	9,9±0,90*	14,82±0,11*
DT-3	8,04±0,30*	15,99±0,56
DT-4	7,32±0,27*	15,60±0,38
DT-5	7,89±0,60*	12,78±0,05*
DT-6	11,31±0,18*	13,62±0,26*
DT-7	11,94±1,02*	15,45±0,30
DT-8	15,93±1,22	9,63±0,05*
DT-9	13,35±0,11	14,34±0,39*
DT-10	10,08±0,52*	18,39±1,84
DT-11	18,18±0,23	15,12±0,39
DT-12	14,10±0,15	17,55±0,24
DT-13	6,78±0,60*	13,35±0,23*
DT-14	14,01±0,71	13,29±0,16*
DT-15	11,40±0,21*	10,62±0,24*
DT-16	19,29±0,44	17,13±0,18
DT-17	16,23±0,21	10,11±0,30*
DT-18	6,81±0,79*	12,49±0,10*
DT-19	7,68±0,16*	7,43±0,19*
DT-20	8,46±0,10*	11,13±0,21*

*Duncan Testine göre $P < 0.05$ hata seviyesinde kontrol değerinden önemli farklılığı ifade eder. ± Standart hatayı gösterir



Şekil 4.43. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen O_2^- miktarı



Şekil 4.44. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen O_2^- miktarı

4.8. Klorofil a, Klorofil b ve Total Klorofil Miktarı Bulguları

Normal şartlarda yetiştirilen bitkilere uygulanan DT-5, DT-13, DT-17, DT-18, DT-19, DT-20 bakterileri kontrole göre klorofil a miktarını sırasıyla %40, %24, %33, %51, %58, %59 oranında düşürmüştür, DT-2, DT-9, DT-10, DT-11, DT-12, DT-16 bakteri izolatları ise %9, %12, %9, %9, %8, %8 gibi önemsiz bir şekilde artırmıştır (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.45). DT-1, DT-3, DT-6, DT-7 bakterileri kontrole göre klorofil b miktarını sırasıyla %26, %56, %45, %41 oranında düşürmüştür. DT-5, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20 bakteri izolatları ise klorofil b miktarını sırasıyla %38, %75, %60, %45, %59, %97, %70, %18, %25, %18, %12 oranında artırmıştır (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.47). Total klorofil miktarını ise DT-1, DT-3, DT-5, DT-6, DT-7 DT-13, DT-17, DT-18, DT-19, DT-20 bakterileri sırasıyla %13, %25, %9, %26, %15, %15, %19, %21, %28, %29 oranında düşürmüştür, DT-2, DT-9, DT-10, DT-11, DT-12, DT-14, DT-15,DT-16 bakterileri ise %5, %36, %29, %23, %27, %34, %19, %11 oranında artırmıştır (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.49).

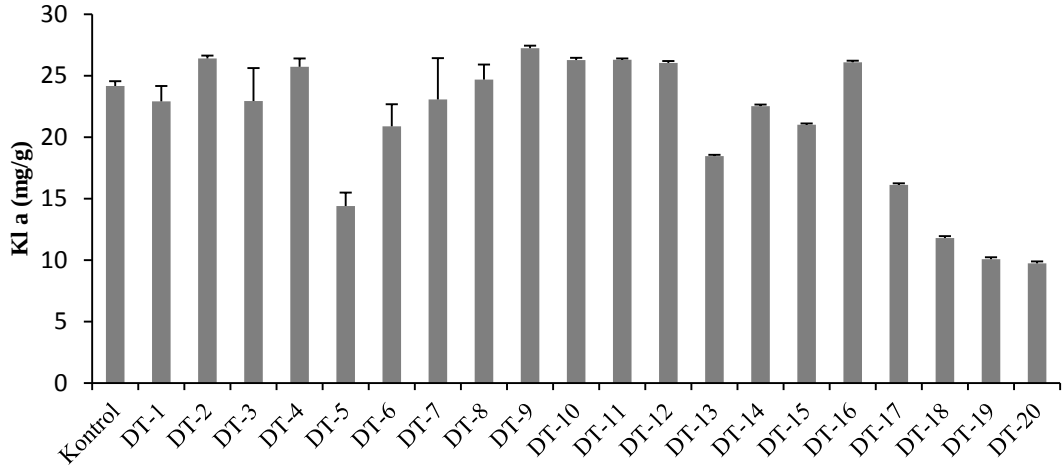
Düşük sıcaklıkta yetiştirilen bakteri uygulamasız fasulye bitkisinde klorofil a, klorofil b, total klorofil miktarı normal şartlarda yetiştirilen fasulye bitkisine göre klorofil miktarını önemli ($P<0.05$) oranda düşürmüştür. Öyle ki bu düşüş sırasıyla %60, %37, %51 olmuştur. Kontrol şartlarında klorofil a, 24.152 mg.L⁻¹, klorofil b 15.998 mg.L⁻¹, total klorofil 3.345 mg.L⁻¹ iken düşük sıcaklıkta bu oran sırasıyla 9.420 mg.L⁻¹, 9.947 mg.L⁻¹, 1.613 mg.L⁻¹'dir (Çizelge 4.13).

Düşük sıcaklıkta yetiştirilen bitkilere uygulanan bakteriler kontrole göre klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarını artırmıştır (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.46, 4.48, 4.50).

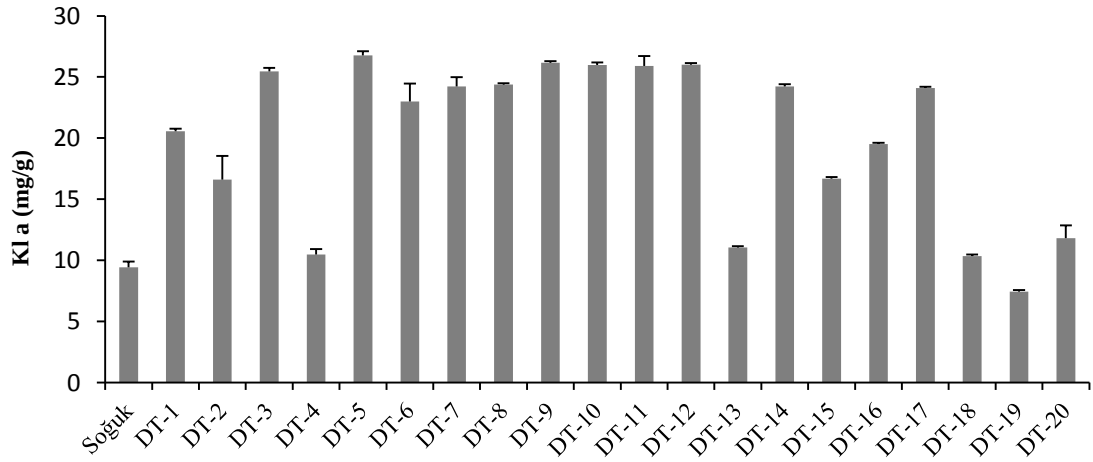
Çizelge 4.13. Kla, Klb ve Total Klorofil sonuçları. Sonuçlar mg/g cinsinden verilmiştir

İzolot No	Kontrol (25/22 °C)			Soğuk (9/5 °C)		
	Kla	Klb	Total Kl	Kla	Klb	Total Kl
Kontrol	24,152±0,39	15,998±1,01	40,126±1,15	9,420±0,49	9,947±0,63	19,347±1,11
DT-1	22,910±1,23	11,833±0,58*	34,725±1,15	20,551±0,22*	9,833±0,28	30,463±1,14*
DT-2	26,395±0,23	15,884±0,66	42,268±1,17	16,604±1,94*	14,004±2,24*	30,630±1,16*
DT-3	22,924±2,70	7,008±0,76*	29,932±1,16	25,462±0,29*	13,796±0,62*	39,248±1,18*
DT-4	25,722±0,68	13,963±1,15	39,675±1,15	10,491±0,44	24,461±1,23*	34,940±1,17*
DT-5	14,389±1,10*	22,160±0,11*	36,522±1,10	26,759±0,35*	17,185±0,80*	43,918±1,20*
DT-6	20,868±1,81	8,785±0,91*	29,642±1,23	22,993±1,46*	10,554±0,20	33,525±1,12*
DT-7	23,068±3,35	9,453±1,27*	34,119±1,39	24,229±0,77*	15,806±2,96*	40,024±1,21*
DT-8	24,672±1,22	14,416±0,97	39,078±1,18	24,388±0,10*	13,885±0,48*	38,259±1,12*
DT-9	27,222±0,22	28,034±0,54*	54,539±1,16*	26,155±0,13*	26,719±0,15*	52,775±1,10*
DT-10	26,263±0,20	25,594±0,12*	51,797±1,12*	25,993±0,20*	29,342±0,24*	55,469±1,12*
DT-11	26,293±0,11	23,272±0,12*	49,375±1,11	25,901±0,82*	27,382±0,14*	53,276±1,11*
DT-12	26,021±0,16	25,377±0,55*	51,180±1,14	26,004±0,14*	24,901±0,37*	50,870±1,16*
DT-13	18,442±0,10	15,528±0,12	33,953±1,10	11,053±0,12	32,404±0,14*	43,356±1,10*
DT-14	22,521±0,12	31,486±0,14*	53,933±1,10*	24,226±0,18*	15,785±0,11*	39,988±1,10*
DT-15	21,010±0,10	27,180±0,17*	47,956±1,11	16,680±0,13*	13,614±0,20*	28,190±1,11*
DT-16	26,069±0,14	18,918±0,13	44,704±1,11	19,501±0,10*	19,958±0,18*	39,302±1,10*
DT-17	16,109±0,14*	16,618±0,16	32,574±1,11	24,096±0,11*	18,703±0,16*	42,573±1,11*
DT-18	11,785±0,15*	20,019±1,57	31,832±1,12	10,350±0,12	19,354±0,10*	30,208±1,11*
DT-19	10,078±0,14*	18,928±0,10	29,442±1,10*	7,453±0,12	13,093±0,64*	20,584±1,14
DT-20	9,721±0,18*	17,931±0,13	28,291±0,12*	11,825±1,05	22,053±0,25*	32,881±1,31*

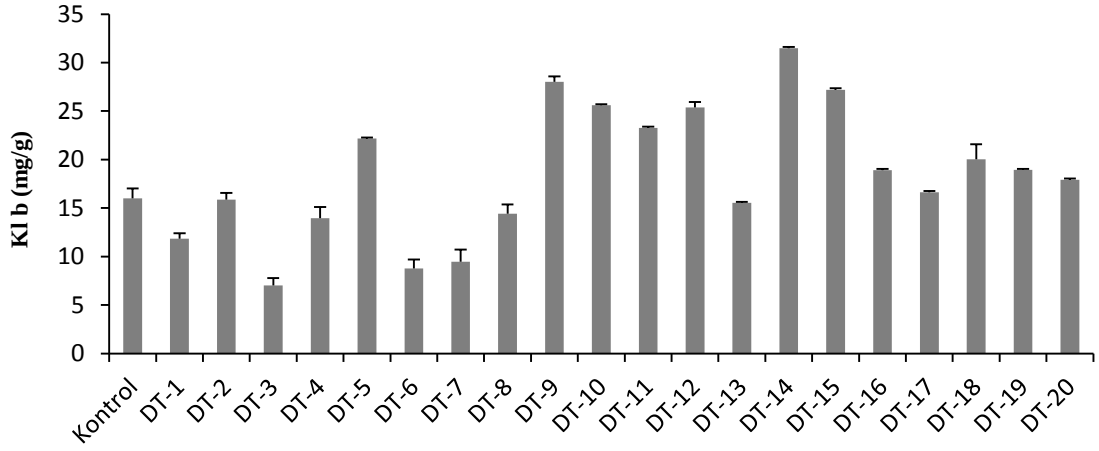
*Duncan Testine göre $P < 0.05$ hata seviyesinde kontrol değerinden önemli farklılığı ifade eder. $\pm$ Standart hatayı gösterir



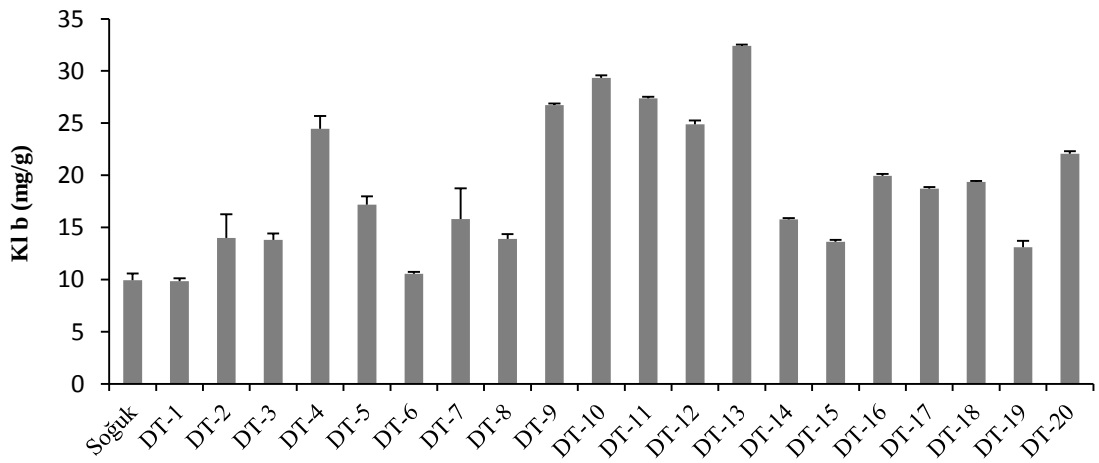
Şekil 4.45. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen Kl a miktarı



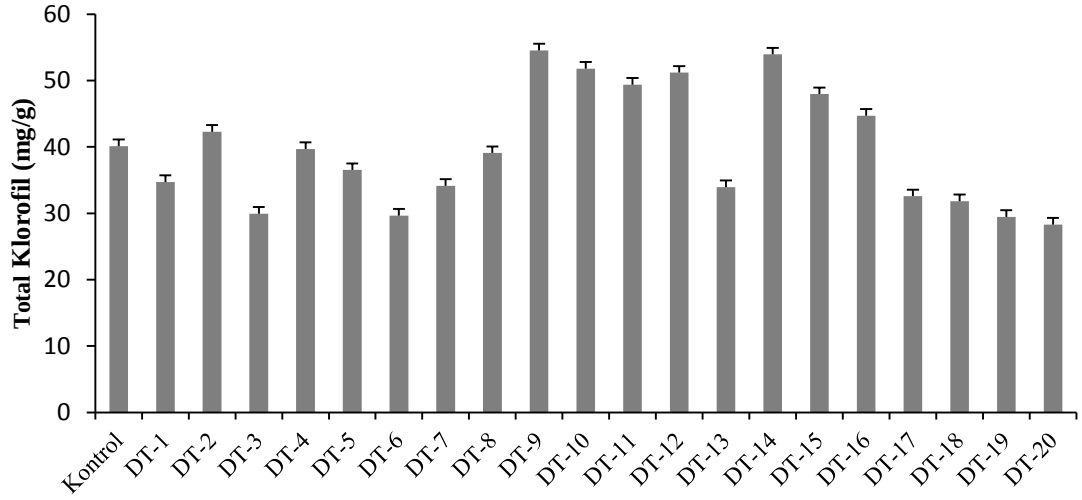
Şekil 4.46. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen Kl a miktarı



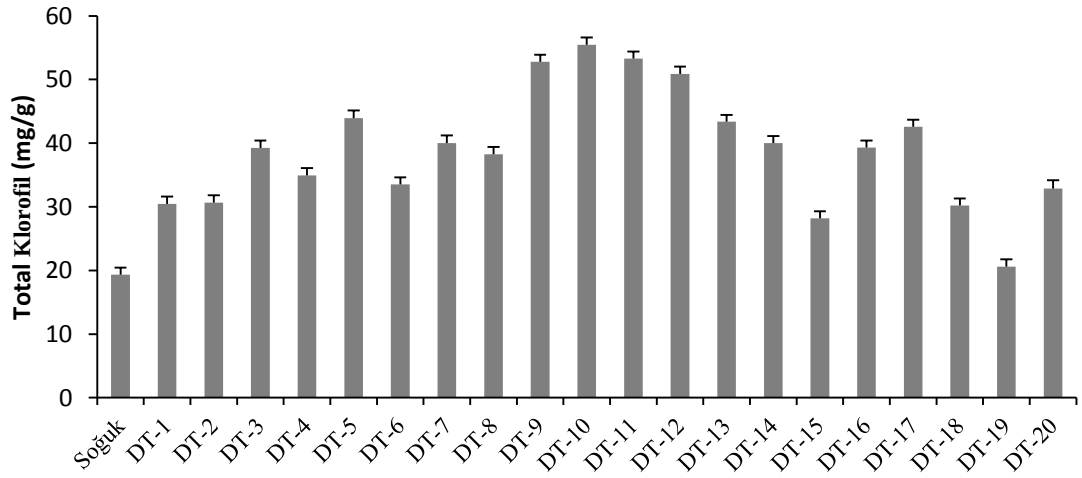
Şekil 4.47. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen Kl b miktarı



