



**DÜŞÜK SICAKLIKLARA HASSAS İKİ MISIR
ÇEŞİDİNDE (*Zea mays* cv. Osk596 ve *Zea mays* cv.
Arifiye) SOĞUK STRES VE SALİSİLİK ASİT
UYGULAMASININ DONMA TOLERANSINA, BAZI
OKSİDATİF PARAMETRELERE VE APOPLASTİK
PROTEİNLERE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Ömer KARADAĞOĞLU

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Mine AKSOY

Kimya Ana Bilim Dalı

2023

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

**DÜŞÜK SICAKLIKLARA HASSAS İKİ MISIR ÇEŞİDİNDE (*Zea mays* cv. Osk596
ve *Zea mays* cv. Arifiye) SOĞUK STRES VE SALİSİLİK ASİT UYGULAMASININ
DONMA TOLERANSINA, BAZI OKSİDATİF PARAMETRELERE VE
APOPLASTİK PROTEİNLERE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Investigation of the Effect on Cold Tolerance, Some Oxidative Parameters and Apoplastic
Proteins of Cold Stress and Salicylic Acid Treatment in Low Temperature Sensitive Two
Maize (*Zea mays* cv. Osk596 and *Zea mays* cv. Arifiye) Variety

DOKTORA TEZİ

Ömer KARADAĞOĞLU

Danışman: Doç. Dr. Mine AKSOY

Erzurum
Mayıs, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Ömer KARADAĞOĞLU tarafından hazırlanan “DÜŞÜK SICAKLIKLARA HASSAS İKİ MISIR ÇEŞİDİNDE (Zea mays cv. Osk596 ve Zea mays cv. Arifiye) SOĞUK STRES VE SALİSİLİK ASİT UYGULAMASININ DONMA TOLERANSINA, BAZI OKSİDATİF PARAMETRELERE VE APOPLASTİK PROTEİNLERE ETKİSİNİN İNCELENMESİ” başlıklı çalışması .. / .. / 20.. tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Kimya Ana Bilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU <i>Yıldız Teknik Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Doç. Dr. Mine AKSOY <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Mesut TAŞKIN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Mucip GENİŞEL <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun
.../.../.... tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışmaTübitak 1001 projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:106T582

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.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Tez türünü giriniz. Ör. Yüksek Lisans veya Doktora Tezi olarak Danışmanın Ünvanı Adı Soyadı danışmanlığında sunulan “Tezin başlığını girmek için tıklayın” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	13	30
Kuramsal Temeller	3	30
Materyal ve Yöntem	29	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	9	20
Sonuç ve Öneriler	16	20
Tezin Geneli	13	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Ömer KARADAĞOĞLU	Doç. Dr. Mine AKSOY
22.06.2023	22.06.2023
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, TÜBİTAK 106T582 No'lu projeyle destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU'na, Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya, Doç. Dr. Mine AKSOY'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez İzleme Komitesi üyeleri Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN ve Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a çalışmamıza katkıları ve değerlendirmeleri için teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

Ömer KARADAĞOĞLU

ÖZET

DOKTORA TEZİ

DÜŞÜK SICAKLIKLARA HASSAS İKİ MISIR ÇEŞİDİNDE (*Zea mays* cv. Osk596 ve *Zea mays* cv. Arifiye) SOĞUK STRES VE SALİSİLİK ASİT UYGULAMASININ DONMA TOLERANSINA, BAZI OKSİDATİF PARAMETRELERE VE APOPLASTİK PROTEİNLERE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Ömer KARADAĞOĞLU

Danışman: Doç. Dr. Mine AKSOY

Amaç: Bu araştırmada, iki çeşit mısır (*Zea mays* cv Osk596 (Hibrit) ve *Zea mays* cv. Arifiye) yapraklarında donma hasarı, buz nükleasyon aktivitesi, apoplastik antioksidan enzim (katalaz, peroksidaz ve süperoksid dismutaz) aktiviteleri, lipid peroksidasyonu, H₂O₂ miktarı ve apoplastik proteinlerin SDS-elektroforezi üzerine, soğuk ve salisilik asidin (SA) etkileri araştırılmıştır. Ayrıca soğukun endojen SA miktarına etkisi incelenmiştir.

Yöntem: Tohumlar ekildikten sonraki 9. gün yapraklara püskürtmek suretiyle 0,0, 0,01, 0,1, 0,5 ve 1 mM SA uygulanmış ve bitkiler kesim günlerinden (10., 17., 24., ve 31.) 1 gün önce soğuğa (10/7 °C) transfer edilmişlerdir. Bir gün soğuk şartlarda yetişen yapraklardan deneyler için örnekler alınmıştır.

Bulgular: Bulgularımıza göre genel olarak SA uygulaması donma hasarını azaltmıştır. Hibrit mısır çeşidinde soğuk uygulaması buz nükleasyon aktivitesini etkilemezken, soğuk+SA uygulaması artırmıştır. Arifiye mısır çeşidinde ise soğuk ve soğuk+SA uygulaması bazı günlerde buz nükleasyon aktivitesini etkilemiştir. Hibrit mısırdaki tüm günlerde soğuk ve soğuk+SA uygulaması kontrole göre apoplastik SOD ve POD aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır. Hibrit mısırdaki apoplastik CAT aktivitesi belirlenmemiştir. Arifiye mısır çeşidinde soğuk ve soğuk+SA uygulaması apoplastik SOD, POD ve CAT aktivitesinde önemli değişikliklere sebep olmuştur. Her iki mısır çeşidinde soğuk ve soğuk+SA uygulaması genellikle LPO'yu artırmıştır. Her iki mısır çeşidinde soğuk ve soğuk+SA uygulaması hidrojen peroksit miktarını, 10. ve 17. günde etkilemezken, 24. ve 31. günlerde değişikliğe sebep olmuştur. Hibrit ve Arifiye çeşidinde hem soğuk uygulaması hem de soğuk+SA uygulaması SDS-PAGE ile belirlenen apoplastik proteinlerin miktarı ve çeşidi üzerinde etkili olmuştur. Hibrit ve Arifiye'de endojen SA seviyeleri genel olarak soğuk uygulama ile azalmıştır.

Sonuç: Soğuğa hassas iki çeşit mısırdaki SA uygulamasının donma toleransını artırmada etkili olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoplast, *zea mays*, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzimler, SDS-PAGE, soğuk stresi, salisilik asit

2023, 107 sayfa

ABSTRACT

PH. D. THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECT ON COLD TOLERANCE, SOME OXIDATIVE PARAMETERS AND APOPLASTIC PROTEINS OF COLD STRESS AND SALICYLIC ACID TREATMENT IN LOW TEMPERATURE SENSITIVE TWO MAIZE (*Zea mays* cv. Osk596 ve *Zea mays* cv. Arifiye) VARIETY

Ömer KARADAĞOĞLU

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mine AKSOY

Purpose: In this study, the effects of cold and salicylic acid on cold damage, ice nucleation activity, apoplastic antioxidant enzyme (catalase, peroxidase and superoxide dismutase) activities, lipid peroxidation, H₂O₂ content and SDS-electrophoresis of apoplastic proteins in two varieties of maize leaves were investigated. In addition, the effects of cold to content of endogenous SA were investigated.

Method: 0.0, 0.01, 0.1, 0.5 and 1 mM SA were applied by spraying on the leaves after the plants were grown for 9 days. Then, the plants were transferred to cold (10/7 °C) for one day before the cut days (10., 17., 24., ve 31.). Samples were taken from leaves grown in cold conditions throughout one day for experiments.

Findings: According to our findings, SA application in general reduced cold damage. In Hybrid, while cold treatment did not affect ice nucleation activity, cold+SA treatment increased it. In Arifiye, cold and cold+SA treatments affected the ice nucleation activity on some days. In hybrid, cold and cold+SA treatment on all days significantly increased apoplastic SOD and POD activity compared to control. Apoplastic CAT activity could not be determined in hybrid. Cold and cold+SA treatment caused significant changes in apoplastic SOD, POD and CAT activities in Arifiye. In both maize cultivars, cold and cold+SA treatment generally increased LPO. In both maize varieties, cold and cold + SA application did not affect the content of hydrogen peroxide on the 10th and 17th days, but caused a change in the 24th and 31st days. In Hybrid and Arifiye cultivars, both cold and cold+SA treatment were effective on the amount and type of apoplastic proteins determined by SDS-PAGE. Endogenous SA levels were generally decreased by cold treatment in Hybrid and Arifiye.

Result: It was determined that SA treatment was effective in increasing chilling tolerance in two cold-sensitive maize varieties.

Keywords: Apoplast, *zea mays*, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, SDS-PAGE, cold stress, salicylic acid

2023, 107 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	xi
GİRİŞ.....	1
Araştırmanın Amacı	11
KURAMSAL TEMELLER.....	12
MATERYAL-METOT	16
Kullanılan Cihazlar	16
Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	16
Bitkilerin Büyütülmesi	19
Bitki materyalleri ve büyüme.....	19
% Donma Hasarının Belirlenmesi.....	19
Apoplastik Proteinlerin Ekstrakte Edilmesi	19
Buz Nükleasyon Aktivitesinin Belirlenmesi.....	20
Apoplastik Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	20
Glukoz 6-Fosfat dehidrogenaz aktivitesinin belirlenmesi	20
Katalaz aktivitesinin belirlenmesi	21
Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi.....	22
Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi.....	22
SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	23
Lipid peroksidasyon aktivitesinin belirlenmesi	24
H ₂ O ₂ miktarının belirlenmesi	24
Endojen SA içeriğinin ekstraksiyonu ve belirlenmesi	25
ARAŞTIRMA BULGULARI	26
Donma Hasarı Sonuçları	26
Hibrit çeşitinin donma hasarı sonuçları	26

Arifiye çeşitinin donma hasarı sonuçları.....	32
Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz Enzim Aktivitesinin Sonuçları.....	38
Buz Nükleasyon Aktivitesi Sonuçları	38
Mısır (Hibrit) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları	38
Mısır (Arifiye) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları	41
Apoplastik Enzim Aktivitesi Sonuçları.....	44
Mısır (Hibrit) Yapraklarından Elde Edilen Apoplastik Enzim Aktivitesi Sonuçları	44
Mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen apoplastik enzim aktivitesi sonuçları	47
Lipid Peroksidasyon Aktivitesi Sonuçları.....	51
Mısır (Hibrit) yapraklarındaki lipid peroksidasyon aktivitesi sonuçları	51
Mısır (Arifiye) yapraklarındaki lipid peroksidasyon aktivitesi sonuçları	53
H ₂ O ₂ Miktarı Sonuçları	55
Mısır (Hibrit) yapraklarındaki H ₂ O ₂ miktarı sonuçları	55
Sodyum Dodesil Sülfat -Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE) Sonuçları.....	58
Mısır (Hibrit) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçları...	58
Mısır (Arifiye) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçları...	62
Endojen SA sonuçları.....	66
TARTIŞMA-SONUÇ	67
Donma Hasarı Sonuçları ve İlgili Çalışmalar	67
Buz Nükleasyon Aktivitesi Sonuçları ve İlgili Çalışmalar	70
Apoplastik Enzim Aktivitesi Sonuçları ve İlgili Çalışmalar.....	72
Lipid Peroksidasyon Aktivitesi Sonuçları ve İlgili Çalışmalar.....	77
Hidrojen Peroksit Miktarı Sonuçları ve İlgili Çalışmalar	79
SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi Sonuçları ve İlgili Çalışmalar.....	79
Endojen SA sonuçları.....	81
KAYNAKÇA	83
ÖZGEÇMİŞ.....	94

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. 10 Günlük Mısır (Hibrit) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları	27
Tablo 2. 17 Günlük Mısır (Hibrit) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları	28
Tablo 3. 24 Günlük Mısır (Hibrit) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları	30
Tablo 4. 31 Günlük Mısır (Hibrit) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları	31
Tablo 5. 10 Günlük Mısır (Arifiye) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları	33
Tablo 6. 17 Günlük Mısır (Arifiye) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları	34
Tablo 7. 24 Günlük Mısır (Arifiye) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları	36
Tablo 8. 31 Günlük Mısır (Arifiye) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları	37
Tablo 9. Mısır (Hibrit) Yaprak Apoplastından Ekstrakte Edilen Proteinlerin Buz Nükleasyon Aktivitesi Sonuçları	39
Tablo 10. Mısır (Arifiye) Yaprak Apoplastından Ekstrakte Edilen Proteinlerin Buz Nükleasyon Aktivitesi Değerleri.....	41
Tablo 11. Mısır (Hibrit) Yaprak Apoplastında SOD Aktivitesi Değerleri	44
Tablo 12. Mısır (Hibrit) Yaprak Apoplastında CAT Aktivitesi Değerleri	45
Tablo 13. Mısır (Hibrit) Yaprak Apoplastında POD Aktivitesi Değerleri	45
Tablo 14. Mısır (Arifiye) Yaprak Apoplastında SOD Aktivitesi Değerleri	47
Tablo 15. Mısır (Arifiye) Yaprak Apoplastında CAT Aktivitesi Değerleri	48
Tablo 16. Mısır (Arifiye) Yaprak Apoplastında POD Aktivitesi Değerleri	49
Tablo 17. Mısır (Hibrit) Yapraklarında Ölçülen Lipid Peroksidasyon Aktivitesi Verileri.....	51
Tablo 18. Mısır (Hibrit) Yapraklarında Ölçülen Lipid Peroksidasyon Aktivitesi Verileri.....	51
Tablo 19. Mısır (Arifiye) Yapraklarında Ölçülen Lipid Peroksidasyon Aktivitesi Verileri....	53
Tablo 20. Mısır (Arifiye) Yapraklarında Ölçülen Lipid Peroksidasyon Aktivitesi Verileri....	53
Tablo 21. Mısır (Hibrit) Yapraklarında Ölçülen H ₂ O ₂ Miktarı (ng/g yaprak) Değerleri.....	55
Tablo 22. Mısır (Hibrit) Yapraklarında Ölçülen H ₂ O ₂ Miktarı (ng/g yaprak) Değerleri.....	55
Tablo 23. Mısır (Arifiye) Yapraklarında Ölçülen H ₂ O ₂ Miktarı (ng/g yaprak) Değerleri.....	56
Tablo 24. Mısır (Arifiye) Yapraklarında Ölçülen H ₂ O ₂ Miktarı (ng/g yaprak) Değerleri.....	57
Tablo 25. Mısır Yapraklarındaki Endojen SA Seviyeleri (µg/g yaprak).....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 10 Günlük Mısır (Hibrit) Yapraklarının Donma Hasarı Yüzdeleri.....	27
Şekil 2. 17 Günlük Mısır (Hibrit) Yapraklarının Donma Hasarı Yüzdeleri.....	29
Şekil 3. 24 Günlük Mısır (Hibrit) Yapraklarının Donma Hasarı Yüzdeleri.....	30
Şekil 4. 31 Günlük Mısır (Hibrit) Yapraklarının Donma Hasarı Yüzdeleri.....	32
Şekil 5. 10 Günlük Mısır (Arifiye) Yapraklarının Donma Hasarı Yüzdeleri.....	33
Şekil 6. 17 Günlük Mısır (Arifiye) Yapraklarının Donma Hasarı Yüzdeleri.....	35
Şekil 7. 24 Günlük Mısır (Arifiye) Yapraklarının Donma Hasarı Yüzdeleri.....	36
Şekil 8. 31 Günlük Mısır (Arifiye) Yapraklarının Donma Hasarı Yüzdeleri.....	38
Şekil 9. 10 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları	39
Şekil 10. 17 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları.....	40
Şekil 11. 24 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları.....	40
Şekil 12. 31 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları.....	41
Şekil 13. 10 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları.....	42
Şekil 14. 17 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları.....	42
Şekil 15. 24 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları.....	43
Şekil 16. 31 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları.....	43
Şekil 17. Mısır (Hibrit) yaprak apoplastında SOD aktivitesi değerleri.....	45
Şekil 18. Mısır (Hibrit) yaprak apoplastında POD aktivitesi değerleri.....	46
Şekil 19. Mısır (Arifiye) yaprak apoplastında SOD aktivitesi değerleri	48
Şekil 20. Mısır (Arifiye) yaprak apoplastında CAT aktivitesi değerleri.....	49
Şekil 21. Mısır (Arifiye) yaprak apoplastında POD aktivitesi değerleri.....	50
Şekil 22. Mısır (Hibrit) yapraklarında ölçülen lipid peroksidasyon aktivitesi verileri	52
Şekil 23. Mısır (Arifiye) yapraklarında ölçülen lipid peroksidasyon aktivitesi verileri	54