Şekil 4.48. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen Kl b miktarı



Şekil 4.49. Kontrol şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri uygulamasından sonra yapraklardan elde edilen total klorofil miktarı



Şekil 4.50. Düşük sıcaklık uygulama öncesi bakteri inokule edilmiş fasulye yapraklarından elde edilen total klorofil miktarı

4.9. ACC Deaminaz Aktivite Değerleri

Soğuğa toleranslı yabani bitkilerden izole edilen bakteri izolatlarının hemen hepsinde ACC deaminaz aktivitesi belirlenmiştir. Ancak izolatlar arasında aktivite bakımından farklılıklar belirlenmiştir. En düşük ACC deaminaz aktivitesine sahip bakteri izolatının 57.60 değeri ile *Brevibacterium frigoritolerans* (DT-20) olduğu gözlenmiştir. En yüksek aktivite değeri ise 335.38 ile *Pseudomonas fragi* (DT-7) bakteri izolatı olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.14). Çizelge 4.14'e bakıldığında en yüksek ACC deaminaz aktivitesine sahip bakteri izolatının *Pseudomonas* cinsine ait olduğu gözlenmiştir

Çizelge 4.14. Bakteri izolatlarının ACC deaminaz aktivite değerleri

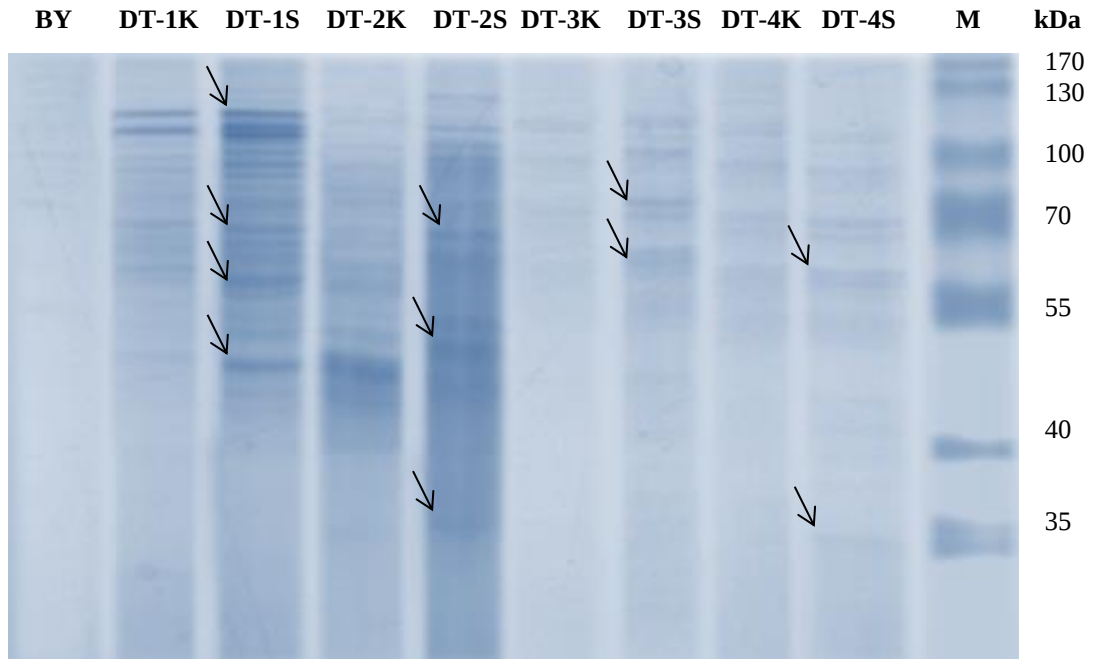
Bakteri İzolatı	ACC Deaminaz Aktivitesi (nmol α-ketobütirat/mg protein)
<i>Sphingobacterium faecium</i> (DT-1)	105.04
<i>Sphingobacterium faecium</i> (DT-2)	149.11
<i>Sphingobacterium faecium</i> (DT-3)	125.55
<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i> (DT-4)	91.73
<i>Staphylococcus intermedius</i> (DT-5)	181.73
<i>Bacillus cereus</i> (DT-6)	152.22
<i>Pseudomonas fragi</i> (DT-7)	335.38
<i>Pseudomonas fragi</i> (DT-8)	166.11
<i>Sphingobacterium faecium</i> (DT-9)	103.59
<i>Bacillus cereus</i> (DT-10)	96.52
<i>Bacillus cereus</i> (DT-11)	192.08
<i>Bacillus cereus</i> (DT-12)	163.34
<i>Raoultella ornithinolytica</i> (DT-13)	94.92
<i>Pseudomonas chloropaphis</i> (DT-14)	96.28
<i>Sphingobacterium faecium</i> (DT-15)	83.08
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (DT-16)	131.52
<i>Pseudomonas proteolytica</i> (DT-17)	162.72
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (DT-18)	121.35
<i>Pseudomonas proteolytica</i> (DT-19)	127.55
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> (DT-20)	57.60

4.10. Bakteri Ekstrasellüler Proteinlerinin SDS-PAGE ile Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Bir SDS-PAGE jelinde tüm bakterilere (20 bakteri) ait bulguların verilmesi mümkün olmadığından, bulgular gruplar halinde sunulmuştur. Burada amaç, bakterileri kendi aralarında karşılaştırmaktan ziyade, her bir bakterinin kontrol ve soğuk şartlarda sentezlediği protein profillerini karşılaştırmak olduğundan, SDS-PAGE bulgularının gruplar halinde verilmesinin daha uygun olduğu düşünülmüştür.

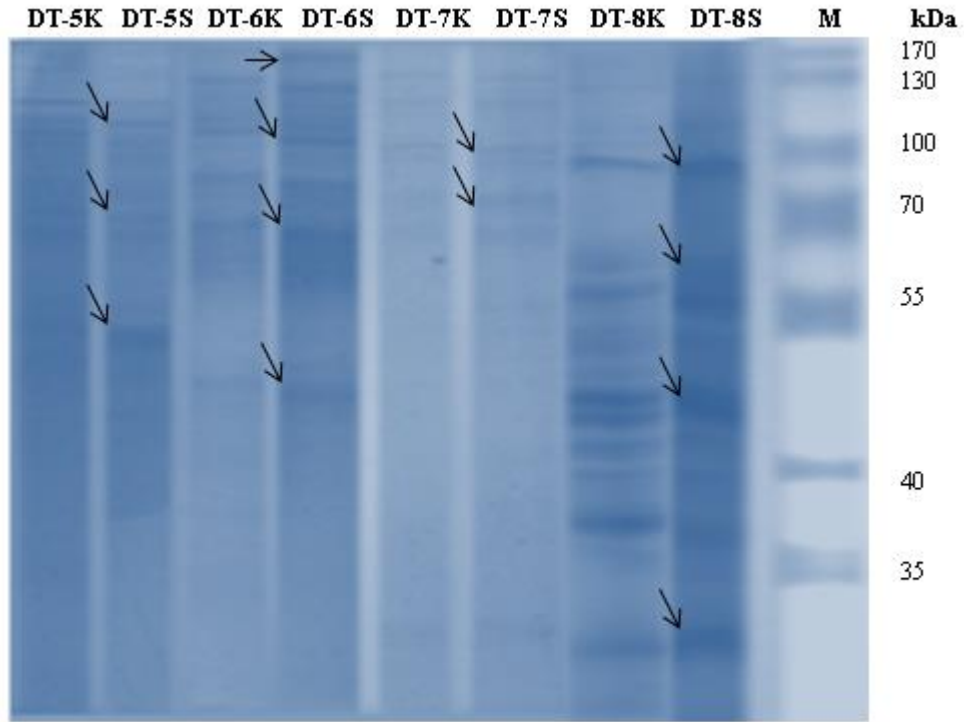
Bakterilerin salgıladıkları ekstrasellüler proteinlerin standart proteinlerle kıyaslandığında genellikle 40 ile 130 kDa arasında değiştiği belirlenmiştir.

Düşük sıcaklıkta yetiştirilen DT-1 bakteri izolatına ait ekstrasellüler proteinlerin band kalınlıklarında, normal şartlarda yetiştirilen kontrol grubuna göre, belirgin bir artış görülmüştür. Örneğin 119 kDa'luk protein kontrol şartlarında çok düşük seviyelerde sentezlenirken, soğuk sentezinde ise yüksek bir artış gözlenmiştir. Diğer bandlarda da benzer veriler görülebilmektedir. DT-2 bakteri proteinlerinin büyüklükleri standart proteinlerle kıyaslandığında yaklaşık 35 kDa ile 100 kDa arasında olduğu görülmektedir. Düşük sıcaklıkta yetiştirilen bakteri proteinlerinin de miktarında kontrole göre artış belirlenmiştir. 35 kDa da soğukta kontrole göre ekstra band gözlenmiştir. DT-3 bakteri proteinlerinin büyüklükleri standart proteinlerle kıyaslandığında yaklaşık 55 kDa ile 100 kDa arasında olduğu görülmektedir. Düşük sıcaklıkta yetiştirilen bakteri ekstrasellüler proteininin normal şartlardaki proteine göre miktarında belirgin bir artış gözlenmiştir. DT-4 bakteri proteinlerinin büyüklükleri standart proteinlerle kıyaslandığında yaklaşık 35 kDa ile 100 kDa arasında olduğu görülmektedir. Normal şartlarda yetiştirilen bakteri proteinine göre düşük sıcaklıkta yetiştirilen bakteri proteinin şiddetinde artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.51).



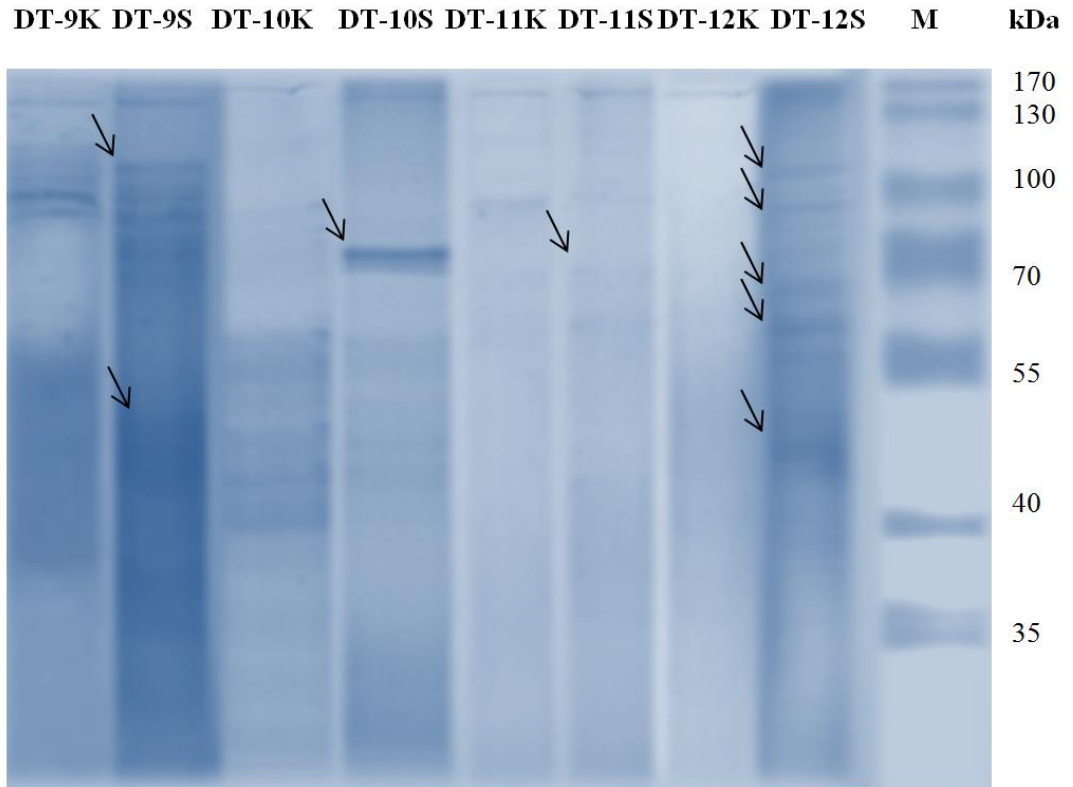
Şekil 4.51. Bakterilerin salgıladıkları ekstrasellüler proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı (BY: nutrient broth besiyeri, K: Kontrol S: Soğuk M: Standart protein)

DT-5 bakteri proteini standart proteinlerle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 40 kDa ile 100 kDa arasında olduğu görülmüştür. Özellikle düşük sıcaklıkta yetiştirilen 55 kDa büyüklüğündeki bakteri proteininin normal şartlardakine göre ekstrasel bir band olduğu görülmüştür. DT-6 bakteri proteini standart proteinlerle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 50 kDa ile 170 kDa arasında olduğu görülmüştür. Normal şartlarda yetiştirilen bakteri proteinlerine kıyasla düşük sıcaklıkta yetiştirilen bakteri proteinlerinin miktarında artış olduğu görülmüştür. Ayrıca düşük sıcaklıkta 170 kDa da ekstra band gözlenmiştir. DT-7 bakteri proteini standart proteinlerle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 35 kDa ile 130 kDa arasında olduğu görülmüştür. Düşük sıcaklıkta özellikle 70 kDa da protein miktarında artış görülmüştür. DT-8 bakteri proteini standart proteinlerle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 30 kDa ile 130 kDa arasında olduğu görülmüştür. Düşük sıcaklıkta yetiştirilen bakterilerin özellikle 30 kDa, 50 kDa, 100 kDa daki proteinlerin miktarında kontrole göre belirgin bir artışa neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.52).



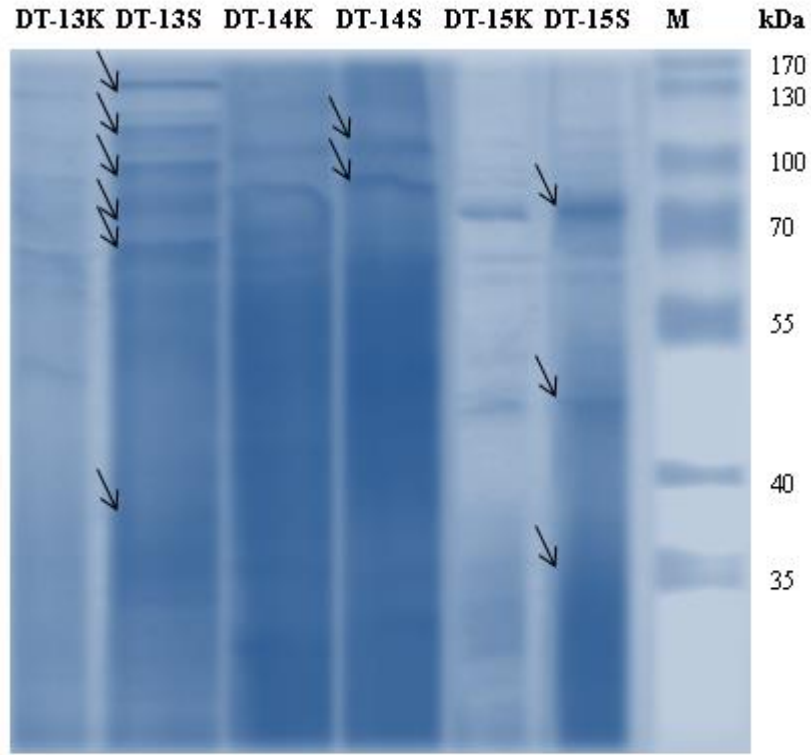
Şekil 4.52. Bakterilerin salgıladıkları ekstrasellüler proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı

DT-9 bakteri proteini standart proteinlerle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 35 kDa ile 100 kDa arasında olduğu görülmüştür. Özellikle düşük sıcaklıkta 100 kDa da protein miktarında artış görülmüştür. DT-10 bakteri proteini standart proteinlerle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 35 kDa ile 100 kDa arasında olduğu görülmüştür. Özellikle düşük sıcaklıkta normal şartlara göre 70 kDa büyüklüğünde ekstra protein görülmüştür. DT-11 bakteri proteini standart proteinlerle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 40 kDa ile 100 kDa arasında olduğu görülmüştür. Düşük sıcaklıkta yetiştirilen bakteri proteinlerinin 40 kDa ve 70 kDa büyüklüğünde normal şartlara oranla az da olsa artış gözlenmiştir. DT-12 bakteri proteini standart proteinlerle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 50 kDa ile 100 kDa arasında olduğu görülmüştür. Düşük sıcaklıkta yetiştirilen bakteri proteinlerinin normal şartlardakine göre miktarında belirgin bir artış olduğu göze çarpmaktadır (Şekil 4.53).