Şekil 24. Mısır (Hibrit) yapraklarında ölçülen H_2O_2 miktarı değerleri.....	56
Şekil 25. Mısır (Arifiye) yapraklarında ölçülen H_2O_2 miktarı değerleri.....	58
Şekil 26. 10 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü	58
Şekil 27. 17 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü	59
Şekil 28. 24 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü	60
Şekil 29. 31 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü	61
Şekil 30. 10 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü	62
Şekil 31. 17 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü	63
Şekil 32. 24 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü	64
Şekil 33. 31 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü	65

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

AFP	Antifiriz protein
CAT	Katalaz
EC	Enzim kod numarası
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EU	Enzim ünitesi
G6PD	Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
kDa	Kilodalton
LPO	Lipit peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	Nitroblue tetrazolium klorür
POD	Peroksidaz
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SA	Salisilik asit
SDS	Sodyum dodesilsülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Triklorasetik asit

GİRİŞ

Bitkiler, yaşadıkları ekosistemde büyüme ve gelişmeleri için gerekli optimum şartların değişmesiyle pek çok negatif koşul ile karşılaşabilir ve bu sebeple strese maruz kalabilirler. Stres tanımının yapılması özellikle abiyotik değişkenlerin farklı türlerde aynı etkiyi yapmaması sebebiyle zorluk oluşturmalarına rağmen, stres metabolik iç dengeyi değiştiren yada bozan kısaca; bitkilerde büyüme durumunda herhangi bir değişiklik yada zarar meydana getiren durum olarak tanımlanabilir. Metabolik faaliyetlerin bozulması sonucu oluşan zarar bitkinin büyüme ve gelişmesine engel olur hatta verimde de düşüşe sebebiyet verir. Bitkiler streslere, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişiklikler oluşturmak suretiyle karşı koyarlar (Hale and Orcutt 1987; Kocaçalışkan 2004; Shulaev *et al.* 2008).

Bitkiler, biyotik ve abiyotik stresler olmak üzere farklı stres türleri ile karşı karşıyadır. Bu stres kaynaklarından biyotik olmayanlar kendi içinde fiziksel ve kimyasal olarak da sınıflandırılabilir (Kadıoğlu 2004; Mutlu 2005; Saleem *et al.* 2021).

Bitkiler düşük dozda ya da sürede strese maruz kaldıktan sonra aynı stres şartlarına girdiğinde bu stresle hiç karşılaşmamış bitkiye göre daha dayanıklı olabilmektedir. Bu durum aklimasyon olarak adlandırılır. Strese karşı koyma süreçleri üç başlık altında incelenebilir. Bunlar adaptasyon, sakınma ve toleranstır. Adaptasyon zorlu stres koşulları altında bitkinin gösterdiği kalıcı dirençtir. Sakınma, ortamda stres şartları varken, bitkinin stres şartlarından kaçınma çabasıdır. Bu kaçınmayı stresten uzak güvenli bir iç ortam oluşturmaya çalışarak yapar. Tolerans ise morfolojik, yapısal, fizyolojik, biyokimyasal veya moleküler değişikliklerle stresin oluşturduğu hasarı gidermek için gösterilen mukavemet yani strese dayanma kapasitesidir.

Sıcak, soğuk, kuraklık, tuzluluk ve besin stresi gibi abiyotik stres faktörlerinin dünya tarımı üzerinde büyük bir etkisi vardır ve bunların çoğunun kültür bitkisi için ortalama verimi %50'den fazla azalttığı ileri sürülmüştür (Wang *et al.* 2004). Her ne kadar ekosistemlerin verimliliği tüm çevresel etmenlerin etkisi altındaysa da sıcaklık diğer stres koşullarının yanında kontrol altına alınması en zor ve bitki metabolizmasını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Bitkiler ise bulundukları ortam sıcaklığına uyum sağlarlar. Dünyada karasal alanın yaklaşık dörtte birlik kısmı 15 °C'nin altına düşmeyen ve donma riski olmayan bölgelerden oluşmaktadır (Sakai and Larcher 1987; Zhao 1998; Vagujfalvi *et al.* 1999; Szalai *et al.* 2001). Diğer bölgeler bilhassa soğuğa duyarlı bitkilerin zarar görebilecekleri suyun

donma sıcaklığının altına düşebilmektedir (Scebba *et al.* 1998; Pearce 1999; Pearce 2001; Puhakainen, 2004). Bitki yayılışını ve gelişimini etkileyen en önemli stres kaynaklarından biride sıcaklıktır. Turunçgillerde, kışlık tahıllarda, patatesten, yaprağını döken meyve ağaçlarında ve bazı sebzelerde 2 °C'lik bir dona dayanıklılık sağlanabilirse, bunların toplam veriminde önemli artışlar olacaktır. Ters durumda da önemli kayıplar söz konusu olabilir. Mesela, Dünyanın ortalama sıcaklığındaki 1 °C azalma, pirinç üretiminde % 40'luk azalmaya neden olabilir (Pearce 1999).

Bitkinin çevre sıcaklığının düşmesi durumunda metabolik faaliyetleri azaltarak üşüme hasarı oluşabileceği gibi suyun donma noktasının altına inen sıcaklıklarda buz oluşumu sebebiyle başta zar yapısı etkilenecek donma hasarı oluşur (Urritia *et al.* 1992; Hon *et al.* 1994). Oluşan hasarın yüzdesi soğukta kalma periyoduna, soğuğun şiddetine, soğukta kaldığı olgunluk süresine, bitkideki mevcut ve metabolize edilerek dönüştürülecek çözünabilir şeker miktarı ile prolin içeriğine, bitkide bulunan büyümeyi düzenleyicilerin dengesine ve buz çekirdeğinin oluşumunu geciktirebilecek polipeptitleri sentezleyebilme kabiliyetine bağlıdır (Griffith *et al.* 1992; Taşkın 2004).

Hücreler arası bölgede buz oluşmasına dayanma ve hücre içinde buz oluşumunu engelleme ne kadar iyi ise donma toleransı o kadar yüksektir. Aslında doğal yollarla donmuş bitki hücrelerinin içinde hiç buz kristalleri gözlenmemiştir. Donma önce apoplastik bölgede başladığı için donmaya toleranslı bitkiler, bu bölgenin donmaya başlamasından sonra ancak hasar gösterirler (Antikainen 1996). Donmaya toleranslı bitkilerde ekstraselüler bölgedeki buz kristalleri eridiğinde tekrar hücre içine alınarak metabolizmaya katılabilmektedir. Soğuğa alıştırmamış bitkilerde ise ekstraselüler bölgedeki buz oluşumu hücre membranında hasara yol açar (Steponkus, 1984). Bu sebeple bitkiler hücreyi korumak için buz oluşumuna karşı bazı bileşikler üretirler (Griffith *et al.* 1997). Bu bileşikler şekerler, antifirizpolipeptidler, aminoasitler gibi bileşiklerdir (Atıcı and Nalbantoğlu, 1999 a,b). Özellikle kışlık bitkiler, bunları apoplast bölgede sentezler ya da bu bölgede biriktirirler (Ewart *et al.* 1999).

Soğuk stresi bitkilerde bazı metabolik yolları aktive ederek '**Reaktif Oksijen Türlerinin**' (ROS) oluşumuna neden olur. ROS atmosferik oksijenin kısmen indirgenmiş veya uyarılmış formlarıdır. ROS, hücrelerde sinyal molekülleri olarak işlev görür, ancak aynı zamanda aerobik metabolizmanın kaçınılmaz toksik yan ürünleri olarak da düşünülmektedir. ROS'lar, atmosferik oksijen seviyelerinin tehlikeli düzeylerinin hücreler tarafından algılanmasında veya farklı metabolik tepkimeleri takip etmek için sinyal molekülleri olarak kullanıldıkları tahmin edilmektedir. Daha sonra bitkilerde, hayvanlarda ve ökaryotik

organizmaların çoğunda düzenleyici olarak rol oynamak üzere farklılaşmışlardır (Mittler *et al.* 2011).

ROS, farklı seviyelerde reaktivite, üretim yerleri ve biyolojik zararları geçme potansiyeli gibi çeşitli özellikleri sayesinde çok işlevseldir (Gechev *et al.* 2002). Bitkiler ROS'un seviyesini düzenleyen enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan kapasiteye sahiptir (Minibaeva and Gordon 2003; Mittler 2017).

Aerobik metabolizmanın toksik yan ürünleri olan ROS, öncelikle kloroplastlarda, mitokondrilerde ve peroksisomlarda, aynı zamanda atmosferik oksijene bir elektronu uymak veya vermek için yeterince yüksek redoks potansiyeline sahip proteinler veya moleküller içeren hücrenin başka bir bölümünde oluşabilir. Oluşan ROS bir takım antioksidan enzimler ve antioksidan maddeler aracılığıyla uzaklaştırılır veya detoksifiye edilirler. Hücrelerde yer alan birçok antioksidan sistem ROS'u toksik olmayan bazal bir seviyede tutar ve bu dengenin bozulması ROS sinyal reaksiyonları için kullanılabilir (Mittler *et al.* 2004).

Kloroplast, mitokondri, peroksisom ve apoplast abiyotik strese maruz kalma durumunda ROS üreten başlıca bölgelerdir. (Dietz *et al.* 2016; Gilroy *et al.* 2016; Huang *et al.* 2016; Kerchev *et al.* 2016 ; Rodríguez-Serrano *et al.* 2016; Takagi *et al.* 2016).

Singlet oksijen (1O_2), süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) reaktif oksijen türleri arasında sayılabilir. Bunlardan singlet oksijen yüksek oksidan özelliğe sahip olmasına karşın üzerinde ortaklanmamış elektronu bulunmadığından radikalik özellik göstermez. Ancak doymamış yağ asitlerindeki karbonlar arasındaki çift bağ ile tepkimeye girip süperoksitler oluşturarak lipid peroksidasyonuna sebep olur (Mutlu 2005). Hücredeki yarılanma süresi 1-4 μs olan singlet oksijen, hidroksil radikali gibi non-enzimatik reaksiyonlar tarafından metabolize edilir.

Reaktif oksijen türleri içerisinde en aktif olanı hidroksil radikali. Hidroksil radikali geçiş metallerinin H_2O_2 'yi indirgemesi (fenton tepkimesi) ile, $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'nin demir ve bakır iyonları katalizörlüğünde birbirleri ile reaksiyona girmesi (Haber-Weiss reaksiyonu) ile (Halliwell 1991) ya da suyun x veya γ – ışınları tarafından iyonize edilmesiyle (Akkuş 1995) oluşur. Hidroksil radikali hemen her türle tepkime verebilmesine karşın en önemli hasarı bir serbest radikal zincir reaksiyonu oluşturması açısından lipid peroksidasyonudur. Böylece hücre zarının yapısını bozarak geçirgenliğini artırır ve hücre ölümüne sebebiyet verebilir (Güler 2008). Son derece reaktif olan hidroksil radikalının hücredeki yarı ömrü (1ns), çok kısa ömürlü ve kararsız olduğunu göstermektedir (Mhamdi and Breusegem, 2018).

Oksijen molekülüne bir elektron ilavesiyle süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) oluşur (Miller *et al.* 1990). Serbest radikal olmasına rağmen yüksek derecede reaktif değildir. Süperoksit'in üretimi daha çok hücrenin mitokondrisinde gerçekleşir (Cadenas and Sies 1998). Hücrede süperoksit radikalinin yarılanma ömrü 1-4 μs 'dir. Süperoksit radikali ile hidrojen peroksit daha toksik olan hidroksil radikalini üretmek üzere reaksiyon verebilir. Süperoksit radikali, süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizörlüğünde dismutasyona uğrayarak konsantrasyonu azaltılır (Halliwell *et al.* 1987; Güler 2008).

Süperoksit anyonuna bir elektron ya da oksijene iki elektron eklenmesiyle hidrojen peroksit oluşur (Flora 2007). Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'nin asıl üretimi süperoksitin nonenzimatik veya süperoksit dismutaz (SOD) katalizli dismutasyon reaksiyonu ile olur. Bitkilerde H_2O_2 , peroksizomlarda ise fotorespirasyon, kloroplastlarda Mehler reaksiyonu, mitokondride elektron taşınımı sırasında oluşur. H_2O_2 üretiminin bir diğer yolu hücre zarına yerleşmiş NADPH oksidaz gibi enzimlerle enzimatik yolla gerçekleşir (Ślesak *et al.* 2007). H_2O_2 zardan kolaylıkla geçebilen bir moleküldür. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz. Bu sebeple hücre içindeki yarılanma ömrü 1 ms'nin üzerinde olabilmektedir (Mhamdi and Breusegem 2018).

H_2O_2 'nin oksitleyici özelliği hidroksil radikalinin öncülü olmasından kaynaklanmaktadır. H_2O_2 özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilecek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Biyolojik sistemlerde oluşan hidrojen peroksitin uzaklaştırılması gerekir (Halliwell *et al.* 1987; Güler 2008). Katalaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzimler hidrojen peroksiti H_2O ve O_2 gibi ürünlere dönüştürerek uzaklaştırır. Oksitatif strese tolerans sağlamada bitkilerin bu enzimlerin hücresele seviyelerini düzenlemesi oldukça önemlidir (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003, Mutlu 2005).

Antioksidan sistem tarafından uygun bir düzeyde dengelenmiş ROS, fagositoz ve aklımasyon ile ilişkili hücresele sinyalleşme sırasında, birçok hücresele süreçte, özellikle enfeksiyona karşı savunmada önemli bir rol oynar. Ancak antioksidan sistemin dönüştürme kapasitesini aşan ROS oluşumu biyomoleküllerin (nükleik asit, proteinler ve lipidler) oksitlenmesine sebep olur. Protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu, Fenton reaksiyonu yoluyla hidrojen peroksidin (H_2O_2) metal iyonları aracılığı ile indirgenmesiyle oluşan hidroksil radikalleri ($\cdot OH$) ile başlatılır.

HO•/H₂O redoks çiftinin oldukça yüksek standart redoks potansiyeli nedeniyle ($E_0'(\text{HO}\bullet/\text{H}_2\text{O}) = 2,3 \text{ V}$, pH 7), HO•, proteinlerin ve lipidlerin en güçlü oksidandır (Berlett and Stadtman 1997).

Süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$) proteinlere ve lipidlere karşı zayıf bir reaktiftir ancak süperoksitin protonlanmış hali olan hidroperoksil radikali HO₂• daha reaktif olarak kabul edilir. HO₂•'nin süperoksite kıyasla, amino asitten veya çoklu doymamış yağ asidinden hidrojeni ayırma konusundaki daha yüksek yeteneği, daha fazla oksitleme gücüne ($E_0'(\text{O}_2^{\bullet-}/\text{H}_2\text{O}_2) = 0,89 \text{ V}$ iken $E_0'(\text{HO}_2\bullet/\text{H}_2\text{O}_2) = 1,06 \text{ V}$ 'dur) ve molekül üzerinde negatif yük olmamasına bağlıdır.

HO• ve HO₂•'nin yanı sıra, üçlü pigmentlerden O₂'ye uyarma enerjisi aktarımıyla oluşan singlet oksijen (¹O₂), proteinlerin ve lipidlerin potansiyel oksidantı olarak bilinir. (Davies 2003)

Hücrelerin temel bileşenlerinden olan lipitlerin, hücre zarlarının yapısını ve fonksiyonunu koruduğu bilinir. Bitki lipitleri; yağlar, mumlar, steroidler, fosfolipitler, hidrokarbonlar ve serbest yağ asitleri ve bunların tuzlarını (sabunlar) içerirler. Membran lipitleri tüm hücre zarlarının ana bileşenini oluşturur ve hidrofobik yapısından dolayı sulu ortamda kendiliğinden lipit ikili tabaka oluşturur ve yapıda fosfolipid ve steroller (özellikle stigmasterol) diğer lipitlerden daha bol bulunur (López *et al.* 2011).

Bitki plazma zarının dinamik doğası ve lipit bileşiminin/yapısının hassasiyeti nedeniyle abiyotik stresler gibi durumlarda membran lipitlerinde değişiklikler olur. Bunlar stres indikatörleri olarak kabul edilir ve bitkinin potansiyel abiyotik strese uyum sağlamasına yardımcı olur (Barkla and Pantoja 2010; Furt *et al.* 2011; Murphy *et al.* 2010).