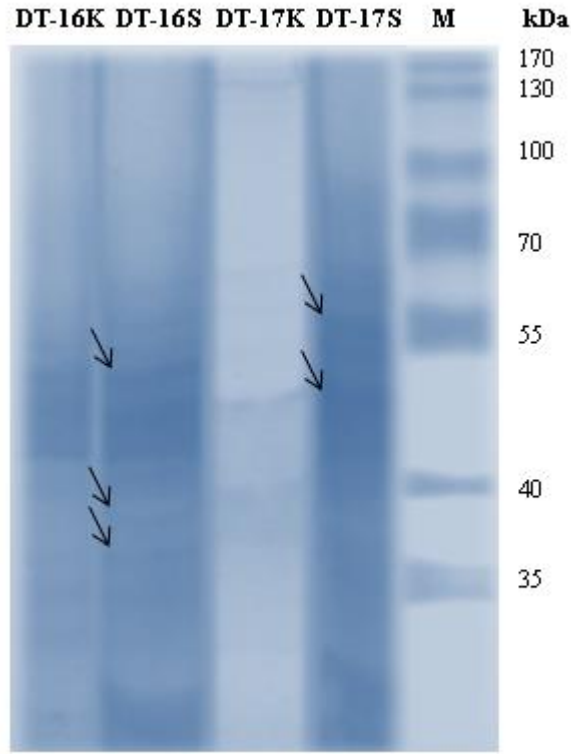
Şekil 4.53. Bakterilerin salgıladıkları ekstrasellüler proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı

DT-13 bakteri proteini standart proteinlerle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 55 kDa ile 130 kDa arasında olduğu görülmüştür. Düşük sıcaklıkta yetiştirilen bakteri proteinlerinin normal şartlardakine göre miktarında belirgin bir artış olduğu göze çarpmaktadır. Ayrıca düşük sıcaklıkta 35 kDa da ekstra protein bandı görülmüştür. DT-14 bakteri proteini standart proteinlerle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 35 kDa ile 100 kDa arasında olduğu görülmüştür. Özellikle düşük sıcaklıkta yetiştirilen 70 kDa ve 100 kDa büyüklüğündeki bakteri proteininin normal şartlardakine göre miktarında belirgin bir artış olduğu göze çarpmaktadır. DT-15 bakteri proteini standart proteinlerle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 50 kDa ile 100 kDa arasında olduğu görülmüştür. 50 kDa ve 70 kDa da normal şartlara göre düşük sıcaklıkta yetiştirilen bakteri proteinlerinin miktarındaki artış çok belirgindir (Şekil 4.54).



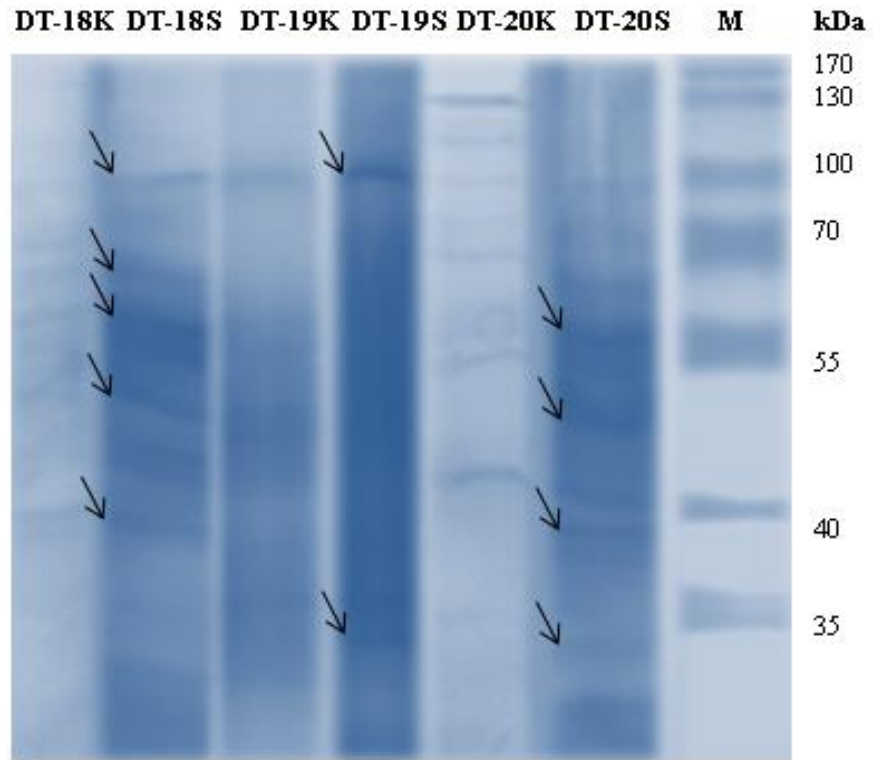
Şekil 4.54. Bakterilerin salgıladıkları ekstrasellüler proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı

DT-16 bakteri proteini standart proteinlerle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 35 kDa ile 55 kDa arasında olduğu görülmüştür. Normal şartlarda yetiştirilen bakteri proteinine göre düşük sıcaklıkta yetiştirilen bakteri proteinin miktarında az da olsa artış olduğu görülmüştür. DT-17 bakteri proteininin düşük sıcaklıkta miktarında artış olduğu gözlenmiştir. Standart proteinle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 35 kDa ile 100 kDa arasında olduğu görülmüştür.(Şekil 4.55).



Şekil 4.55. Bakterilerin salgıladıkları ekstrasellüler proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı

DT-18 bakteri proteini standart proteinlerle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 40 kDa ile 100 kDa arasında olduğu görülmüştür. Düşük sıcaklıkta özellikle 50 kDa, 55 kDa, 100 kDa da bakteri proteinlerinin normal şartlara göre miktarında artış olduğu gözlenmiştir. DT-19 bakteri proteini standart proteinlerle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 35 kDa ile 100 kDa arasında olduğu görülmüştür. Düşük sıcaklıkta yetiştirilen bakterilerin özellikle 100 kDa büyüklüğündeki proteinin miktarında belirgin artış gözlenmiştir. Ayrıca düşük sıcaklıkta normal şartlardan farklı olarak 35kDa da ekstra protein bandı gözlenmiştir. DT-20 bakteri proteini standart proteinlerle kıyaslandığında büyüklüklerinin yaklaşık 30 kDa ile 130 kDa arasında olduğu görülmüştür. 40 kDa ve 55 kDa büyüklüğünde düşük sıcaklıktaki bakteri proteinlerinde artış olduğu gözlenmiştir. Düşük sıcaklıkta 30 kDa, 40 kDa, 50 kDa da normal şartlara kıyasla ekstra protein bandları gözlenmiştir (Şekil 4.56).



Şekil 4.56. Bakterilerin salgıladıkları ekstrasellüler proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı

Çizelge 4.15.Çalışılan bütün parametrelerin soğuk+bakteri uygulanmış fidelerde izolatlara göre artış (+) ve azalışlarını (-) gösteren tablo

					CAT		APX		GR		SOD		POX					
İzolat Numarası	Kuru ağırlık	Total klorofil	%DH	BNA	Apop.	Hüc.	Apop.	Hüc.	Apop.	Hüc.	Apop.	Hüc.	Apop.	Hüc.	H ₂ O ₂	O ₂	MDA	ACC Deam
DT-1	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
DT-2	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-		-	+	+
DT-3	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
DT-4		+	-		+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
DT-5	+	+	-		-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
DT-6	-	+	-		-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
DT-7		+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
DT-8	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
DT-9		+	-		+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
DT-10	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
DT-11	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
DT-12	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
DT-13	+	+	-			-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
DT-14		+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
DT-15	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
DT-16	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
DT-17	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
DT-18		+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-		-	+
DT-19	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
DT-20	-	+	-		+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada soğuğa toleranslı yabani bitkilerin yaprak apoplastından izole edilen bitki büyümesini düzenleyici bakterilerin (PGPB) fasulyenin (*Phaseolus vulgaris*) düşük sıcaklık stresi toleransına etkileri araştırılmıştır. Çalışmada hedeflenen amaca ulaşabilmek için genelde stres parametresi olarak kullanılan fizyolojik ve biyokimyasal parametreler kullanılmıştır. Bu bağlamda, stres toleransının veya stres hasarından koruma derecesinin belirlenmesi için yapraklardaki donma hasarı, apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi, lipid peroksidasyon (MDA miktarı) seviyesi ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) seviyeleri analiz edilmiştir. Ayrıca hücrelerdeki enzimatik antioksidan sistemdeki değişimi takip etmek için apoplastik ve hücresel antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, POX, APX, GR) aktiviteleri, bitkilerin kök gövde kuru ağırlıkları, klorofil tayini, bakteri ekstrasellüler proteinlerinin SDS-PAGE elektroforez işlemleri ve ACC deaminaz aktiviteleri belirlenmiştir. Yapılan deneylerden elde edilen verilerin yorumlanması ve diğer araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırmalı değerlendirmeleri aşağıda sunulmuştur. Literatürde soğuğa toleranslı bitki kök rizosferinden izole edilmiş PGPB'lerin (Mishra *et al.* 2009) veya tescilli (ticari) olan PGPB'lerin (Turan *et al.* 2013) uygulandığı bitkilerde soğuk stresi cevap mekanizmalarını belirleyen sadece birkaç çalışma bulunmaktadır. Ancak, bu çalışmada yapıldığı gibi, literatürde soğuğa toleranslı yabani bitkilerin yaprak apoplastından izole edildikten sonra, bir kültür bitkisinde soğuğa cevap mekanizmalarının biyokimyasal ve fizyolojik olarak belirlendiği herhangi bir çalışma belirlenememiştir. Bu nedenle çalışmanın hemen her basamağı literatür için yeni bilgiler sağlayacaktır. Veriler tartışılırken, varsa öncelikle benzer çalışmalardan elde edilen verilerle değerlendirmeler yapılmış, yoksa yakın çalışmalara ve temel bilgilere göre genel bir değerlendirme yapılmıştır.

Çalışmada 16 tane soğuğa toleranslı yabani ve kültür (çilek) bitkilerinin (Şekil 4.1) yaprak apoplastından 10 bakteri türü ve bu türlere ait toplam 20 psikrofil izolat elde edilmiştir (Çizelge 4.1). İzole edilen bakterilerin tür bazında teşhisleri 16S rRNA dizi analizlerine veya Vitek yöntemine göre yapılmıştır. Kullanılan bitkiler soğuğa toleranslı

bitkilerdir. Örneğin; *Onosma isauricum*, *Verbascum cheiranthifolium*, *Chenopodium botrys*, *Chenopodium foliosum*, *Myosotis alpestris* sp., *Capsella bursa-pastoris* sp., *Artemisia austriaca*, *Draba nemorosa*, *Raphanus raphanistrum*, *Trifolium repens*, *Fragaria vesca*, *Taraxacum sieheanum* *Colchicum speciosum*, *Scilla siberica* bitkisi Erzurumda (-1°C /-20°C gündüz /gece) ayrıca *Galanthus gracilis*, *Erodium cicutarium* bitkileri de Erzincanda (5°C /-2°C gündüz/gece) canlı olarak toplanmışlardır. Soğuğa dirençli bitkilerde endofitik veya epifitik olarak ortak yaşayan bazı bakterilerin bitkilerin soğuğa toleransını arttırmada önemli rol aldıkları birçok çalışmada gösterilmiştir (Sultan *et al.* 2001; Selvakumar *et al.* 2007). Bu bakteriler genel de psikrofil bakterileridir. Psikrofil bakterileri soğuk şartlara (0-15°C) oldukça dirençli bakterilerdir. Bu bakterilerin bitkilerle ortak yaşayanları iki grupta incelenmektedir. Birinci olarak buz nükleasyon bakterileridir (INB) (Kawahara *et al.* 2002). INB'lerin çoğu bitkiler için patojen bakterilerdir. Bunlar bitki dokularında donma noktasını aşağı derecelere çekerek donmanın daha erken aşamada (donmanın gerçekleşeceği sıcaklıktan daha önce) başlamasını sağlarlar. Donmayla bitki hücre ve dokularında oluşan yaralardan içerilere girip kendileri için uygun enfeksiyon alanları oluştururlar (Lindow 1983). INB hücre dışına salgıladıkları buz nükleasyon proteinleri (INP) ile sulu çözeltilerin donma noktasını yükselterek bu olayı başarırlar (Tomalty *et al.* 2014). Diğer grup bakteriler ise antifiriz özelliğinde olan INB'lerdir. Bunlar bitki dokularının ekstrasellüler ve interselular alanlarında (apoplastik alanlarda) çoğu simbiyotik olarak yaşayan bakterilerdir (Upper and Vali 1995). Bu bakteriler bulundukları alanlarda salgıladıkları protein veya diğer metabolitlerle sulu çözeltilerin donma noktasını geciktirirler (INA'ni artırır). Çünkü donma, bitkilerde apoplastik alanlarda gerçekleşir ve kontrol edilemezse bitki dokularında geri dönüşümsüz hasar ve ileri aşamalarda ölüme yol açar. Bu tip bakterilerin salgıladıkları protein ve diğer metabolitler apoplastta donmanın gecikmesini ve böylece bitkinin donma hasarından korunmasına katkı yapar (Gerday and Glansdorff 2007; Margesin *et al.* 2008). Çalışmada izole edilen apoplastik bakterilerin bitki büyümesini arttıran bakteriler (PBPB) grubunda olduklarını gösteren önemli verilere ulaşılmıştır.

Diğer taraftan, literatür incelemelerine göre çalışılan bitkilerde şu ana kadar benzer bir çalışma yapılmamıştır. Ancak yapılan bir çalışmada *Artemisia spp.*, *Chenopodium album*, *Onosma sp.*, *Verbascum sp.* *Chenopodium foliosum* yabancı bitkiye ait rizosfer toprağından ACC deaminaz enzimi ürettikleri ve bu enzim bitkilerdeki stres etileninin miktarını azaltarak onların biyotik ve abiyotik stres koşullarında büyümesini sağladığı gözlenmiştir (Kadioğlu 2013).

Çalışılan bakterilerden *Sphingobacterium faecium*, *S. kitahiroshimense* ile ilgili çalışmalar yokken diğer cins veya tür bakımından aynı olan bakterilerle ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; PGPR olan *Pseudomonas fluorescens* mısır bitkisinde farklı tuz konsantrasyonlarında bitkide stresi azalttığı buna karşın gelişme verim parametrelerini artırdığı gözlenmiştir (Nadeem *et al.* 2007). Aynı bakteri türü *Brassica napus*'ta Cd toksisitesine karşı koruma sağladığı ve bitki gelişmesini teşvik ettiği görülmüştür (Dell'Amico *et al.* 2008). Başka bir çalışmada da *Bacillus cereus* soğuk şartlardaki marul ve domateste fide biyomas artışına neden olduğu gözlenmiştir (Hoffmann-Hergarten *et al.* 1998). *Brevibacterium frigoritolerans* *Zea mays*'ta kuraklığa tolerans sağladığı belirlenmiştir (Raza *et al.* 2015). PGPR *Raoultella terrigena* buğday ve arpaya inokule edilmiş ve donma hasarının azaldığı gözlenmiştir (Turan *et al.* 2013). Yapılan bu çalışmalar izole edilen bakterilerin PGPB grubunda olduklarını göstermektedir.

Çalışmada hem normal hem düşük sıcaklıkta yetiştirilen fasulye fidelerine bakteri izolatlarının uygulanması, kök ve gövde kuru ağırlıklarında kontrollerine göre genelde artışlara sebep olmuştur (Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6). Normal şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerinde 6 bakteri izolatu (DT-3, 11, 14, 16, 18, 20) hem kök ağırlığını hem de gövde ağırlığını istatistiksel olarak artırmıştır. Diğer bakteriler ise bazısı kök ağırlığını stimüle ederken bazısı ise gövde ağırlığını artırmıştır. Kök ve gövde ağırlığı üzerine olumsuz etki yapan izolatlar da görülmektedir. Soğuk şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerinde 12 bakteri izolatu (DT-1, 2, 3, 5, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 19) hem kök ağırlığını hem de gövde ağırlığını istatistiki olarak artırmıştır. Diğer bakteriler ise bazısı kök ağırlığını arttırırken bazısı gövde ağırlığını artırmıştır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde 12 bakteri

izolatının soğuk şartlarda bitki ağırlığının artışına önemli katkı yaptığı sonucuna ulaşılmıştır.

Literatürde PGPB bakterileriyle ilgili çalışmalarda da bu tip bakterilerin bitkilerin kök ve gövde ağırlıklarını arttırdığı belirlenmiştir. Örneğin, Himalaya bölgesindeki bitkilerin köklerinden izole edilen psikrotrofil *Pseudomonas* suşları ve *Exiguobacterium acetylicum* soğuk şartlardaki mercimek ve buğday bitkilerinde bitki kütlesinde artışlara neden olmuştur (Selvakumar *et al.* 2010; Mishra *et al.* 2011; Bisht *et al.* 2013). *Cucurbita pepo*'dan izole edilen PGP *Serratia marcescens* bakterisi de düşük sıcaklıkta yetiştirilen buğday tohumlarına inokule edilmiş kök ve gövde kuru ağırlığını inokule edilmeyen kontrol bitkilerine göre artırdığı gözlenmiştir (Selvakumar 2007). Bunlara ilave olarak, tescilli bazı bitki büyüme ve düzenleyici rizobakteriler (PGPR) soğuk şartlarda yetiştirilen buğday ve arpada kök ve gövde kuru ağırlığını artırmıştır (Turan *et al.* 2013).