Lipit peroksidasyonu (LPO) çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımıdır ve oldukça zararlıdır. Çünkü lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. LPO ile geri dönüşümsüz membran hasarı oluşur (Akkus 1995). Lipit peroksidasyonu enzimatik ve non-enzimatik yollarla gerçekleşir. Enzimatik olan lipit peroksidasyonu lipoksigenazla başlar. Enzimatik olmayan lipit peroksidasyonu radikal içeren ve içermeyen mekanizmalardan oluşur. Radikal içeren mekanizmada lipit peroksidasyonu hidroksil tarafından daha az ölçüde ise hidroperoksil tarafından başlatılırken, radikal içermeyen lipit peroksidasyon mekanizmasını singlet oksijen başlatır (Frankel 1984; Farmer and Mueller 2013; Yin *et al.* 2011).

Lipit peroksidasyonu, birbirini izleyen serbest radikal zincir reaksiyonları yoluyla üç adımda ilerler: başlatma, yayma ve sonlandırma. Başlatma adımı HO•, lipitteki (LH) bir

yağ asidinin aktif metilen grubundan bir hidrojen atomu çekerek H₂O ve bir lipid alkil radikali verir. Oluşan lipid alkil radikali (L•) kararlı olmadığı için O₂ ile hızla reaksiyona girerek bir lipidperoksil radikali (LOO•) oluşturur. Yayılma adımında, LOO• bitişik bir LH'den başka bir hidrojen atomunu kopararak LOOH oluşumuna yol açarken, aynı zamanda başka bir L• oluşturur. Bu döngü lipid peroksidasyonu bitene kadar devam eder. Böylece, tek bir başlatma adımından sonra çok sayıda LH, LOOH'lara dönüştürülür. Radikalik olmayan mekanizmada ise, ¹O₂'nin LH deki çoklu doymamış yağ asidinin çift bağına bitişik karbon atomu ile elektrofilik reaksiyonu ile LOOH oluşur. Bu durumda yayılma olmaz çünkü lipid radikalleri (L• ve LOO•) oluşmaz. Enzimatik mekanizmada LH, lipoksigenaz tarafından oksitlenir (Triantaphylides *et al.* 2008, Triantaphylides and Havaux 2009). Hidroperoksi yağ asitlerinin; hidroksi yağ asitleri, reaktif karbonil türleri (RCS) ve elektronik olarak uyarılmış türler gibi ikincil lipid peroksidasyon ürünlerine ayrıştığı iyi bilinmektedir. Malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksi-(E)-2-nonenal (HNE), lipid peroksidazından sonra oluşan tipik RCS üyeleridir (Esterbauer *et al.* 1991; Ayala *et al.* 2014)

Malondialdehit (MDA) ve karbonillenmiş proteinin bitki dokularında ki içeriği (fosfolipidlerde doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA) lipid peoksidasyonu/hücre membranı hasarının göstergesi olarak kabul edilir (Taulavuori *et al.* 2001; Sochor *et al.* 2012). MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir belirteci olarak sayılmamakla birlikte lipid peroksidasyonu derecesi ile paralellik 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 ve Ozan 2003; Kuru 2007; Erdal 2010).

Bitkiler, oksidatif strese karşı koymak için antioksidan aktivite seviyesini korumalıdır (Chu *et al.* 2016). Bitkiler aşırı ROS'u temizlemek için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Bunların içinde antioksidan metabolitler ve katalaz, süperoksit dismutaz, peroksidaz gibi antioksidan enzimler bulunur (Pasbani *et al.* 2020).

Katalaz (CAT) (EC 1.11.1.6) yüksek konsantrasyonlu hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen, demir porfirin içeren dört eşit alt ünitelerden oluşan ve yüksek molekül ağırlığına sahip oksidoredüktaz sınıfı enzimlerden biridir. Bu enzim bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunur. Bitki dokularında çok yüksek dağılım göstermektedir (Bergmeyer and Grabl 1983; Chaudiere and Ferrari-Iliou 1999; McClung 1997).

Katalaz enzimi üç grupta sınıflandırılır: monofonksiyonel demir katalaz (tipik), peroksidaz katalaz ve manganaz katalaz.

En büyük alt grup, genellikle 200-340 kDa moleküler ağırlık aralığına sahip, dört prostetik hem grubu olan ve Soret bandında 1 civarında Rz (A406/A280 oranı) değerleri ile güçlü bir absorbanza sahip olan tetramerler olan tipik katalazlardır.

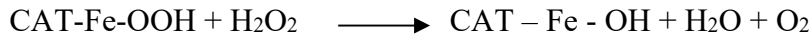
Katalaz-peroksidazlar genel olarak moleküler ağırlıkları 120-340 kDa arasında olan homodimerlerdir. Katalaz-peroksidazların karakteristik özelliği, iki işlevli katalitik yetenekleri ve nispeten düşük Rz değerleridir.

Üçüncü grup; aktif bölgelerinde hem yerine manganaz iyonu bulunan, 170-210 kDa moleküler ağırlık aralığında sıra dışı oligomerik yapılara sahip olan ve sadece birkaç tanesi tanımlanan manganaz katalazlarını içerir (Zamocky and Koller 1999).

Katalaz tarafından katalizlenen tepkime iki basamakta gerçekleşir. Reaksiyonun ilk basamağında CAT yapısındaki hem-demir, hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek demir peroksit meydana gelir.



Oluşan ara ürün (demir peroksit) bileşik-I olarak tanımlanır. Ortamda yeterli hidrojen peroksit olduğunda, CAT hem elektron alıcısı hem de elektron vericisi olarak hidrojen peroksiti kullanır ve ağırlıklı olarak peroksizomlarda lokalizedir. Bileşik I, ikinci hidrojen peroksit molekülü ile reaksiyona girerek moleküler oksijen ve suya dönüşür.



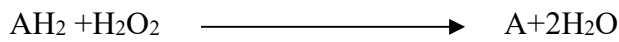
Ortamda yeterli hidrojen peroksit olmaması durumunda, bileşik-I uygun bir hidrojen donörü ile indirgenir ve eski haline getirilir (Kavakçıoğlu 2012).

CAT enziminin bitki hücre organellerindeki bulunma oranları farklı olmasına rağmen, toplam hidrojen peroksit konsantrasyon yüzdesinin en fazla olduğu peroksizomlarda daha fazla bulunmaktadır. CAT'ın temel fonksiyonu, özellikle membranlarda oluşabilecek geri dönüşümsüz hasarları engellemektir (Scandalios 1993; Chaudiere and Ferrari-Iliou 1999).

Birkaç çalışma, farklı stresler sebebiyle oluşan ROS birikiminin neden olduğu zararları önleyebileceğinden, CAT artışının bitki savunması için gerekli olduğunu göstermiştir (Zhou *et al.* 2017). Ek olarak CAT, hücreler arası boşlukta en yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu ve toplam aktivitenin yaklaşık %0,2 ila %2'sine ulaştığı belirtilmiştir (Vanacker *et al.* 1998a; Vanacker *et al.* 1998b; Parra-Lobato *et al.* 2009). Ayrıca, CAT aktivitesi ile

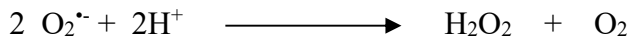
apoplastta RBOH ve POX'lar tarafından ROS üretimi arasında bir bağlantı olduğu görülmüştür (Salguero and Böttger 1995).

Peroksidazlar (POD) (E.C.1.11.1.7) bir antioksidan enzim grubudur. POD, bazı organik moleküllerin hidrojenlerini H₂O₂'ye aktaran (Bergmeyer and Grabl, 1983) bir hemoproteindir (Banci 1997; Kim *et al.* 2000). Peroksidazlar prostetik grup olarak demir (III) ve protoporfirin IX içerirler. Bazı peroksidazlarda ise hem grubu yerine sistein veya selenosistein bulunur. Peroksidazların molekül ağırlıkları 30-150 kDa aralığında değişmektedir (Mugdha and Usha, 2012). Spesifik substrata sahip peroksidazlar etki ettiği substratın adıyla birlikte belirtilir: glutatyon peroksidaz, lignin peroksidaz gibi; fakat substrat sayısı fazla ise sadece peroksidaz olarak belirtilir. POD'lar aşağıdaki reaksiyonu katalizlerler.