Düşük sıcaklık sonucu oluşan üşüme veya donma zararlarının etkisiyle dokularda elektrolit sızıntısı artmaktadır. Bu durum üşüme veya donma sonrası hücre membranlarında meydana gelen hasarlardan kaynaklanmaktadır (Wang 1994). Membran geçirgenliğinin artması nedeniyle hücrelerin dış ortamla yaptığı elektrolit alışverişinde artış olmaktadır. Elektrolit sızıntısının artışı hücre ve dokularda üşüme veya donma hasarı (DH) ile doğrudan ilişkilidir (Campos *et al.* 2003). Çalışmada fasulye fidelerine tek başına düşük sıcaklık uygulaması elektrolit sızıntısını (Donma Hasarını) arttırmış ve ayrıca donma hasarının daha erken derecelerde başlamasına neden olmuştur. Örneğin -8°C'de kontrol bitki yapraklarındaki %DH 68 iken, soğuk uygulamasıyla 83 olmuştur. Ayrıca kontrolde %DH en fazla %75 olurken, soğuk uygulamasıyla %100'e kadar ulaşmıştır. Düşük sıcaklık öncesi uygulanan bakteri izolatlarının hemen hepsi yapraklarda %DH'nı önemli ölçüde düşürmüştür. Örneğin soğuk uygulanmış fasulyede DH'ı -8°C'de %83 iken, DT-1, DT-2, DT-3, DT-10, DT-11 bakteri izolatlarında sırasıyla %15, %16, %14, %14, %13 olmuştur (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14). Görüldüğü gibi uygulanan bakteriler her bir sıcaklıkta %DH'nı önemli ölçüde düşürmüşlerdir. Buna ilave olarak soğuk uygulanmış

fidelerde %50'lik hasara (Ölümcül kabul edilen eşik hasar seviyesi) -6°C 'de ulaşılmışken, soğuk+bakteri uygulanmış fidelerde genelde -8°C 'de bile ulaşılmamıştır. Donma hasarı çalışmalarını destekleyen diğer bir veri, bitkilerin görsel durumları olmuştur. Şekil 4.7'ye dikkat edilirse DT-3, 5, 6, 9, 8, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ve 19 no'lu izolatların uygulandığı fideler, soğuk kontrollerine göre, belirgin bir iyileşme göstermişlerdir. Bu veriler soğuk stresinden önce uygulanan bakteri izolatlarının fasulyede düşük sıcaklık stresi toleransının artışına katkı yaptığını göstermektedir.

Literatürde yukarıda sunulan verilerimizi destekleyen bazı çalışmalar bulunmaktadır. Arpa çeşitlerinin düşük sıcaklığa maruz bırakılmasıyla elektrolit geçirgenliğinin artışına bağlı olarak donma hasarının da arttığı belirlenmiştir (Plazek and Zur 2003; Mutlu 2009). PGPR'lerin buğday ve arpa'ya inokule edildiğinde, donma hasarının azalttığı gözlenmiştir (Turan 2013). Sıcaklığın düşük olduğu Himalaya topraklarından izole edilen psikotolerant *Pseudomonad* suşları buğday tohumlarına inokule edildiğinde, soğuk stresi sonucu oluşan semptomların azaldığı gözlenmiştir (Mishra *et al.* 2011). Yapılan bir başka çalışmada düşük sıcaklıktaki asma bitkisine inokule edilen *Burkholderia phytofirmans* suşlarının donma sıcaklığında elektrolit kaçacağını düşürdüğü gözlenmiştir (Barka *et al.* 2006). Himalaya'da yalancı iğde rizosferinden izole edilen soğuğa toleranslı bir mayanın (*Rhodotorula sp.*) soğuk stresini tolere ettiği gözlenmiştir (Mundra *et al.* 2011).

Son yıllarda, stres altındaki bitkilerde apoplastik bölge ve bu bölgenin streslere cevaptaki rolü ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Minibaeva *et al.* 2003; Tasgın *et al.* 2006; Mutlu 2009; Esim 2011). Bitkilerde ve özellikle de bitki yapraklarının apoplastik alanında gerçekleşen buz oluşumu donmaya bağlı soğuk zararının ana nedenlerinden birisidir (Griffith *et al.* 1992; Hernandez *et al.* 2001; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Tasgın *et al.* 2006). Buz oluşumu, membranların parçalanmasına, hücresel bütünlüğün bozulmasına ve dehidrasyonuna neden olur (Hernandez *et al.* 2001; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Mahajan and Tuteja 2005). Bitkilerde apoplastik buz oluşumunu önleyecek, kontrol edebilecek veya

geciktirebilecek bileşiklerin bitkinin soğuğa karşı koyma potansiyelini artırabildiği önceki çalışmalarda ortaya konulmuştur (Griffith *et al.* 1992; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşgın *et al.* 2006). Çalışmada, fasulyede soğuk ve soğuk+bakteri uygulanmış bitkilerin yaprak apoplastik sıvıları alınmış ve bu sıvılarda apoplastik proteinler çöktürülmüştür. Elde edilen apoplastik proteinlerin saf suyun donma noktasını geciktirme dereceleri (Buz Nükleasyon Aktiviteleri) belirlenmiştir. Kontrol şartlarındaki bitki yaprak apoplastik proteinlerin donma noktası (BNA) $-6,7^{\circ}\text{C}$ olarak belirlenmiştir. Ancak soğuğa maruz kalmış bitki yaprak BNA ise $-7,3^{\circ}\text{C}$ olmuştur. Bitki soğuğa maruz kaldığında, bir adaptasyon olarak, apoplastik sıvıların içeriğini değiştirmekte ve donma noktasını geciktirebilmektedir. Donma noktasının gecikmesi donma hasarının da gecikmesi veya önlenmesi anlamına gelmektedir. Çalışmada soğuk stresi öncesi bakteri uygulanmış fidelerde donma noktasının, tek başına soğuk uygulanmış gruba göre, önemli oranda geciktirildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Örneğin Soğuk+bakteri uygulamaları, tek başına soğuk uygulaması ile kıyaslandığında, BNA’inde önemli bir artışa (donma noktasının düşüşüne) neden olmuştur, yani donma noktası önemli derecede geciktirilmiştir. Örneğin; DT-18 bakterisi aktiviteyi %24.6 oranında arttırarak donma noktasını $1,8^{\circ}\text{C}$ geciktirmiştir. DT-16 bakterisi de aktiviteyi %28.7 arttırarak donma noktasını $2,1^{\circ}\text{C}$ geciktirmiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.18). Düşük sıcaklık stresinden önce fasulye yapraklarına uygulanan bakteri izolatlarının hemen hepsi, apoplastik proteinlerin BNA’ni arttırmıştır. Çalışmada soğuk gelmeden önce bitkiye uygulanan psikrotolerant bakteri izolatlarının, bitki soğuğa maruz kaldığında yaprak apoplastına bazı ekstra proteinleri salgıladıkları ve bu yolla apoplastta buz oluşumunu geciktirebildikleri düşünülmektedir. Bu veriler çalışılan bakteri uygulamaları ile fasulyede düşük sıcaklık stresi toleransının arttırıldığını göstermektedir.

Hücrel antioksidan enzimler, olumsuz çevresel faktörler nedeniyle aşırı üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROT) hücre ve doku ortamlarında süpürülmesini sağlarlar. Bu durum hücrelerde oksidatif hasarı düşürerek bitkinin değişen çevre şartlarına uyum sağlamasına yardımcı olabilmektedir. Çalışmada, bakteri uygulanmış ve uygulanmamış fasulye fidelerinde hem apoplastik hem de hücrel antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, POX, APX ve GR) aktiviteleri değerlendirilmiştir.

SOD bitkilerdeki antioksidan sistemin önemli bir enzimatik bileşenidir. O_2^- radikalini H_2O_2 'ye parçalayan reaksiyonu katalizler (Raychaudhuri and Deng 2000). SOD enzim aktivitesinin artması, hücrede O_2^- radikalinin oluşumunun bir kanıtı olmakla birlikte, H_2O_2 miktarının da arttığının bir göstergesidir (Liochev and Fridovich 2007). Çalışmada normal şartlarda yetiştirilen bitkilerde bakteri izolatlarının (DT-13 izolatı hariç) hemen hepsi kontrole göre, apoplastik SOD aktivitesinde genelde artışa neden olmuştur (Çizelge 4.5). Örneğin; DT-18 bakteri uygulaması %95'lik bir artışa neden olmuştur, DT-17 bakteri izolatı da aktiviteyi %94 oranında artırmıştır. Tek başına düşük sıcaklık da kontrole göre, apoplastik SOD aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Soğuk stresinden önce bakteri uygulamaları (Soğuk+bakteri), tek başına soğuğa göre, aktivitede önemli artışlara neden olmuştur (Çizelge 4.5). Mesela DT-8 bakterisi %75'lik önemli bir artışa neden olurken, DT-13 bakterisi de %70'lik bir artışa neden olmuştur. Hücresel SOD aktivitesi verileri incelendiğinde, apoplastik SOD aktivitesine benzer sonuçlar görülmektedir (Çizelge 4.5). Kısaca, normal şartlarda yetiştirilen bitkilerin bakteri uygulamaları kontrole göre hücresel SOD aktivitesinde genelde artışa neden olmuştur. Örneğin DT-10 bakteri uygulaması ise SOD aktivitesini %100'den artırmıştır. Soğuk+Bakteri uygulamaları da aktivitede genelde artışa neden olmuştur. Yalnızca DT-18, 19, 20 bakterileri düşüşe neden olmuştur. (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.21, 4.22). Sonuçlar topluca değerlendirildiğinde soğuk stresinden önce uygulanan bakteri izolatlarının neredeyse hepsi, kontrollerine göre, hem apoplastik hem de hücresel SOD aktivitesini artırmıştır. Bu veriler literatür için ilk verilerdir.

Literatürde, bu çalışmada yapıldığı şekliyle, bir bitkiye PGPB uygulandıktan sonra bitkide apoplastik ve hücresel SOD aktivitelerini değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, verileri doğrudan benzer bir çalışmayla karşılaştırmak mümkün olamadığından, konu itibarıyla yakın çalışmaların sonuçları ile kıyaslanmıştır. Düşük sıcaklıkta yetiştirilen buğday ve arpa bitkilerine ticari PGPR (*Bacillus megaterium* ve *Bacillus subtilis*) uygulandığında her iki bitkide hücresel SOD aktivitelerinde artış gözlenmiştir (Turan *et al.* 2013). Kuraklık stresi altındaki mısır bitkisine *Pseudomonas* spp. inokulasyonu ile aktivite düşerken, marul (*Lactuca sativa* L.) bitkisinde enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir (Sandhya *et al.* 2010). Bu

alışmalar sonuçlarımızın hücresel SOD aktivitesiyle ilgili bölümlerini desteklemektedir.

CAT'ın bitki dokularında H₂O₂'nin zararsız hale dönüştürülmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Ogawa *et al.* 1997). Bu enzimin stres savunma sisteminin önemli bir bileşiği olduğu belirtilmiştir (Willekens *et al.* 1997). Literatürde, soğuk stresiyile CAT aktivitesinin hem arttığı hem düştüğü ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Düşük sıcaklığa toleransları farklı iki arpa çeşidinde apoplastik CAT aktivitesinin arttığı (Mutlu 2009), mısır yapraklarında ise azaldığı görülmüştür (Esim 2011). Buğday, arpa, avdar 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 ncel 2002). Mevcut araştırmada da tek başına soğuk uygulamasının fasulyede apoplastik CAT aktivitesini düşürdüğü, ancak hücresel CAT aktivitesini artırdığı belirlenmiştir (izelge 4.6). Bu sonuç yukarıda yapılan bazı çalışmalarla uyum içindedir.

Bakteri uygulamaları ile ilgili sonuçlara bakıldığında, normal şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerinde bazı bakteri uygulamaları apoplastik CAT aktivitesini artırmıştır. Örneğin; DT-2, 10, 13 ve 20 bakteri uygulamalarında artış %100'n üzerinde gerçekleşmiştir. Yalnızca 5 bakteri izolatında (DT-1, 9, 14, 18, 19) apoplastik aktivitede düşüş gözlenmiştir (şekil 4.23). Soğuk+bakteri uygulamaları apoplastik CAT aktivitesini genelde artırmıştır. DT-4, 9, 10, 20 bakteri izolatları aktivitede %100'n üzerinde artışa neden olmuşlardır. DT-1, 3, 5, 6, 8 izolatları ise aktivitede önemli düşüşe neden olmuştur (şekil 4.24).

Hücresel CAT aktivitesi ise normal şartlarda yetiştirilen fidelere bakteri uygulamalarında genelde düşmüştür (izelge 4.6 ve şekil 4.25). Örneğin *Galanthus gracilis* yabani bitkisinden izole edilen DT-13, 14, 15 bakteri izolatlarının hepsi aktivitede düşüşe neden olmuştur. Ancak DT-8, 9, 10 ve 11 no'lu izolatlar hücresel CAT aktivitesini artırmıştır. Soğuk+bakteri uygulamalarında aktivitede genel (DT-2

hariç) bir düşüş belirlenmiştir. DT-14 bakterisinde düşüş %50'nin üzerinde gözlenmiştir. (Çizelge 4.6, Şekil 4.26). Görüldüğü gibi soğuk+bakteri uygulanmış fidelerde apoplastik CAT aktivitesini arttıran bakteriler olduğu gibi, düşüren bakteriler de bulunmaktadır. Bazı bakteriler ise istatistik anlamda önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Hücrel CAT aktivitesinde ise soğuk+bakteri uygulamaları aktiviteyi genelde düşürmüştür. Literatürde benzer bir çalışma olmadığından birebir karşılaştırmak mümkün olmamıştır. Yapılan çalışmalarda düşük sıcaklıkta yetiştirilen buğday ve arpa bitkilerine ticari PGPR (*Bacillus megaterium* ve *Bacillus subtilis*) ve marula *Pseudomonas* spp. inokulasyonu ile hücrel CAT aktivitelerinde artış gözlemlendiği belirtilmiştir (Kohler 2008; Turan *et al.* 2013). Bu çalışmalar sonuçlarımızın hücrel CAT aktivitesiyle ilgili bölümlerini desteklemektedir. Bu çalışmada ise bir izolat hariç (DT-1) tümünde genelde düşürmüştür. Bu durum kullanılan bakteri ve stres farklılığından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada normal şartlarda yetiştirilen bitkilerin bakteri uygulamaları, kontrole göre, apoplastik POX aktivitesinde genelde artışa neden olmuştur (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.27). DT-6 ve DT-18 bakterilerinde bu artış %50'nin üzerinde gerçekleşmiştir. DT-1, 16 ve 17 no'lu izolatlar ise aktiviteyi düşürmüştür. Soğuk+bakteri uygulamalarından 12'si apoplastik aktivitede düşüşe, 8 bakteri ise artışa neden olmuştur. DT-1 bakterisi önemli bir artışa neden olmuştur, DT-9 bakterisinin de önemli düşüşe neden olduğu görülmüştür. Normal şartlarda yetiştirilen bitkilerde kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücrel POX aktivitesini bakteri uygulamalarının yarısı arttırırken, diğer yarısı da azaltmıştır. DT-4, 8, 9, 10 bakterilerinde %50'nin üzerinde düşüşe neden olduğu gözlenmiştir. Soğuk+bakteri uygulamalarında DT-14, 15, 16 ve 20 bakteri izolatları aktiviteyi önemli ölçüde arttırırken, diğer izolatlar genelde düşürmüştür (Çizelge 4.7, Şekil 4.29, 4.30).

Apoplastik POX aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda genelde stres şartlarındaki bitkilerde aktivitenin arttığı rapor edilmiştir. Kışlık buğdayla yapılan bir çalışmada soğuk uygulaması apoplastik POX aktivitesini arttırmıştır (Tasğın *et al.* 2006). Düşük sıcaklığa hassas olan mısırın yapraklarında hem 14 hem de 28 günlük bitkilerin

apoplastik POX aktivitesi azalmış 21 günlükte ise arttığı görülmüştür (Esim 2011). Buğday, arpa,  avdar ve yulaf bitkileri soğukta büyütüldüklerinde POX aktivitesinin arttığı bulunmuştur (Janda *et al.* 2003). Bunlara ilave olarak, düşük sıcaklıkta yetiştirilen buğday ve arpa bitkilerine ticari PGPR (*Bacillus megaterium* ve *Bacillus subtilis*) ve marula *Pseudomonas* spp. inokulasyonu ile hücresel POX aktivitelerinde artış gözlenmiştir (Kohler 2008; Turan *et al.* 2013). Sonuçlar yukarıda verilen bilgilerle ile uyumludur. Bu çalışmadan elde edilen veriler literatüre önemli, katkı yapacaktır. Verilere göre, POX aktivitesini hem apoplastta hem de hücrede arttıran ve düşüren bakteriler belirlenmiştir. POX aktivitesinin artışı ve düşüşü avantaj mı? Yoksa bitkinin soğuğa toleransı için dezavantaj mı? Sorusuna cevap, bütün antioksidan sistemin tartışılmasıyla daha net ortaya çıkarılacaktır.