POD, aktivitesinin düşük sıcaklık dahil birçok stres faktöründen etkilenmesi sebebiyle stres enzimi olarak adlandırılmaktadır (Kim *et al.* 2000; Mutlu 2005). POD; bitkilerde yaygın olarak bulunur ve ayrıca hücreler arası bölgede de bulunduğu bildirilmiştir (Kim *et al.* 2000).

Süperoksitdismutazlar (SOD) (E.C.1.15.1.1) süperoksit radikallerini bitki için daha az zararlı olan hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizleyen ve metal içeren enzimlerdir. Bu nedenle, ROS'un ilk detoksifikasyon basamağı olarak kabul edilirler (Berwal and Ram 2018). Enzimin, incelenen tüm aerobik organizmalarda birçok biyolojik oksidasyonun yan ürünlerine karşı savunmada önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. (Sairam and Srivastava 2000; Minibaeva and Gordon 2003; Bowler *et al.* 1994). SOD aşağıdaki reaksiyonu katalizler.



Bitkilerde, aktif bölge metal iyonlarına göre sınıflandırılan enzimin üç formu vardır: bakır/çinko, manganez ve demir formları (Alscher *et al.* 2002; Bowler *et al.* 1994). Sitoplazmada ve hücre dışı matrisde bakır/çinko formu bulunmaktadır (Marklund 1982). Sitoplazmada lokalize olan bakır/çinko süperoksitdismutaz, 32 kDa moleküler ağırlığa sahip bir homodimerdir, aynı zamanda çekirdekte ve peroksizomlarda da bulunur. Cu/Zn SOD, aktif bölgesinde alt birim başına bir Cu⁺² ve bir Zn⁺² içeren iki özdeş alt birimden oluşur (Fridovich 1975). Ancak Cu/Zn içeren glikoprotein yapıda ekstraselüler SOD molekül ağırlığı yaklaşık 135 kDa olan tetramerik bir enzimdir (Marklund 1982).

Ayrıca, birçok çalışma bu enzimlerin abiyotik strese karşı direnç kazandırdığını bildirmiştir. Bazı çalışmalar, SOD aktivitesi ve SOD izoformlarının sayısı arttıkça bitkilerin

tolerans seviyesinin arttığını göstermektedir. SOD, birçok bitki türünde, domates, buğday, arpa ve narenciye gibi çok sayıda mahsulde, kuraklık, tuz ve ağır metaller gibi çeşitli abiyotik strese neden olan faktörler tarafından aktivitesinin artırıldığı bildirilmiştir (Berwal and Ram 2018).

Salisilik asit (SA) (o-hidroksibenzoik asit), serbest halde erime noktası 157-159°C olan ve kristal toz halinde bulunan bitki fenolikleri grubundan bir bileşiktir. Prokaryotlarda ve bitkilerde yaygın olarak üretilir. SA'nın bitki bağışıklığına dahil olduğuna dair ilk gözlemler, 1979'da virüse duyarlı tütünde (*Nicotianatabacum* cv. Xanthi-nc) aspirin (asetil-SA) uygulamasının virüse karşı direnç kazandırdığını açıklayan RaymondF. White tarafından rapor edilmiştir (White 1979).

Ayrıca SA'nın bitkinin kuraklık (Singh and Usha 2003), soğuk (Taşgın *et al.* 2003; Mutlu 2005), ağır metal toksisitesi (Ananieva *et al.* 2004), ısı ve ozmotik stres (Sakhabutdinova *et al.* 2004) gibi abiyotik streslere tepkisi sırasında rol oynadığı bulunmuştur. Bu anlamda SA, bitkiler için 'etkili bir terapötik ajan' gibi görünmektedir. Özellikle, endojen bir bitki büyüme düzenleyicisi ve bir sinyal molekülü olan SA, stres toleransını iyileştirmek için bitki sinyal işlemlerinin düzenlemelerini içerir. Bu nedenle, son zamanlarda yapılan birkaç çalışmada, SA'nın, metabolik süreçler yoluyla bitki stres toleransını iyileştirmede ki katkısı giderek daha fazla kabul görmektedir.

SA'nın doğal bir fitohormon olduğu kabul edilmektedir. Fitohormonlar, çeşitli fizyolojik fonksiyonları düzenlemek için çok düşük dozlarda endojen sinyaller olarak hareket eder ve eksojen uygulama sonrası bitkinin farklı bölümlerine etki edebilir (Raskin 1992a,b).

Apoplastik bölgeler, bitkilerdeki hücreler arası boşluklardır ve ekstraselüler bölge olarak da tanımlanırlar. Büyüyen bitki hücresi polisakkaritce zengin bir ilk duvarla çevrilir. Bu duvar plazma membranı ile kütikül arasındaki her yeri içine alır ve birbirine yapışık olarak bulunur (Taşgın 2004).

Apoplast, hücreler arası boşluk, hücre duvarları ve ksilemden oluşur. Ancak bu hücreler arası boşluk her yerde aynı değildir, çünkü farklı organ apoplastlarının içerikleri diğer organ apoplastlarından farklıdır ve bu içerik, dokunun özelliklerine ve bitkideki işlevine göre değişir (Kramer 2006).

Besin ve su taşınması, selüloz sentezi ve hem biyotik hem de abiyotik streslere karşı bitki savunmasında yer alan moleküllerin sentezi gibi bitki için önemli fonksiyonlar burada gerçekleşir. ROS, antioksidanlar, proteinler ve hormonlar apoplast bölgede bulunan en önemli moleküllerdir. Apoplastta bulunan ROS hücre içine oranla çok küçük miktardadır.

Ancak bitki gelişimi ve stres koşullarında tepki vermesi açısından apoplastik ROS önemli bir role sahiptir. Apoplastta, hücre içi hücre bölmelerinde olduğu gibi farklı ROS türlerini detoksifiye edebilen spesifik bir antioksidan sistem bulunabileceği bildirilmiştir. Bu ROS giderici antioksidanlar, strese karşı tolerans kazandırır ve hücresel hasarı önler. Apoplastta proteinlerin ve peptitlerin üretimi ve birikmesi, çeşitli streslere yanıt olarak gerçekleşir. Apoplastta önemli işlevleri yerine getiren hormonlarda bulunur ve taşıma yoluna karışmış gibi görünen oksinlerin ve sitokinlerin varlığından da bahsedilmiştir (Sakurai 1998). Apoplasttaki hormonal seviyeler, hücre içinden önemli ölçüde daha düşüktür ve transmembran akış taşıyıcılarının varlığına bağlıdır. Ek olarak, apoplast aynı zamanda mikropla ilişkili moleküler modellerin (MAMP'ler) patojenler tarafından salgılandığı alandır. Özetle, bitki hücrelerinin strese cevap verme ve hayatta kalmasında apoplasttaki moleküllerin çeşitliliğinin önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

Apoplast, dinamik doğası bitki için büyük önem taşıyan birçok reaksiyonun içinde yer almasına izin verdiğinden, çok sayıda işlevde yer alır (Sakurai 1998; Chikov and Bakirova 2004). Bu işlevler arasında besin ve su taşınması, sinyal iletimi, savunma, iyon dengesini sağlama, pH ve su içeriğini ayarlama hücre duvarı bileşenlerinin ve diğer moleküllerin sentezleri sayılabilir (Atıcı and Nalbantoğlu 2003). Bunların arasında, hem biyotik (fitoaleksinler, PR, proteinler, enzimler) hem de abiyotik streslere karşı bitki savunmasında yer alan moleküllerin sentezi önemlidir, çünkü çevresel değişikliklerin tespit edildiği yer apoplasttır.

İlk tanımlamada canlı simplasttan ayrılan ölü apoplastın sonraki yıllarda aktif bir bölge olduğu anlaşılmış ve bu bölgedeki çalışmalar arttırılmıştır (Luwe *et al.* 1993; Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b; Atıcı and Nalbantoğlu 2003). Son yıllarda, bitkilerin apoplastik bölge bileşikleri üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Apoplastik bölge, bitkilerin strese cevabı ve tolerans kazanması durumlarında önemlidir (Duran-Carril and Bujan 1998; Wang *et al.* 2004).