Çalışmada normal şartlarda yetiştirilen bitkilerin bakteri uygulamaları, kontrole göre, **apoplastik** APX aktivitesinde genelde düşüşü neden olmuştur. Yalnızca DT-8, 10, 15 bakteri izolatları istatistiki önemli olmayan artışa neden olmuşlardır. Soğuk+Bakteri uygulamaları ise apoplastik APX aktivitesini genelde artırmıştır. DT-2 bakterisi %80'lik bir artışa neden olmuştur. Ancak, DT-11 ve 15 bakteri izolatları istatistiki olarak önemli olmayan düşüşü neden olmuştur ( izelge 4.8 ve şekil 4.31, 4.32).

Normal şartlarda yetiştirilen bitkilerin bakteri uygulamaları kontrole göre **hücresel** APX aktivitesinde genelde düşüşü neden olmuştur. DT-3, 9, 10, 11 bakteri uygulamalarında önemli olmayan bir artış gözlenmiştir. Soğuk+bakteri uygulamaları, tek başına düşük sıcaklığa göre, aktiviteyi genelde d ş rm ştir. Yalnızca DT-11, 17, 18 bakterileri önemli olmayan bir artışa neden olmuşlardır. ( izelge 4.8 ve şekil 4.33, 4.34).

Literatürde PGPB bakteri uygulanmış bitkilerde APX aktivitesi üzerine herhangi bir çalışma olmasa da soğuk stresi şartlarında bu enzimin aktivitesini değerlendirilen çalışmalar bulunmaktadır. Soğuk stresinin hem nohut hem de buğday bitkilerinde APX aktivitelerini önemli oranda arttırdığını göstermektedir (Genişel 2012). Kışlık arpa ile yapılan bir çalışmada soğukla APX aktivitesinde artış gözlenmiştir (Janda 2003).

Çalışmada normal şartlarda yetiştirilen bitkilerde apoplastik GR aktivitesi 11 bakteri tarafından artırılırken, 9 bakteride ise düşürmüştür (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.35). DT-13 ve 19 bakteri uygulamaları %100 den fazla oranda aktivitede artışa neden olmuştur. DT-3 ve 15 bakterileri %50'den fazla oranda aktivitede azalmaya neden olmuştur. Soğuk+Bakteri izolatlarından 12'si apoplastik aktivitede artışa neden olurken, 8 bakteri düşüşe neden olmuştur. Önemli olanlarından birkaç örnek verecek olursak; DT-8 bakterisi %82, DT-14 bakterisi %88, DT-17 ise %90'lık artışa neden olmuştur. DT-2 bakterisi ise %70'lik bir düşüşe neden olmuştur (Şekil 4.36).

Hücrel GR aktivitesine ait sonuçlara dikkat edildiğinde, hem normal şartlarda hem de düşük sıcaklıkta 4 bakteri hücrel aktivitede artışa neden olurken, 16 bakteri aktiviteyi düşürmüştür. Normal ve soğuk şartlarda bakteri uygulamalarından DT-6, 18, 19 bakterileri aktivitede artışa neden olmuştur. (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.37, 4.38). Çeşitli bitkilerde soğuğa uyum sırasında GR enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Zhao and Blumwald 1998; Kocys *et al.* 2000). Yapılan bir çalışmada kışlık arpada düşük sıcaklık uygulamasıyla yapraklarda GR aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Janda 2003). *Arabidopsis* ve salatalıkta donma stresinde GR aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Lee and Lee 2000). Yapılan literatür çalışmalarında soğuk stresi koşullarında PGPR bakterileri uygulanmış bitkilerde apoplastik ve hücrel GR aktivitesinin değişimi ile ilgili herhangi bir veriye rastlanılmamıştır. Mevcut veriler literatürdeki önemli bir boşluğu dolduracak niteliktedir.

Lipid peroksidasyonu (LPO), hücre membranları lipidlerinin süperoksid anyonu (O_2^-), singlet oksijen (O_2^1), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^\cdot$) gibi serbest radikallerle etkileşmesi sonucu ortaya çıkar ve sonuçta hücrel zarların bozulmasına yol açar (de Azevedo Neto *et al.* 2006). Böyle durumlarda membranlardaki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyon ürünü olarak Malondialdehid (MDA) ortaya çıkar. MDA miktarındaki artış, hücre zarlarının yapısal bütünlüğünün bozulduğunun en önemli işaretlerinden birisidir (Posmyk *et al.* 2005). Nohutla yapılan bir çalışmada soğuğa maruz kalan fidelerde MDA miktarının ve buna bağlı olarak MDA seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Turan 2007). Soğuğa hassas *Coffea* bitkisine soğuk uygulamasından

sonra MDA içeriğinin arttığı gözlenmiştir (Campos *et al.* 2003). Kuraklık stresi altındaki çemen otu bitkisiyle yapılan bir çalışmada ACC deaminaz aktivitesine sahip *Bacillus subtilis* uygulanmış ve MDA içeriğinin kontrole göre azaldığı gözlenmiştir (Barnaval *et al.* 2013).

Çalışmada, düşük sıcaklık kontrole göre fasulye bitkisinin yapraklarında MDA miktarında önemli artışa neden olmuş ve literatürle paralellik göstermiştir. Normal şartlarda yetiştirilen bitkilere bakteri uygulamaları, kontrole göre, MDA miktarını genelde düşürmüştür. Yalnızca DT-10 ve DT-11 bakteri izolatları MDA miktarını artırmıştır. Her iki bakteri de *Bacillus cereus* türüne ait farklı izolatlardır. Bu bakterilerin bir başka izolatları (DT-11 ve 6) ise MDA miktarını düşürmüştür. Görüldüğü gibi aynı bakterinin farklı izolatları bitkide farklı etkiye neden olabilmektedir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.39, 4.40). Soğuk+Bakteri uygulamaları MDA miktarını genelde düşürmüştür. Örneğin DT-4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 izolatlarında MDA seviyesi ya düşmüş yada değişmemiştir. DT-17 izolatı %50 oranında düşürmüştür. DT-10 ve DT-12 bakteri izolatları MDA miktarında önemli olmayan bir artışa neden olmuşlardır. Uygulanan bakteri izolatlarının MDA seviyesini düşürmesi soğuk toleransının iyileştirilmesi açısından önemli bir veridir. Çalışılan bakteri izolatlarının neredeyse hepsinin bu etkiye sahip olması da ayrıca önemli görülmüştür.

Önemli bir ROT olan H_2O_2 'nin oksidatif stres esnasında içsel seviyesinin artması, bilim insanları için stresin bir işareti olarak değerlendirilmektedir (Cheeseman 2006). Düşük sıcaklıkta H_2O_2 'nin nasıl etkilendiğine ait çalışmalar bulunmaktadır. 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 ise düşük sıcaklık muamelesinin hem dayanıklı hem de hassas çeşitte H_2O_2 miktarını düşürdüğü gözlenmiştir (Mutlu 2009). Düşük sıcaklığa hassas olan mısırın yapraklarında düşük sıcaklık uygulaması H_2O_2 miktarlarında önemli artışlara neden olmuştur (Esim 2011). Bu çalışmada da düşük sıcaklık fasulye fidelerinde H_2O_2 miktarlarında önemli artışa neden olmuştur (Çizelge 4.11 ve Şekil

4.41, 4.42). Çalışmada, normal şartlarda yetiştirilen bitkilerin bakteri uygulamaları kontrole göre H_2O_2 miktarını genelde düşürmüştür. DT-13, DT-15, DT-16, DT-17 bakteri izolatları ise H_2O_2 miktarını artırmıştır. Soğuk+Bakteri uygulamaları ise H_2O_2 miktarını genelde düşürmüştür. Öyle ki DT-10, 19, 20 bakterileri %50'nin üzerinde bir düşüşe neden olmuştur. Sadece DT-15 ve DT-17 bakteri izolatları istatistik olarak H_2O_2 miktarını artırmıştır (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.41, 4.42). Bu çalışmayı destekleyen verilere literatürde rastlanılmamıştır. Düşük sıcaklıkta yetiştirilen buğday ve arpa bitkilerine ticari PGPR uygulandığında, her iki bitkide H_2O_2 miktarında düşüş gözlenmiştir (Turan *et al.* 2013).

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. Yabani hardal (Liu *et al.* 2010) ve salatalık (Jing *et al.* 2009) düşük sıcaklığa maruz kalmasıyla $O_2^{\cdot-}$ miktarının arttığı bildirilmiştir. Düşük sıcaklığa hassas olan mısırın yapraklarında düşük sıcaklık uygulaması 14, 21 ve 28 günlük mısır bitkisinin yapraklarının $O_2^{\cdot-}$ miktarlarında önemli artışlara neden olduğu tespit edilmiştir (Esim 2011).

Çalışmada düşük sıcaklık uygulaması kontrole göre fasulye bitkisinin yapraklarının $O_2^{\cdot-}$ seviyesinde artışa neden olmuştur. Normal şartlarda yetiştirilen bitkilere bakteri uygulamaları, kontrole göre, $O_2^{\cdot-}$ miktarını genelde düşürmüştür. DT-13, DT-18, DT-19 uygulamalarında %50'nin üzerinde düşüş gözlenmiştir. Yalnızca DT-11 ve DT-16 bakteri izolatları önemli olmayan bir artışa neden olmuştur. (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.43, 4.44). Oysa tek başına düşük sıcaklık uygulamasına göre, soğuk+bakteri uygulamalarının bütünü $O_2^{\cdot-}$ miktarını düşürmüştür. Örneğin; DT-8 ve DT-19 bakterileri %50'nin üzerinde bir düşüşe neden olmuştur. Soğuk stresinden önce uygulanan bakteri izolatları fasulye yapraklarında $O_2^{\cdot-}$ anyonu miktarını düşürmesi önemli bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. H_2O_2 içeriğinde bazı dalgalanmalar olsa da $O_2^{\cdot-}$ anyonunda azaltmada uygulamaların tümü olumlu etki yapmıştır. Bu sonuç bakteri izolatlarının bitkide oksidatif stresi azaltmaya neden olduğunu göstermesi bakımından önemlidir.

Bakteriler bu etkiyi antioksidan enzimlerin aktivitesini düzenleyerek yapmış olabileceğini düşündürmektedir.

Soğuk stresine cevap mekanizmaları arasında klorofil miktarının düzenlenmesi önemlidir. Çünkü metabolizma hızının düştüğü bir durumda klorofil miktarının yüksek tutulamazsa ışık toksitesi denilen bozukluklar ortaya çıkar. Çalışmada, normal şartlarda yetiştirilen fasulye fidelerinde 8 bakteri izolatu klorofil-a miktarını arttırmış, 12 bakteri ise azaltmıştır. Ancak DT-18, 19, 20 izolatları önemli oranda düşürmüştür. Bakterilerin neden olduğu artış ise istatistiksel olarak önemli değildir. Klorofil-b miktarını ise 12 bakteri izolatu arttırmış 8'i ise azaltmıştır. DT-14 bakteri izolatu %97 oranında artışa neden olmuştur. Total klorofil miktarını ise 8 bakteri arttırmış, 12 bakteri ise azaltmıştır. Tek başına düşük sıcaklık, fasulye fidelerinde klorofil-a, klorofil-b, total klorofil miktarı, normal şartlarda yetiştirilen fasulye bitkisine göre, önemli oranda düşürmüştür. Ancak düşük sıcaklıkta yetiştirilen bitkilere uygulanan bakteriler, kontrolü olan tek başına soğuk uygulamasına göre, klorofil-a, klorofil-b ve total klorofil miktarını arttırmıştır (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.46, 4.48, 4.50). Bazı çalışmalar mevcut sonuçlarla örtüşmektedir. Örneğin kuraklık stresi altındaki çemen otu bitkisiyle yapılan bir çalışmada *Bacillus subtilis* uygulanmış fidelerde klorofil içeriğinin kontrole göre arttığı gözlenmiştir (Barnaval *et al.* 2013). Sıcaklığın düşük olduğu Himalaya topraklarından izole edilen psikotolerant *Pseudomonas* suşları soğuk şartlardaki buğday tohumlarına inokule edildiğinde de total klorofil içeriğinin inokule edilmemiş olanlara göre arttığı gözlenmiştir (Mishra *et al.* 2011). Bu değerlendirmelere göre, mevcut izolatların PGPB grubunda olduğu söylenebilir.

Kuraklık, sıcaklık, tuzluluk ve oksidatif stres sırasında bitkilerde etilen hormonu üretimi artar (Morgan and Drew 1997). Etilen programlı hücre ölümü olan senesensi ve absisyonu tetikler. Aminosiklopropan karboksilik asit (ACC) ise bitki dokularında etilen sentezinde önemli bir ara üründür. Bazı bakteriler ACC deaminaz enzimi içerirler. Bu enzim ile ACC'nin etilene dönüşümü engellenir. Böylece etilenin bazı olumsuz etkileri giderilebilir. Yapılan birçok çalışmada ACC deaminaz içeren PGPB'lerin bitkinin strese toleransını artırdığı belirlenmiştir. Örneğin ACC deaminaz içeren PGPR bakterileri

tarafından bitki etilen seviyesinin düşürüldüğü ve böylece stresin zararlı etkilerinin azaltıldığı görülmüştür (van Loon and Glick 2004). Donma stresine maruz kalmış domates bitkilerine ACC deaminaz aktivitesine sahip mutant bakteri suşları inokule edilmiş ve etilen seviyesinin azaldığı görülmüştür (Subramanian *et al.* 2015). ACC deaminaz aktivitesine sahip bitki büyüme ve düzenleyici *Burkholderia phytofirmans* suşu soğuk stresi esnasında asma bitkisinde bitki büyümesini arttırdığı gözlenmiştir (Theocharis *et al.* 2012). Kanola tohumlarının ACC deaminaz enzimine sahip *P. fluorescens* türleri inokülasyonunun kanolada tohum çimlenmesi ve gelişimi üzerindeki tuzluluk stresinin olumsuz etkilerini hafiflettiği görülmüştür (Jalili *et al.* 2009). Çalışmada soğuğa toleranslı yabancı bitkilerden izole edilen bakteri izolatlarının hemen hepsinde ACC deaminaz aktivitesi belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Ancak izolatlar arasında aktivite bakımından farklılıklar belirlenmiştir. En düşük ACC deaminaz aktivitesine sahip bakteri izolatının 57.60 nmol/mg protein değeri ile *Brevibacterium frigoritolerans* (DT-20) olduğu gözlenmiştir. En yüksek aktivite değeri ise 335.38 nmol/mg protein ile *Pseudomonas fragi* (DT-7) bakteri izolatı olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.14). Diğer izolatlar 100-190 nmol/mg protein arasında değişmiştir. Yapılan bir çalışmada 9 PGPR suşunda ACC deaminaz aktivitesine bakılmış ve en fazla aktivitenin 539.1 nmol/mg protein ile *Klebsiella sp.* suşunda en düşük değerin ise 122.0 ile *Microbacterium sp.* suşunda olduğu gözlenmiştir. Diğer suşların ise 171-435 nmol/mg arasında değiştiği gözlenmiştir. Bu veriler de mevcut izolatların PGPB grubunda bakteriler olduklarını destekler niteliktedir. Ayrıca en yüksek ACC deaminaz aktivitesine sahip *Sphingobacterium faecium* (DT-3), *Staphylococcus intermedius* (DT-5), *Pseudomonas fragi* (DT-8), *Bacillus cereus* (DT-11) bakteri izolatlarının mevcut çalışmadaki diğer parametrelerde de iyileştirici etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Mikroorganizmalar geliştikleri ortama ekstrasellüler olarak birçok metabolit salgırlar. Bu metabolitler içerisinde ekstrasellüler proteinler önemli bir yer tutar. Bakterilerin salgıladıkları bu tip proteinler, bitkilerle simbiyotik ilişkileri kontrol ettiği gibi çevrelerindeki değişimlere adaptasyonlarını da düzenlerler (Mishra *et al.* 1999; Sardesai *et al.* 2001). Birçok PGPB grubunda olan bakterinin soğuk şartlarda çevrelerindeki sulu çözeltinin donmasını geciktiren soğuk şoku proteinleri (CSP) salgıladıkları

belirlenmiştir (Kandasamy *et al.* 2013). Mevcut çalışmada da soğuğa dirençli yabancı bitkilerin yaprak apoplastından izole edilen bakteri izolatları, soğuk şartlara (+5 °C) inkübe edildiğinde, normal şartlara göre, ekstrasellüler ortama birçok yeni protein salgılamıştır. İlave olarak bakteriler soğukta mevcut bazı proteinlerin seviyelerini de arttırmışlardır. Bunlarla ilgili çarpıcı örnekler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.51, 4.52, 4.53, 4.54, 4.55, 4.56). Çalışmada düşük sıcaklığa maruz bırakılan DT-1 bakteri izolatının ekstrasellüler band kalınlıklarında belirgin artış görülmüştür. 119 kDa'luk protein kontrol şartlarında düşük seviyede sentezlenirken, soğukta sentezinde belirgin artış gözlenmiştir. Diğer bandlarda da bu sonuç gözükmemektedir. DT-2 bakteri proteinlerinin şiddetinde de düşük sıcaklıkta kontrole göre artış gözlenmiştir. Soğukta 35 kDa'luk ekstra band gözlenmiştir. DT-3 ve DT-4 bakteri proteinlerinin miktarında da düşük sıcaklıkta artış gözlenmiştir (Şekil 4.51). DT-5 bakteri ekstrasellüler proteininin düşük sıcaklıkta 56 kDa büyüklüğünde ekstra bir band oluşturmuştur. DT-6 bakteri proteininin düşük sıcaklıkta 170 kDa'luk ekstra band oluşturmuştur. Normal şartlara göre diğer bandların şiddetinde de artış gözlenmiştir. DT-7 bakteri proteininde düşük sıcaklıkta özellikle 70 kDa'luk protein miktarında artış gözlenmiştir. DT-8 bakteri ekstrasellüler proteininde kontrole göre düşük sıcaklıkta band şiddetinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.52). DT-9 bakteri proteini özellikle düşük sıcaklıkta 100 kDa büyüklüğünde protein miktarında artış görülmüştür. DT-10 bakterisinde düşük sıcaklıkta 70 kDa büyüklüğünde normal şartlara göre ekstra bir protein bandı görülmüştür. DT-11, DT-12 bakteri ekstrasellüler proteininin düşük sıcaklıkta şiddetinin belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür (Şekil 4.53). DT-13 bakteri proteininde düşük sıcaklıkta artış gözlenmiş ayrıca 35 kDa da ekstra band görülmüştür. DT-14, 15, 16, 17, 18 bakteri proteinlerinde de düşük sıcaklıkta normale göre şiddetinde belirgin artış görülmüştür. DT-19 bakteri proteininde düşük sıcaklıkta kontrole göre 35 kDa'luk ekstra protein bandı gözlenmiştir. DT-20 bakterisinde düşük sıcaklıkta normal şartlara kıyasla 30, 40 ve 50 kDa ekstra protein bandları gözlenmiştir (Şekil 4.55). Yukarıdaki bulgulara göre, bakteri izolatlarımızın hemen hepsi soğuk şartlara maruz kaldıklarında, ekstrasellüler ortama ya farklı proteinler salgılamışlar veya ekstrasellüler protein miktarında değişiklikler yapmışlardır. Bu sonuca göre, soğuğa dirençli yabancı bitkilerin apoplastından izole edilen bakteriler, salgıladıkları ekstrasellüler proteinlerle bitkinin soğuğa toleransına önemli katkı yaptıkları ileri sürülebilir. Literatürde mevcut bulguları destekleyen birçok

çalışma bulunmaktadır. Örneğin, mikroorganizmaların düşük sıcaklıkta üretilmesinden sonra (10°C) ekstrasellüler soğuk şok protein (CSP) sentezinin uyarılma oranının arttığı belirtilmiştir (Henrike *et al.* 2002). Yapılan bir çalışmada Himalaya bölgesindeki topraklardan izole edilen *Enterobacter ludwigii*'de CSP'nin varlığı belirlenmiştir (Kandasamy *et al.* 2013). *Pseudomonas aeruginosa* suşundan farklı sıcaklıkta inkübasyon yapılarak soğuk şoku proteinler izole edilmiş SDS-PAGE jelinde analiz edildiğinde farklı protein fraksiyonları elde edilmiştir (Üzümcü *et al.* 2009). Psikrotrofik bakteri *Pseudomonas fragi* 30 veya 20°C'den 5°C'lik üreme ortamına alınarak analiz edilmiş 25 ile 17 proteinin aşırı derecede üretildiği, 12 proteinin ise düşük düzeyde sentezlendiği bulunmuştur. Diğer taraftan her iki sıcaklık değerinde de (30 veya 20°C) ve (5°C) 20 proteinin sentezinde değişiklikler olduğu bulunmuştur (Michel vd. 1997). Bir başka çalışmada Khan vd. (2003), farklı sıcaklıklarda inkübe ettikleri (4, 10, 20, 30 ve 37°C) *Pseudomonas fluorescens* suşundan 14 kDa ağırlığında soğuk şoku, *Pseudomonas fluorescens* mutant CRPF suşundan 35 kDa ağırlığında soğuğa dirençli protein izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada da psikrotrofik *Acinetobacter* sp. suşu 25°C'de inkübe edilerek protein sentezini indükledikten sonra 5°C'ye transfer edilerek iki boyutlu SDS-PAGE siteminde analiz edilmiştir. *Acinetobacter* sp. suşunun 25°C'den 5°C'ye transfer edilmesinden sonraki 2 saatlik inkübasyon sonunda 19 proteinin sentezinin arttığını saptamışlardır (Barbaro vd. 2002). Soğuğa adapte olmuş *Pseudomonas fluorescens* bakterisi 5°C'de üretildiğinde 5 adet soğuk şoku proteini sentezlenmiştir. Bu bakteri 0°C'de üretildiğinde ise 28 proteinin sentezinde artış görülmüştür (Colucci and Innis 1996). Bitki büyüme düzenleyici grubunda olan *Pseudomonas fluorescens* 25°C ve 10°C sıcaklıklarda inkübe edildiğinde, düşük sıcaklıkta normal şartlara göre ekstra protein bandı görülmüştür (13.5 kDa) ve proteinlerin miktarında artış görülmüştür (Mishra *et al.* 1999). Antartik deniz sularından izole edilen psikrotrofik *Colwellia* sp. bakterisinin ekstrasellüler proteinleri soğuk şartlarda incelendiğinde, farklı bir protein (7.3 kDa) bandı görülmüştür (Wang *et al.* 2006). Soğuğa toleranslı *Rhizobium* bakterisinde yapılan SDS-PAGE analizlerinde yüksek moleküler ağırlıklı membran polipeptitleri içerdiği ve bunun soğuk stresini azalttığı belirlenmiştir (Sardesai *et al.* 2001). Kanada'nın yüksek arktik bölgelerinde yetişen bitkilerin rizosferinden izole edilen PGPR *Pseudomonas putida* bakterisi kışlık ve yazlık kanola bitkisinde 5°C'de bitki büyümesini artırdığı

gözlenmiştir. Bu bakterinin antifiriz proteinlerine sahip olduğu gözlenmiştir. Bakterinin SDS-PAGE sonuçlarına göre 32-34 kDa ağırlığında büyük bir proteine sahip olduğu görülmüştür (Sun *et al.* 1995).

Bu araştırmadan elde edilen önemli sonuçlar ve öneriler;

1. Soğuğa dirençli yabancı bitkilerin yaprak apoplastından PGPB potansiyeli olan bakteriler izole edilmiştir. Ayrıca izole edilen bakterilerin ACC deaminaz aktivitesine sahip oldukları ve soğukta ekstrasellüler olarak farklı proteinleri sentezledikleri belirlenmiştir. Böylece fasulye fideleri soğuğa maruz kaldığında artan etilen seviyesinin ACC deaminaz aktivitesi ile düşürüldüğü değerlendirilmiştir.
2. Fasulye fidelerine düşük sıcaklığa maruz kalmadan önce uygulanan bakteri izolatları, kök ve gövde kuru ağırlıklarının genelde artmasına neden olmuştur. Bu izolatlar sayesinde, bitkinin soğuk stresi esnasında büyüme ve gelişmesinin devam ettiği görülmüştür. Bitkilerin uygulama içerisinde alınan fotoğrafları da bunu desteklemektedir.
3. Çalışılan bakteri izolatları fasulye bitkisinde donma hasarını düşürerek bitkinin soğuğa uyumunu artırmıştır. Donma hasarı soğuk stresi esnasında ortaya çıkan en önemli hasardır. Bu durum membranların bozulmasının bir göstergesidir.
4. Çalışılan bakteri izolatları fasulye bitkisinden izole edilen apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesini artırmıştır. Buna göre, bakterilerin fasulye yaprak apoplastında suyun donma noktasını geciktirdiği ve böylece donma hasarının azaltılmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir.
5. H_2O_2 ve O_2^- gibi ROT bileşiklerinin soğuk etkisiyle artışları bakteri uygulamaları ile düşürülmüştür. ROT bileşiklerinin düşürülmesi oksidatif hasarın azaltılmasına önemli bir katkı yapmıştır. Bu bileşiklerin düşmesi antioksidan enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesiyle sağlanıldığı düşünülmektedir.
6. Soğuk uygulamasıyla artan LPO miktarı bakteri uygulamaları ile düşmüştür. Diğer bir ifade ile bakteriler, soğuk stresinin membranlar üzerindeki toksik etkisini düşürerek bitkinin soğuk şartlara uyumun sağlanmasında katkıda bulunmuşlardır.

7. Düşük sıcaklık uygulamasıyla apoplastik CAT, APX ve GR aktivitesi düşmüştür. Ancak, bakteri uygulamaları genelde aktivitelere artışa neden olmuştur.
8. Düşük sıcaklık uygulamaları ile hücrel CAT ve SOD aktivitesinde artış, POX, APX ve GR aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Bakteri uygulamalarının bu enzimlerin aktivitesinde meydana getirdiği artış veya azalış bakteri izolatına göre farklılık göstermiştir.
9. Düşük sıcaklıkta yetiştirilen bakteri uygulamasız fasulye fidelerinde klorofil-a, klorofil-b, total klorofil miktarı önemli oranda düşmüştür, ancak düşük sıcaklıkta yetiştirilen bitkilere uygulanan bakteriler bu üç parametreyi de artırmıştır.
10. Elde edilen bulgulara göre çalışılan bakteri izolatlarının bitki büyümesini teşvik eden bakteriler grubunda olduğu ve fasulyenin soğuk stresi toleransına katkı yaptığı ileri sürülebilir.
11. İzole edilen bakterilerle yapılan mevcut çalışma, hem zirai uygulamalar için yapılacak çalışmalara hem de literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

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.
- 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.
- 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.
- Aono, M. Saji, H. Fujiyama, S. Sugita, M., 1995. Decrease in Activity of Glutathione Reductase Enhances Paraquat Sensitivity in Transgenic *Nicotiana tabacum*, *Plant Physiol.*, 107, 645-648
- Apel, K. and Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Aras, Z., 2011. Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 68 (2), 97 - 104
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi no:46, ANKARA
- Arshad, M., Shaharoon B. and Mahmood, T., 2008. Inoculation with plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of water stress on growth, yield and ripening of *Pisum sativum* L. *Pedosphere*, 18,1, In Press
- Atıcı, Ö., and Nalbantğlu, 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.
- Bakardjieva, N. and Christov K., 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from moses (*Mnium sp.*) and ferns (*Polydium vulgare*) to high temperature. *Can. J. Bot.*, 74, 1665-1670
- Banci, L., 1997. Structural properties of peroxidase. *J. Biotech.*, 53, 253-263.

- Banu, M.N.A., Hoque, M.A., Watanabe-Sugimoto, M. Matsuoka, K. Nakamura, Y. Shimoishi, Y., 2009. Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *J. Plant Physiol*, 166, 146-56.
- Barbaro, S.E., Trevors, J.T. and Inniss, W.E., 2002. Effect of different carbon sources and cold shock on protein synthesis by a psychrotrophic *Acinetobacter* sp. *Can. J. Microbiol.* 48:239-244 137:817-826.
- Barka, E.A., Nowak, J., Clement, C., 2006. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (11), 7246e7252.
- Barnaval, D., Maji, D., Bharti, N., Chanotiya, C.S., Kalra, A., 2013. ACC deaminase-containing *Bacillus subtilis* reduces stress ethylen induced damage and improves mycorrhizal colonization and rhizobial nodulation in *Trigonelle foenum-graecum* under drought stress. *J. Plant Growth Regul.* 9447-3
- Baross, J.A. and Morita, R.Y., 1978. Microbial life at low temperatures ecological aspects. In *Microbiol Life in Extreme Environments*. Kushner, D.J. (ed). Acad. Pres. New York, pp.9-71.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., 2005. Bacteria/plant growth-promotion. In: Hillel, D. (Ed.), *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier, Oxford, pp. 103–115.
- Baskin, S.L., Salem, H., 1997. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Washington, D.C. Taylor & Francis. 364 p.
- Belimov, A.A., Safronova, V.I., Mimura, T., 2002. Response of spring rape to inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylatedeaminase depends on nutrient status of the plant. *Can. J. Microbiol*, 48, 189-199.
- Bergmeyer, J. and Grabl, M., 1983. *Methods of Enzymatic Analysis* (Third Edition), pp.190-302, Germany
- Bernard, R., Glick Zhenyu C., Jennifer C. and Jin Duan., 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria *Eur J Plant Pathol*, 119, 329–339
- Biemelt, S., Keetman, U., Mock, H. P. and Grimm, B., 2000. Expression and activity of isoenzymes superoxide dismutase in wheat roots in response to hypoxia and anoxia. *Plant Cell and Environment* 23, 135–144.
- Bisht, S.C., Mishra, P.K., Joshi, G.K., 2013. Genetic and functional diversity among root-associated psychrotrophic *Pseudomonad*'s isolated from the Himalayan plants *Arch Microbiol* 195,605–615
- Bleecker, A.B., Kende, H., 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 1-18.
- Blum, A., 1986. *Plant Breeding for Stress Environments*, CRC Press, Boca Raton, USA.
- 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.

- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S., Neill, S.J., 2006. ABA-induced no generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.*, 45, 113-122.
- Burd, G.I., Dixon, D.G., Glick, B.R., 1998. A plant growth promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl Environ Microbiol*, 64, 3663-3668.
- Cakmakci, R., Kantar, F., Sahin, F., 2001. Effect of N₂-fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164, 527-531.
- 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.
- Cansev, A., Gulen, H., Eris, A., 2009. Cold-hardiness of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages: seasonal alteration of antioxidative enzymes and dehydrin-like proteins. *J Agric Sci* 147, 51-61
- Castrillo, L. A., Rutherford, S. T., Lee, R. E. and Lee, M. R., 2001. Enhancement of Ice-Nucleating Activity in *Pseudomonas fluorescens* and Its Effect on Efficacy against Overwintering Colorado Potato Beetles *Biological Control* 21, 27-34
- Chaudhary, A., Haack, S.K., Duris, J.W., and Marsh, T.L., 2009. Bacterial and archaeal phylogenetic diversity of a col sulfide-rich spring on the shore of lake Erie Michigan. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 5025-5036.
- 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.
- Cheng, Z., Park, E., Glick, B.R., 2007. 1-Aminocyclopropane-1- carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitate the growth of canola in the presence of sat. *Can J Microbiol* 53,912-918
- Chikov, V.I., Bakirova G.G., 2004. Role of apoplast in the control of assimilate transport, photosynthesis, and plant productivity. *Rus. J. of Plant Physiology*, 51(3), 420-431.
- Close, T.J., 1997. Dehydrins: a commonality in response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant.* 100, 291-296.
- Colicci, M.S., and Inniss, W.E., 1996. Ethylene glycol utilization cold and ethylene glycol shock and acclimation proteins in a psychrotrophic bacterium. *Curr. Microbiol.* 32,179-182.
- Creissen, G., Broadbent, P., Stevens, R., Wellburn, A.R., Mullineaux, P.M., 1996. Manipulation of Glutathione Metabolism in Transgenic Plants, *J. Biochem.*, 24, 465-472
- Creissen, G., Edwards, E.A. and Mullineaux, P.M., 1994. Glutathione Reductase and Ascorbate Peroxidase, In: *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants*, Foyer, C.H., Ed., Mullineaux, P.M., CRC Press, Boca Raton, 343-364
- 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.