Bitki apoplastik bölgelerinde soğuğa karşı dayanıklılık sağlayan ve antifiriz proteinler olarak da bilinen proteinler, patojenlere karşı salınan proteinlerle yapısal benzerlik gösteren proteinler ve birçok enzimin varlığı belirlenmiştir (Ewart *et al.* 1999, Griffith *et al.* 1997). Savunma ile ilgili en bol bulunan proteinler, toplam apoplastik sıvı proteinlerinin (AFP'ler) %23-33'ünü oluşturan patojenle ilişkili proteinlerdir (PR-proteinleri) (Guerra-Guimaraes *et al.* 2015). PR proteinlerinin üretimi ve birikimi, biyotik/biyolojik stresler ve abiyotik/biyolojik olmayan stresler dahil olmak üzere çeşitli streslerden etkilenir (Tuzun and Somanchi 2006).

Bitkilerin düşük sıcaklığa tepkisi düşük moleköl ağırlığa sahip proteinlerin transkripsiyon hızındaki değişimle ilişkilidir. Suyun donma sıcaklığına maruz kalan çok kısa süreli büyüme periyotuna sahip bitkilerde bile stres proteinleri görülür. Bazı soğuğa hasas bitkilerin soğuğa maruz bırakılması (mısır, pirinç, domates, salatalık, yer fıstığı, pamuk, ayçiçeği v.b) yüksek sıcaklık veya diğer stresler tarafından indüklenen HSP (heat-shockproteins)'lere benzer ve 14 kDa ile 94 kDa arasında moleköl kütlesine sahip 20 den fazla polipeptid sentezini indüklediği bildirilmiştir (Hahn and Walbot 1989; Pareek *et al.* 1998; Li *et al.* 1999). Soğuğa duyarlı bitkilerin soğuğa alışmasına, birkaç proteinin sentezindeki değişiklikler de eşlik eder (Hahn and Walbot 1989; Guy 1990; Cabane *et al.* 1993; Anderson *et al.* 1994).

Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada, düşük sıcaklıklara hassas Hibrit ve Arifiye olmak üzere iki çeşit mısır bitkisinin yapraklarına kontrol bitkisi hariç püskürtme yöntemiyle önce SA uygulanıp daha sonra farklı zaman periyotlarında bu bitkiler birer gün soğuk stresine maruz bırakıldı. Uygulanan salisilik asidin en etkili olduğu konsantrasyon tespit edildi ve bu konsantrasyonlarla çalışmalar devam ettirilerek SA'nın süre açısından da etkisi belirlendi. SA'nın apoplastta yaptığı etkinin belirlenmesinin, soğuğa hassas bitkilerin soğuk stresine cevap mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bunu belirleyebilmek için, mısır yapraklarında;

% donma hasarı

apoplastik bölge proteinlerinin buz nükleasyon aktiviteleri

apoplastik CAT aktiviteleri

apoplastik POD aktiviteleri

apoplastik SOD aktiviteleri

lipid peroksidasyon miktarının ölçümü

hidrojen peroksit miktarının ölçümü

apoplastik proteinlerin elektroforez deneyleri

içsel SA ölçümü yapılmıştır.

KURAMSAL TEMELLER

Hasat öncesi ve hasat sonrası düşük sıcaklıkta büyütülen ve/veya depolanan bitkilerde oluşan donma hasarları ile ilgili literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Fasulye bitkisinin soğuğa maruz kaldığı süre uzadıkça donma hasarının arttığı bildirilmiştir (Chang *et al.* 2001). SA muamelesi soğuğa maruz bırakılan muz bitkisinde (Khademi *et al.* 2019), buğdayda (Wang *et al.* 2022), erik meyvesinde (Luo *et al.* 2011), mangoda %11-%25 oranında (Barman and Asrey 2014), üzüm yapraklarında (Wang and Li 2006) ise hem sıcak hem de soğuk stresinde donma hasarını azaltmıştır. Bir başka çalışmada buğdayda (Chen *et al.* 2016) düşük SA (0,25 mM) konsantrasyonu donma hasarını azaltırken, yüksek konsantrasyon (2,5 mM) bu hasarı artırmıştır. Yasemin bitkisi (Cai *et al.* 2015) ile yapılan bir başka araştırmada ise soğukta yetiştirilen bitki ile SA uygulanmış ve aynı soğuk şartlarda yetiştirilmiş bitkinin donma hasarları karşılaştırılmış ve SA'nın hasarı azaltıcı etki ettiği rapor edilmiştir.

Mineraller, şekerler, proteinler gibi su içinde çözünebilen maddeler suyun donma noktasını düşürür. Buz nükleasyon aktivitesi olarak bilinen bu durum ile ilgili bazı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda arpa ve buğdayda soğuk uygulamasının buz nükleasyonunu artırdığı bulunmuştur (Atıcı and Nalbantoğlu 1999 a,b, Tasgın *et al.* 2003).

Lipid peroksidasyonu hakkında literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. MDA lipid peroksidasyonunun ikincil ürünü olduğu için yağ asidi oksidasyonu, dolayısıyla membran hasarı hakkında fikir veren iyi bir göstergedir. Bu sebeple özellikle stres çalışmalarında sıklıkla MDA ölçümü yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada soğuk uygulaması kontrol grubuna göre nohut bitkisi yapraklarında MDA'yı %77,8 oranında, buğday yapraklarında ise % 37,9 artırmıştır (Genişel 2012). Bir başka çalışmada soğuk stresi domates bitkisinde ki MDA seviyesinde artışa sebep olmuştur (Zhou *et al.* 2012). Fasulye yapraklarına uygulanan soğuk ise kontrole göre MDA seviyesini artırmıştır (Tiryaki 2015). Elymus nutant yapraklarında soğuk MDA içeriğini yine artırmıştır (Chu *et al.* 2016). Farklı iki domates çeşidi ile yapılan çalışmada domatesler düşük sıcaklık altında yetiştirilmiş ve SA uygulaması yapılmış, SA uygulanan domateslerde kontrollere (SA'sız) göre MDA miktarı azalmıştır. (Orabi *et al.* 2015). Erik meyvesi ile yapılan bir başka çalışmada hasat edilen erikler 1,5 mM'lık SA çözeltisine 10 dakika batırılmış sonra soğuk şartlarda depolanmıştır. Depolamanın sonunda SA uygulamalı eriklerde kontrollere göre MDA miktarlarında %14 lük bir düşüş tespit edilmiştir. (Luo *et al.* 2011). Hasat sonrası 2 mM SA ile muamele edilmiş

portakal meyveleri 6 °C ve 20 °C’de depo edilmiş, depolama sonunda MDA içeriklerinde sırasıyla %12,6 ve %27,6’lık bir azalma gözlenmiştir (Huang *et al.* 2008). Arpa yapraklarına SA püskürtülüp soğuğa transfer edilmiş ve MDA içeriği kontrole göre her iki varyetede ve farklı büyüme periyotlarındaki bitkilerde düştüğü belirlenmiştir (Mutlu *et al.* 2013).

Hücredeki yarılanma ömrü en yüksek olan reaktif oksijen türlerinden H₂O₂ nin stres şartlarında sinyal molekülü olarak çalıştığı düşünülmekte ve bu sebeple stres çalışmalarında H₂O₂ ile ilgili çok fazla literatür bulunmaktadır. Soğuk stresine maruz bırakılan nohut ve buğday bitkilerinde, soğuk H₂O₂ miktarını nohutta %42,3, buğdayda ise %33,7 artırmıştır (Genişel 2012). Yine soğukta yetiştirilen fasulye bitkisinin yapraklarında kontrole göre H₂O₂ miktarı artmıştır (Tiryaki 2015). Hasat sonrası SA uygulanmış portakal meyvesinde ki H₂O₂ miktarı ile kontrol meyvelerindeki H₂O₂ miktarı paralellik göstermiştir (Huang *et al.* 2008). Bir başka çalışmada soğukta depolanan mango bitkisinde, depolama süresi uzadıkça meyvelerdeki H₂O₂ içeriği artmış, önceden SA uygulanıp depolanan meyvelerdeki H₂O₂ miktarı aynı süre depolanmış kontrole göre %14-%51 oranında azalmıştır. (Junmatong *et al.* 2015). Başka bir çalışmada soğuk stresine maruz bırakılan domatesin köklerine ön muamele olarak uygulanan H₂O₂, MDA içeriğinde kontrole göre azalmaya sebep olmuş bu durum H₂O₂ ön uygulamasının soğuğa bağlı lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada aklime edilmiş bitki köklerindeki H₂O₂ miktarı aklime edilmeyenlere göre daha düşük çıkmıştır (İşeri *et al.* 2013).