- Dell'Amico, E., Cavalca, L., Andreoni, V., 2008. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. *Soil Biol Biochem*, 40,74-84.
- DeVries, A.L., 1983. Antifreeze peptides and glycopeptides in cold-water fishes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*45, 245-260.
- Dietz, K.J., 1997. Functions and Responses of the Leaf Apoplast Under Stress, *Prog. Bot.*, 58, 221-254.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L., 1995, Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell*, 7, 1085-1097.
- 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
- Donma, S., 2008. "İklim değişimi sürecinde Aşağı Seyhan Ovasında sürdürülebilir arazi ve su yönetimi",Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, FenBilimleri Enstitüsü Adana
- Duman, J. G. & Olsen, T. M. 1993. Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants. *Cryobiology* 30, 322–328.
- Duman, J.G., 2001. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods, *Annu. Rev. Physiol.* 63, 327–357.
- Duman, J.G., DeVries, A.L.,1974. Freezing resistance in winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Nature*.247, 237-238.
- Duman, J.G., Xu L.G., Trusman D., Wu D.W. 1991. Hemolymph protein involved in insect subzero-temparature tolerance: İce nucleators and antifreeze proteins. İn RE Lee J.R., Denlinger D.1L., eds. *Insects at low temparature*. Chapman and Hall, New York, pp. 94-27
- Egamberdiyeva, D., 2005. Plant-growth-promoting rhizobacteria isolated from Calcisol in a semi-arid region of Uzbekistan: biochemical characterization and effectiveness. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168, 94–99.
- Elkoca, E. ve Çinar, T., 2015. Bazı kuru fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşit ve hatlarının Erzurum ekolojik koşullarına adaptasyonu, tımsal ve kalite özellikleri.20 (2), 141-153.
- Eltner, E.F. and Heupel, A., 1976. Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish. *Planta*, 130, 175-180.
- Eltner, E.F., 1982 Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu Rev Plant Physio.*, 33,73-96
- Enebak, S.A., Wei, G., Kloepper, J.W., 1997. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. *For Sci* 44,139–144
- Erdal, S., 2012. Androsterone-induced molecular and physiological changes in maize seedlings in response to chilling stres. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57,1-7.
- Esim, N. 2011.Nitrik Oksitin Mısırdı (*Zea mays*) Düşük Sıcaklık Stresi Toleransı Üzerine Etkisi. Doktora tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum
- Esitken, A., Yildiz, H.E., Ercisli, S., Donmez, M.F., Turan, M., Gunes, A.,2010. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae* 124. 62–66

- Esitken, A., Pirlak, L., Turan, M. and Sahin, F., 2006. Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. *Scientia Horticulturae* 110, 324–327.
- Ewart, K.V., Lin, Q. and Hew, C.L., 1999. Structures function and evolution antifreeze proteins. *CMLS*. 55, 271-283.
- Figueiredo, M.V.B., Burity, H.A., Martinez, C.R., Chanway, C.P., 2008. Aleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co- inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Applied Soil Ecology* 40,182-188.
- 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., Noctor, G., 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.*, 28, 1056-1071.
- Foyer, C.H., Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133, 21-25.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado H., Dat J.F. and Scott I.M., 1997. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling *Physiol. Plant.*, 100, 241-254.
- 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.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Galap, C. and Kunert, K.J., 1991. Effects of elevated glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol*. 97, 863-872.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 97-112.
- Fridovich, L., 1986. Biological Effect of Superoxide Radical, *Arch. Biochem. Biophys.*, 247, 1-11.
- Garcia de Salamone, I.E., Hynes, R.K., Nelson, L.M., 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.* 47, 404–411.
- 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.
- Gerday, C. and Glandorff, N., 2007. *Psysiology and biochemistry of extremophiles*. ASM Press, Washington D.C., USA.
- Getoff, N., 2007, Anti-aging and aging factors in life. The role of free radicals, *Radiation Physics and Chemistry*, 76 (10), 1577-1586.
- Gilmour, S. J., Hajela, R. K and Thomashow, M. F., 1988, Cold acclimation *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 87, 745–750.
- Girotti, A.W., 1985. Mechanisim of lipid peroxidation. *J.free radicals bio.med.*, , 87-95
- Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help tofeed the World.169,30-39

- Glick, B.R., Karaturovic, D.M., Newell, P.C., 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonas. *Can. J. Microbiol.* 41, 533–536.
- Glick, B.R., Liu, C., Ghosh, S., Dumbroff, E.B., 1997. The effect of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12–2 on the development of canola seedlings subjected to various stresses. *Soil Biol Biochem* 29,1233–1239
- Glick, B.R., Penrose, D.M. and Li. J.,1998. A model for lowering plant ethylene concentrations by plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190, 63-68.
- Gong, Y., Toivonen, P.M.A., Lau, O.L. and Wiersma, P.A., 2001. Antioxidant system level in ‘Braeburn’ apple in related to its browning disorder. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 42, 259- 264.
- Graumann, P., Schroder, K., Schmid, K., and Marahiel, M.A. 1996. Cold Shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178, 4611-4619.
- Greene, R., 2002, Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants, *The Arabidopsis Book, American Society of Plant Biologists*, 1-20.
- Grichko, V. and Glick, B.R., 2001a. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 11-17.
- Grichko, V.P., Filby, B. and Glick, B.R., 2000. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC-deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *J. Biotechnol.* 81, 45-53.
- 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.
- 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.
- Griffith, M., Ewart, K., 1995. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnology Advances* 13, 375-402
- Guo F., Zhang M., Chen Y., Zhang W., Xu S., Wang J., An L., 2006. Relation of several antioxidant enzymes to rapid freezing resistance in suspension cultured cells from alpine *Chorispora bungeana*. *Cryobiology*, vol. 52, pp. 241-250.
- Guo, B., Liang, Y., Zhu, Y., 2009. Does salicylic acid regulate antioxidant defense systems, cell death, cadmium uptake and partitioning to acquire cadmium tolerance in rice? *J. Plant Physiol.* 166, 20-31.
- Gutierrez-Manero, F.J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R., Talon, M., 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.* 111, 206–211.
- Güler, N.S., 2008. *Ctenanthe setosa*’da yaprak kıvrılması sırasında apoplastik ve simplastik alanlarda antioksidan sistemde meydana gelen değişimler. Doktora Tezi Karadeniz, Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Hale, M.G., Orcutt D.M., 1987. The physiology of plants under stress, John Wiley and Sons, 206p. New York
- Halliwell, B., 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.
- Hamed, R.R., Maharem T.M., Fatah M.M.A. and Ataya F.S., 1998. Purification of peroxidase isoenzymes from Turnip roots. *Phytochemistry*, (48), 1291-1294
- Hausladen, A. ve Alscher, R.G., 1993, Glutathione. In: ALSCHER, R.G. ve HESS, J., Eds., *Antioxidants in Higher Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- 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.
- Henrike, H., Karatzas, A.K., Wouters, J.A., and Abee, T.J. 2002. Enhanced level of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* Lo28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. *Appl. Env. Microbiol.* 68 (2), 456-463.
- Hernandez- Nistal, J., Dopico, B. And Labrador, E. 2002. Cold and salt stress regulates the expression and activity of a chickpea cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase. *Plant Sci.* 163, 507-514
- 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.
- Hodges, D. H., Andrews C. J., Johnson D. A., Hamilton R.I., 1997. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Journal of Experimental Botany*, vol. 48, no. 310, pp. 1105-1113.
- Hoffmann-Hergarten, S., Gulati, M.K., Sikora, R.A., 1998. Yield response and biological control of *Meloidogyne incognita* on lettuce and tomato with rhizobacteria. *J. Plant Dis. Protect.*, 105, 349-358
- Holguin, G. and Glick, B.R., 2001. Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microbial Ecol*, 41, 281-288.
- Hon, W-C., Griffith M., Chong P., Yang D.S.C., 1994. Extraction and isolation of antifreeze protein from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiol*, 104, 971-980.
- Hon, W-C., Griffith M., Mlynarz A., Kwok Y.K., Yang D.S.C., 1995. Antifreeze proteins in winter rye leaves are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* 109, 879-889.
- Honma, M. and Shimomura, T., 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric Biol Chem*, 42, 1825-1831
- Hontzeas, N., Hontzeas, C.E., Glick, B.R., 2006. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotechnol Adv* 24, 420-426
- Hontzeas, N., Zoidakis, J., Glick, B.R., Abu-Mar, M.M., 2004. Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the

- rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. *Biochim Biophys Acta*, 17, 11-19.
- Hoshino, T., Odaria, M., Yoshida, M., Tsuda, S., 1999. Physiological and biochemical significance of antifreeze substances in plants. *J. Plant Res.* 112, 255-261.
- 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.
- 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.
- Jalili, F., Khavazi, K., Pazira, E., Nejati, A. and Asadi Rahmani, H., 2009. Use of ACC Deaminase –Containing Fluorescent Pseudomonads to Alleviate Effects of Salinity on Canola (*Brassica napus* L.) Growth in Germination Stage Iranian J. Soil Research (Soil Water Sci), 23(1).
- 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., Martnez-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.
- Jeon, J.S., Lee, S.S., Kim, H.Y., Ahn, T.S., Song, H.G., 2003. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *J. Microbiol.* 41, 271–276.
- 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.
- Kadioğlu, B.G., 2013. ACC Deaminaz Aktivitesine Sahip ve Soğuğa Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı. Erzurum.
- Kandasamy, P., Chaturvedi, N., Sisodia, B.S., Shasany, A.K., Gahoi, S., Marla, S.M., Goel, R., 2013. Expression of CspE by a Psychrotrophic Bacterium *Enterobacter ludwigii* PAS1, Isolated from Indian Himalayan Soil and In silico Protein Modelling, Prediction of Conserved Residues and Active Sites *Curr Microbiol* 66, 507–514
- Kang, H., and M. E. Saltveit. 2001. Activity of enzymatic antioxidant defense systems in chilled and heat shocked cucumber seedling radicals. *Physiologia Plantarum* 113, 548–556.
- Kausari, R. and Shahzad, S.M., 2006. Effect of ACC deaminase Containing Rhizobacteria on Growth Promotion of Maize under salinity stress *Journal of agriculture & Social Sciences M.*, 02 (4), 216-218
- Kawahara, H. 2002. The structures and functions of ice crystal-controlling proteins from bacteria, *J. Biosci. Bioeng.* 94 492–496.

- Kawahara, H., Li, J., Griffith, M. & Glick, B. R. (2001). Relationship between antifreeze protein and freezing resistance in *Pseudomonas putida* GR12-2. *Curr Microbiol* 43, 365–370.
- Kazem, P., Fazlı, M., Donald, L.S., 2005. Low root zone temperature effects on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli pre-incubated with methyl jasmonate and/or genistein. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 2005; 55: 293_/298
- Kehrer, J.P., 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149,43.
- Keles, Y., Öncel I., 2002. Perponse of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. *Plant Sci.* 163, 783-790.
- Khan, M., Bajpai, V.K., Anasari, S.A., Kumar, A., and Goel, R. 2003. Characterization And localization of fluorescent *Pseudomonas* cold shock protein (s) by monospesific polyclonal antibodies. *Microbiol İmmünol*, 47 (12), 895-901.
- Khosravi, H. A., Alikhani and Yakhchali B., 2008. Effect of ACC Deaminase Producing in *Rhizobium* Strains on Growth of Wheat in Salinity Stress Conditions *Iranian Journal Of Soil And Water Research*, 39(1), 93-102.
- Kim, K.Y., Kwon, S.Y., Lee, H.S., Hur, Y., Bang, C.W., Choi, K.S. and Kwak, S.S., 2000. Differantial expression of four sweet potato peroxidase genes in respons to abscisic acid and ethaphon. *Phytochemistry*, 54, 19-22.
- Klee, H.J., Hayford, M.B., Kretzmer, K.A., Barry, G.F., Kishore, G.M., 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants, *Plant Cell* 3 1187–1193.
- Kloepper, J.W., Reddy, M. S., Kenney, D. S., Vavrina, C. S., Kokalis-Burelle, N. and Martinez-Ochoa, N., 2004a, Theory and applications of rhizobacteria for transplant production and yield enhancement. In *Proc. XXVI IHC – Transplant Production and Stand Establishment*, Eds S Nicola, J Nowak and C S Vavrina.
- Knight, C. A., Hallett, J. & Devries, A. L. (1988). Solute effects on ice recrystallisation: an assessment technique. *Cryobiology* 25, 55–60.
- Kocaçalışkan, İ., 2004. Bitki Fizyolojisi. Kütahya.
- Kocys, G., Szalai, G., Vagujfalvi, A., Stehli, L., Orozg, G. and Galiba, G., 2000. Genetic study of glutathione accumulation during cold hardening in wheat, *Planta*, 210, 295-301.
- Kohler, J., 2008. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Funct Plant Biol* 35:141–151
- 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.
- 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.
- Kumar, R.R., Goswami, S., Kumar, N., Pandey, S.K., Pandey, V.C., Sharma, S.K., Pathak, H., Rai, R.D., 2011. Expression of novel ascorbate peroxidase isoenzymes of wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to heat stress. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 3(11), 188-194.

- Kuru, H.İ., 2007. Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Lee, D.H., and Lee C.B., 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.*, 159, 75- 85.
- Lee, D.H., Lee, B. C., 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzyme in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.*, vol. 159, pp 75-85.
- Lee, M.R, Lee, R.E., Strong-Gunderson, J.M., Minges S.R., 1995. Isolation of Ice-Nucleating Active Bacteria from the Freeze-Tolerant Frog, *Rana sylvatica*. *Cryobiology* 32, 358-365.
- Leemml, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage. T4. *Nature (London)*. (227) 680-685.
- Levitt, J., 1980. Responses of plants to enviromental stresses. Academic Press, (1), New York.
- Lin, A.J., Zhang, X.H., Chen, M.M. and Cao, Q., 2007, Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation, *Journal of Environmental Sciences*, 19 (5), 596-602.
- Lin, C.C., and Kao, C.H., 2001. Absciscic acid induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Science*, (160), 323-329.
- Lindow, S.E., 1983. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants, *Annu.Rev. Phytopathol.* 21, 363–384.
- 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 *Chorispora bungeana* suspension cultured cells. *Plant physiology and Biochemistry*. 48, 936-944.
- Loomis, S.H., Zinser, M., 2001. Isolation and identification of an ice-nucleating bacterium from the gills of the intertidal bivalve *Geukensia demissa*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 261: 225-235.
- 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
- Lyons, J. M., 1973. Chilling injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 24, 445- 466.
- Lyons, T., Ollerenshaw, J. H., and Barnes, J. D., 1999. Impacts of Ozone on *Plantago major*: Apoplastic and Symplastic Antioxidant Status, *New Phytol.*, 141, 253-263.
- Ma, W., Sebestianova, S., Sebestian, J., Burd, G.I., Guinel, F., Glick, B.R., 2003a. Prevalence of 1-aminocyclopropa-1- carboxylate in deaminase in *Rhizobia* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 83, 285–291
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Ryu, J., Sa, T., 2006. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1- aminocycloprpane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fjisawaense*. *Planta*, 224, 268-278.
- Mahajan, S., Tuteja, N, 2005, Cold, salinity and drought stresses: An overview, *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 444, 139-158.

- Maillard, M.N., Billaud, C., Chow, Y.N., Ordonaud, C. ve Nicolas, J., 2007, Free radical scavenging, inhibition of polyphenoloxidase activity and copper helating properties of Model Maillard Systems, *LWT*, 40, 1434-1444.
- 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.
- Margesin, R., Schinner, F., Marx, J.C., Gerday, C(eds)., 2008. Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Mayak, S., Tirosh, T. and Glick, B.R., 2004b. Plant growth promoting bacteria that confer resistance in tomato and pepper to salt stress. *Plant Physiol Biochem*, 167, 650-656.
- Mayak, S., Tirosh, T., Glick, B.R., 2004a. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomato and pepper. *Plant Sci*, 166, 525-530.
- 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.
- McInnis, S.M., Desikan, R., Hancock, J.T., Hiscock, S.J., 2006. Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk? *New Phytol.*, 172, 221-228.
- Mega, R., Manzoku, M., Shinkai, A., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., Masui, R., 2010. Very rapid induction of a cold shock protein by temperature downshifts in *Thermus thermophilus*. *Biochem Biophys Res Comm* 399, 336-340
- Meldrum, N.U. ve Tarr, H.L.A., 1935. The Reduction of Glutathione by the Warburg Christian System, *Biochem. J.*, 29, 108-115.
- Michel, V., Lehoux, I., Depret, G., Anglade, P., Labadie, J., and Hebraud, M., 1997. The cold shock response of the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fragi* involves four low molecular mass nucleic acid binding proteins. *J. Bacteriol*, 179 (23), 7331-7342.
- Mills, S. V., 1999. Novel biochemical compounds from Antarctic microorganisms. PhD thesis, Nottingham University
- 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.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.
- Mishra, P.K Bisht, S.C. Ruwari, P., Selvakumar, G., Joshi, G.K., Bisht, J.K., Bhatt, J.C, Gupta, H.S., 2011. Alleviation of cold stress in inoculated wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings with psychrotolerant *Pseudomonads* from NW Himalayas. *Arch Microbio* 193, 497-513.
- Mishra, P.K, Mishra, S. Bisht, S.C. Selvakumar, G. Kundu, S. Bisht, J.K and Gupta, H.S. 2009. Isolation, molecular characterization and growth-promotion activities of a cold tolerant bacterium *Pseudomonas* sp. NARs9 (MTCC9002) from the Indian Himalayas *Biol Res* 42, 305-313.
- Mitler, R., 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Sci.*, 7, 405-410.

- Mittler, R., 2006, Abiotic stress, the field environment and stress combination, *Trends Plant Sci.*, 11, 15-19.
- Moller, I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol Mol. Biol.* 52, 561-591.
- Moon, C., Jeong, K., Kim, H.J., Heo, Y., Kim, Y., 2009. Recombinant expression, isotope labeling and purification of cold shock protein from *Colwellia psychrerythraea* for NMR study. *Bull Korean Chem Soc* 30, 2647–2650.
- Morgan, P.G. and M.C. Drew., 1997. Ethylene and plant responses to stress. *Physiol. Plant*, 100, 620-630.
- Morreale, A.P., Murphy, K.P., Cera, E.D., 1988. Inhibition of bacterial ice nucleators by fish antifreeze glycoproteins, *Nature* 333, 782–783.
- 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.
- Mundra, S., Arora, R., Stobdan, T., 2011. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel temperature-, pH-, and salt-tolerant yeast, *Rhodotorula* sp. PS4, isolated from seabuckthorn rhizosphere, growing in cold desert of Ladakh, India. *World J Microbiol Biotechnol*, 27, 2387–2396.
- Mutlu S., 2005. Tuz stresi ve salisilik asidin 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.
- Mutlu, S., Atıcı, O., Nalbantoglu, B., 2009. Effects of salicylic acid and salinity on apoplastic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance *Biologia Plantarum*, 53 (2), 334-338.
- Mutlu, S., Karadagoglu, O., Atıcı, O., Nalbantoglu, B., 2013. Protective role of salicylic acid applied before cold stress on antioxidative system and protein patterns in barley apoplast. *Biologia Plantarum*, 57 (3), 507-513.
- Nabti, E., Sahnoune, M., Ghoul, M., Fischer, D., Hofmann, A., Rothballer, M., Schmid, M., Hartmann, A., 2010. Restoration of growth of durum wheat (*Triticum durum* var. waha) under saline conditions due to inoculation with the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* NH and extracts of the marine alga *Ulva lactuca*. *J Plant Growth Regul*, 29, 6–22.
- Nadeem, S.M., Z.A. Zahir, M. Naveed and M. Arshad. 2007. Preliminary investigations on inducing salt tolerance in maize through inoculation with rhizobacteria containing ACC-deaminase activity. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, 1141-1149.
- Nakano, Y. and Asada, Y., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, *Plant Cell Physiol.*, (22), 867-880.
- Nakano, Y., Asada, K., 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.*, (28), 131-40.

- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E. and Jacquot, J.P., 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Phsiol. Plantarum* 129, 185-195.
- Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J.T., 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 388-395.
- Nicolai, A., Vernon, P., Lee, M., Ansart, A., Charrier, M., 2005. Supercooling ability in two populations of the land snail *Helix pomatia* (Gastropoda: Helicidae) and ice-nucleating activity of gut bacteria. *Cryobiology* 50, 48-57.
- Nie, L., Shah, S., Burd, G.I., Dixon, D.G., Glick, B.R., 2002. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. *Plant Physiol Biochem*, 40, 355-361.
- 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.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione; keeping active oxygen under control. *Annu Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.*, 49, 249-79.
- Olgun, M., T. Yıldırım, and M. Turan. 2005. Adaptation of wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.) to cold climate. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B, Soil and Plant Science* 55, 9–15.
- Öktem, H.A., Eyidogan, F., Demirba, D., Bayrac, A.T., Oz, M.T., Ozgur, E., Selcuk, F., Yucel, M., 2008. Antioxidant responses of lentil to cold and drought stres. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 17(1), 15-21.
- Özcan, S., Babaoğlu, M., and Gürel, E., 2004. Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, 289s.
- Pearce, R. S., 1999. Molecular analysis of acclimation to cold, *Plant Growth Regulation* (29): 47–76.
- 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.
- Prasad, T.K., 1997. Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings. *Plant Physiol.* 114, 1369-1376.
- 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.
- Rajashekar, C. B., 2000, Cold response and Freezing tolerance in plants, in *Plant-Environment Interactions*, Wilkinson, R. E., (ed.), Marcel Dekker Inc., NewYork, 321-341 pp.
- Ranieri, A., Castagna, A., Scebba, F., Careri, M., Zagnoni, I., Predieri, G., Pagliari, M., Sanita`di Toppi, L., 2005. Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. *Plant Physiol. Biochem.*, (43), 45-54.
- Raymond, J. A. & DeVries, A. L., 1977. Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 2589–2593.

- Raymond, J. A. & Fritsen, C. H., 2001. Semipurification and ice recrystallisation inhibition activity of ice-active substances associated with Antarctic photosynthetic organisms. *Cryobiology* 43, 63–70.
- Raza, F.A., Amin, A., Faisal, M., 2014. Desiccation- tolerant rhizobacteria from cholistan desert, Pakistan and their impact on *Zea mays* L. *Pol. J. Environ. Stud.* 24 (4), 1773-1781.
- Robison, M.M., Shah, S., Tamot, B., Pauls, K.P., Moffatt, B.A., Glick, B.R., 2001b. Reduced symptoms of *Verticillium* wilt in transgenic tomato expressing a bacterial ACC deaminase. *Mol Plant Pathol.* (2), 135-145.
- 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.
- Sadrnia, M., Maksimava, N., Khromsova, E., Stanislavich, S., Owlia, P., Arjomandzadegan, M., 2011. study the effect of bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC deaminase) on resistance to salt stress in tomato plant *Analele Universității din Oradea - Fascicula Biologie Tom.*, 18(2), 120-123
- Sahin, F., Cakmakci, R., Kantar, F., 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil* 265, 123–129
- 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.
- Sakurai, N., 1998. Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. *Journal of Plant Research*, 111(1101), 133-148.
- Sala, J.M., 1998. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruit to chilling. *Postharvest Biol. and Technol.*, 20, 81-89.
- Sala, J.M., Lafunte M.T., 2000. Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold stored mandarin fruits. *Postharvest Biol. and Technol.*, 3, 255-261.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., Bhatti, A.S., 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Trends Biotechnol*, 25, 356-362
- Salisbury, F.B., and Ross C.W., 1992. *Plant Physiol.* Wadsworth Publishing Company. California, pp.682, USA.
- Sandhya, V., Ali, Sk. Z., Grover, M., Reddy, G., Venkateswarlu, B., 2010. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regul* 62,21–30
- Sandhya, V., Ali, Sk.Z., Minakshi, G., Reddy, G., Venkateswarlu, B., 2009. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biol Fertil Soils* 46,17–26
- Sardesai, N., Babu, C.R., 2001. Cold stress induced high molecular weight membrane polypeptides are responsible for cold tolerance in *Rhizobium* DDSS69 *Microbiol. Res.* 156, 279–284
- Saygılı, H., 1995. *Fitobakteriyoloji.* Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 203, Bornova-İzmir.
- 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.
- Schmid, B., Jochen, K., Eveline, R., Martin, J.L., Roger, S., Taurai, T., 2009. Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. *Appl Environ Microbiol* 75,1621–1627.
- Selvakumar, G., Kundu, S., Joshi, P., Nazim, S., Gupta, A.D., Gupta, H. S., 2010. Growth promotion of wheat seedlings by *Exiguobacterium acetylicum* 1P (MTCC 8707) a cold tolerant bacterial strain from the Uttarakhand Himalayas *Indian J Microbiol* 50,50–56.
- Selvakumar, G., Kundu, S., Piyush, J., Sehar, N., Gupta, A.D., Mishra, P.K. and Gupta, H.S.,2008. Characterization of a cold tolerant plant growth promoting bacterium *Pantoea dispersa* 1A, isolated from a subalpine soil in the North Western Indian Himalaya. *World J Microbiol Biotechnol* 24,955–960.
- Selvakumar, G., Mohan, M., Kundu, S., Gupta, A.D., Joshi, P., Nazim, S. and Gupta, H.S., 2007. Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). *Lett Appl Microbiol* 46,171–175.
- Seppanen, M.M. and Fagerstedt, K.,2000. The role of superoxide dismutase activity in response to cold acclimation in potato. *Physiol. Plantarum* 108,279-285.
- Sergeeva, E., Shah, S., Glick, B.R., 2006. Tolerance of transgenic canola expressing a bacterial ACC deaminase gene to high concentrations of salt, *World J. Microbiol Biotechnol*, 22, 277-282.
- Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A.V., Vandamme, P., Barka, E., Wang-Pruski, G., Faure, D., Reiter, B., Glick, B.R., Nowak, J., 2005. *Burkholderia phytofirmans* sp. Nov., a novel plantassociated bacterium with plant beneficial properties. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 1187–1192.
- Shrivastava, U.P. and Kumar,A. 2005.Characterization and optimization of 1-aminocyclopropane 1-carboxylate deaminase (ACCD) activity in different rhizospheric PGPR along with *Microbacterium* sp. strain eci-12A. *Int. Journal of Applied Science and Biotechnology*, 1 (1), 11-15.
- Siddikee, Md A., Glick, B.R., Chauhan.PS., Yim, W.J., Sa, T., 2011. Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. 49 , 427e434
- Sigel, H., and Sigel, A., 1999. *Interrelations Between Free Radicals and Metal Ions in Life Processes*,, CRC Press, Boca Raton, FL..
- Simsek, F., 1999. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu, *Türkiye Klinikleri J Pediatr*, 8, (I), 42-47.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., Miszalski, 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.
- Stahl ,W., Sies, H., 2002. Introduction reactive oxygen species. *Res. Monographs*, 1-2.
- Stearns, J.C., Glick, B.R., 2003. Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnology Advances*, 21, 193-210.
- 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.

- Subramanian, P., Krishnamoorthy, R., Chanratana, M., Kim, K., Sa, T., 2015. Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in psychrotolerant bacteria modulates ethylene metabolism and cold induced genes in tomato under chilling stress *Plant Physiology and Biochemistry* 89, 18-23
- Sultan, K., Gintzburger, G., Obaton, M., Robin, C., Touchane, H., Guckert, A., 2001. Growth and nitrogen fixation of annual *Medicago-Rhizobium* associations during winter in Mediterranean region *European Journal of Agronomy* 15, 221–229
- Sun, X., Griffith, M., Pasternak, J. J. & Glick, B. R., 1995. Low temperature growth, freezing survival and production of antifreeze protein by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can J Microbiol* 41, 776–784.
- 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. and Nalbantoğlu B., 2003. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation*, 41, 231-236.
- 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.
- Taulavuori, K., Prasad, M.N.V., Taulavuori, E. and Laine. K., 2005. Metal stress consequences on frost hardiness of plants at northern high latitudes: A review and hypothesis. *Environmental Pollution* 135, 209–220.
- Theocharis, A., Bordiec, S., Fernandez, O., Paquis, S., Dhondt-Cordelier, S., Baillieul, F., Clement, C., Barka, E.A., 2012. Burkholderia phytofirmans PsJN primes *Vitis vinifera* L. and confers a better tolerance to low nonfreezing temperatures. *Mol.Plant Microbe. Interact.* 25, 241e249.
- Thomashow, M.F., 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* ,50, 571-599.
- Timmusk, S., Wagner, EGH., 1999. The plant growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol Plant-Microb Interact* 12, 951–959
- Tomalty, H.E. Walker, V.K. 2014. Perturbation of bacterial ice nucleation activity by a grass antifreeze protein *Biochemical and Biophysical Research Communications* 452 636–641
- Tomimatsu, Y., Scheder J., Yeh Y., Feeney R.E. 1976. Raman spectra of a solid antifreeze glycoprotein and its liquid and frozen aqueous solutions. *J.Biol.Chem.* (251) 2290-2298.

- Turan, M., Güllüce, M., Çakmak, R. & Şahin, F. 2013 Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Strain on Freezing Injury and Antioxidant Enzyme Activity of Wheat and Barley, *Journal of Plant Nutrition*, 36 (5), 731-748.
- Turan, M., Ataoglu, N. and Sahin, F., 2006. Evaluation of the capacity of phosphate solubilizing bacteria and fungi on different forms of phosphorus in liquid culture. *Journal of Sustainable Agriculture* 28, 99–109.
- Turan, M., Ataoglu, N. and Sahin, F., 2007. Effects of *Bacillus* FS-3 on growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and availability of phosphorus in soil. *Plant Soil and Environment* 53, 58–64.
- Turan, M., Ataoglu, N., Sezen, Y., 2004. Effects of phosphorus solubilizing bacteria (*Bacillus megaterium*) on yield and phosphorus contents of tomato plant (*Lycopersicon esculentum* L.). In: *Proceedings of the National Fertilizer Congress. Farming-Industry-Environment*, 11–13 October, Tokat, Turkey.
- Turhan, E., Aydoğan, C., Baykul, A., Akoglu, A., Evrenosoglu, Y., Ergin, S., 2012. Apoplastic Antioxidant Enzymes in the Leaves of Two Strawberry Cultivars and Their Relationship to Cold-Hardiness. *Not Bot Horti Agrobo*, 40(2), 114-122
- Upper, C.D., Vali, G., 1995. The discovery of bacterial ice nucleation and its role in the injury of plants by frost. In: Lee RE, Warren GJ, Gusta LV (eds) *Biological ice nucleation and its applications* pp. 29-39.
- Urritia, M., Duman, J., Knight, C., 1992. Plant thermal hysteresis proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. 1121-199.
- Üzümcü, Z., 2009. *Pseudomonas* SP. Suşlarında Cold Shock Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE Analizi. Yüksek lisans tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı. Adana.
- 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 Loon, L.C and Glick, B.R., 2004 Increased plant fitness by rhizobacteria. *Ecological Studies* 170, 177-205.
- Vanacker, H., Harbinson, J., Ruisch, J., Carver, T.L.W. ve Foyer, C.H., 1998b. Antioxidant Defences of the Apoplast, *Protoplasma*, 205, 129-140.
- Wang, C., Knill, E., Glick, B.R., Défago, G., 2000. Effect of transferring 1-aminocyclopropane -1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivative CHA96 on their growth promoting and disease-suppressive capacities. *Can J Microbiol*, 46, 898-907.
- Wang, C.Y., 1990. *Chilling Injury of Horticultural Crops*, Boca Raton, FL: CRC, 313 pp.
- Wang, Q.F., Miao, J.L. Hou, Y.H. Ding, Y. and Li, G.Y. 2006. Expression of CspA and GST by an Antarctic psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 at near-freezing temperature *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22, 311–316
- 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.

- 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.
- 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.
- Witham, F.H., Blayles, D.F. and Devlin, R.M., 1971. Experiments in plant physiology. Van Nostrand Reinhold Company, 55-56, New York.
- Wood, E. S. and Simith C. A., 1991, *Molecular and Cell Biochemistry*. Chapman & Hail, Hong Kong
- Xu, H., Griffith, M., Patten, C. L. & Glick, B. R., 1998. Isolation and characterization of an antifreeze protein with ice nucleation activity from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can J Microbiol* 44, 64–73.
- Xue, Y., Peng, R., Xiong, A., Li, X., Zha, D., Yao, Q., 2009. Yeast heat-shock protein gene HSP26 enhances freezing tolerance in Arabidopsis. *J Plant Physiol* 166,844-850.
- 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.
- Yamashita, Y., Nakamura, N., Omiya, K., Nishikawa, J., Kawahara, H. & Obata, H. 2002. Identification of an antifreeze lipoprotein from *Moraxella* sp. of Antarctic origin. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 239–247.
- 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.
- Yannarelli, G.G., Ferná'ndez-Alvarez, A.J., Santa-Cruz, D.M., Tomaro, M.L., 2007. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stres. *Phytochemistry*, (68), 505-512.
- Yee, Y., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. and Lu, C.Y., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguira gymnorhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environ. Exp. Bot.*, 1-13.
- Yılmaz, S. and Ozan T. S., 2003. Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişki, *Türk Biyokimya Dergisi*, 28, (4), 252-256.
- 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, 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, H., Prithiviraj, B., Charles, T.C., Driscoll, B.T., Smith, D.L., 2003. Low temperature tolerant Bradyrhizobium japonicum strains allowing improved nodulation and nitrogen fixation of soybean in a short season (cool spring) area. *Europ. J. Agronomy* 19,205-213.

- Zhao, L., He, J., Wang, X., Zhang, L., 2008. Nitric oxide protects against polyethyleneglycol- induced oxidative damage in two ecotypes of reed suspension cultures. *J.Plant Physiol.* 165, 182–191.
- Zhao, S. and Blumwald, E., 1998, Changes in oxidation-reduction state and antioxidant enzymes in the roots of jack pine seedlings during cold acclimation, *Physiologia Plantarum*, 104, 134-142.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2002 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2006 yılında birincilikle mezun oldu. 2006 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimini 2009 yılında tamamladı. Aynı yıl başladığı doktora öğrenimine devam etmektedir.