Pirinç fidelerinin besin çözeltisine SA eklenmesiyle kontrole göre H₂O₂ miktarı artmış, aynı çalışmada besin çözeltisine Pb⁺² eklenmiş ve kontrole göre H₂O₂ içeriği artmış, Pb eklenmiş solüsyona aynı zamanda SA eklendiğinde ise H₂O₂ miktarı %9,1 oranında azalmıştır (Jing *et al.* 2007). Benzer bir çalışmada da salatalık bitkisinin besin çözeltisine SA konulmuş ve SA uygulamalı yetişen bitki yapraklarında kontrole göre H₂O₂ miktarı artmıştır sonra çözeltiye Mn⁺² eklenmiş bu yapraklarda H₂O₂ miktarı daha da artmıştır. Mn ile SA uygulandığında ise SA H₂O₂ miktarını düşürmüştür (Shi and Zhu 2008).

Katalaz (CAT) enziminin aktivitesine etki eden bazı literatürler şu şekildedir: Soğukta depolanan şeftali meyvesine sıcak ve SA kombine şekilde uygulanmış ve depolama sonunda CAT aktivitesi önemli ölçüde indüklenmiştir (Cao *et al.* 2010). Tatlı kiraz meyvesine hasat sonrası SA uygulaması yapılmış ve CAT aktivitesi inhibe olmuştur (Asghari *et al.* 2010). Karpuzda SA uygulaması yapıldıktan 2 gün sonra CAT aktivitesi pik yapmış sonrasında düşmüştür (Jing-Hua *et al.* 2008). Kışlık buğday (Ignatenko *et al.* 2019 ;Yordanova and Popova 2007), mango (Junmatong *et al.* 2015), kiraz (Gimenez *et al.* 2017), yasemin (Cai *et al.* 2015) bitkisine SA uygulaması sonrasında CAT aktivitesi artmış, kayısı (Wang *et al.*

2015), su yosunları (Raman and Ravi 2011) ve domatestte (Orabi *et al.* 2015) aktivite düşmüştür.

Peroksidaz (POD) aktivitesi ile ilgili literatürün bir kısmı şöyledir: Kiraz meyveleri hasat edildikten sonra SA uygulaması yapılmış ve soğuk şartlarda depo edilmiş, depolama sonunda POD aktivitesinin uyarıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada POD izoenzimlerinin ekspresyonunun da arttığı bildirilmiştir (Asghari *et al.* 2010). Kirazla yapılan bir başka çalışmada ise hasat öncesi SA uygulanmış sonra kontrol şartlarında depo edilmiş ve POD aktivitesinin SA'sız kirazlara göre arttığı belirtilmiştir (Gimenez *et al.* 2017).

Ananas bitkisinde 5 mM SA uygulaması POD aktivitesini düşürmüş, kışlık buğdayda (Ignatenko *et al.* 2019 ;Yordanova and Popova 2007) ve kayısıda (Wang *et al.* 2015) artmış, erik meyvesinde POD aktivitesi etkilenmemiştir (Luo *et al.* 2011).

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aktivitesi ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunların bir kısmı şöyledir; soğukta depolanan şeftali meyvesine sıcak ve SA kombine uygulamasında SOD aktivitesi önemli ölçüde arttığı (Cao *et al.* 2010), hasat sonrası SA uygulanan kiraz meyvesinde de SOD aktivitesi arttığı belirlenmiştir (Asghari *et al.* 2010). Karpuzda 0,5 mM, 1 mM, 2 mM SA uygulamaları SOD aktivitesini artırırken, 3 mM ve 4 mM uygulamalarda SOD aktivitesi kontrole göre çok daha düşük bulunmuştur (Jing-Hua *et al.* 2008). SA uygulaması, ananasda (Lu *et al.* 2010), kışlık buğdayda (Ignatenko *et al.* 2019), mangoda (Junatong *et al.* 2015), kayısıda (Wang *et al.* 2015) SOD aktivitesini artırmıştır.

Apoplastik CAT, POD ve SOD aktiviteleri üzerine stres faktörlerinin etkisini gösteren çalışmaların çok az olduğu görülmektedir. Bir çalışmada; bakır uygulaması yapılmış buğday köklerinde apoplastik ROS üretiminin azalması SOD aktivitesindeki artışla ilişkilendirilmiştir (Sgherri *et al.* 2007).

Garcia *et al.* (2020), tuza duyarlı ve tuza dirençli bir soğan genotipinin kök ve yaprak dokularındaki apoplastik antioksidan sistemlerinin tuzluluğa tepkisini incelerken, SOD aktivitesi ile tuza dayanıklılık arasında pozitif bir ilişki bulmuşlardır.

Ayrıca, Vanacker *et al.* (1998a) biyotik strese yanıt olarak SOD aktivitesinin arttığını gözlemlemişlerdir. Arpa ve yulaf yapraklarının biyotrofik fungal patojen *Blumeria graminis* ile aşılama 24 saat sonra SOD, CAT, askorbat peroksidaz, dehidroaskorbat redüktaz, mono dehidroaskorbat redüktaz ve glutatyon redüktaz gibi birçok enzimin apoplastda indüklendiğini göstermiştir (Vanacker *et al.* 1998b).

Apoplastik POD üzerine soğukun etkisini gösteren çalışmada, Ladin ağacında soğuk aylarda diğer aylara göre POD aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir (Polle *et al.* 1994).

Apoplastik CAT ve POD aktiviteleri üzerine soğuk ve SA'nın etkilerini gösteren bir çalışma kışlık buğday bitkisinde yapılmıştır. Soğuk şartlarda büyütülen bitki yapraklarında ve ekzojen SA uygulaması yapıp soğuk şartlara transfer edilmiş yapraklarda apoplastik CAT ve POD aktiviteleri ölçülmüştür. Apoplastik POD aktivitesi artarken, CAT aktivitesini düştüğü tespit edilmiştir (Taşgın *et al.* 2006).

Yine aynı çalışmada, apoplastik proteinlerin SDS-PAGE çalışmaları yapılmıştır. Hem soğuk hem de SA'nın apoplastik proteinlerin sentezi ve profili üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Soğuğa dirençli kışlık buğdayda, SA'nın apoplastik proteinleri etkileyerek soğuk stresine karşı korunmada rol oynadığı belirlenmiştir. Ancak, mısır gibi soğuğa dirençli olmayan bitkilere soğuk ve salisilik asit uygulamasının apoplastik bölgede nasıl etki yaratacağı iyi bilinmemektedir (Taşgın *et al.* 2006).



MATERYAL-METOT

Kullanılan Cihazlar

İklim dolabı; Jeno Tech (Kore) ve Sanyo (Japonya), spektrofotometre; Shimadzu UVmini-1240, masa santrifüjü; Hettich EBA 21, pH metre; WTW unilab pH metre, soğutmalı santrifüj; Hettich Micro 22 R, hassas terazi; Shimadzu AY220, -80 °C derin dondurucu; Harris, İngiltere, -20 °C derin dondurucu; Arçelik, otomatik pipetler; Eppendorf, vorteks; Fısons Whirlmixer, manyetik karıştırıcı; Chiltern HS31, çalkalayıcı; Gallenkamp, vakum pompası; Edwards, İngiltere, soğuk su banyosu; Huber Polystat CC1., elektroforez; Bio Rad (dikey) Systems Power Pac 3000.

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Tez kapsamında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı ve kullanıldığı yerler aşağıda sıralanmıştır.

Hogland besi çözeltisi: 1,02 g KNO_3 , 0,492 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,23 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,49 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,86 g H_3BO_3 , 1,81 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,08 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,22 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6 mg FeSO_4 , 0,6 mg tartarik asit saf su içerisinde çözülerek hacmi 1 L'ye tamamlanır.

1 mM SA çözeltisi: 138,12 mg salisilik asit 900 mL saf suda çözülerek pH 5,5 oluncaya kadar 1 M NaOH ile titre edilir ve hacmi 1 L'ye tamamlanır.

Apoplastik proteinlerin total ekstraksiyonunda kullanılan çözelti: (20 mM CaCl_2 çözeltisi + 20 mM askorbik asit) 7,4 g askorbik asit, 5,28 g CaCl_2 saf suda çözülerek toplam hacim 2 L'ye tamamlanır.

Katalaz aktivite ölçümü için kullanılan tampon: (103 mM pH:7,5 fosfat tamponu) 1,4 g KH_2PO_4 80 mL saf suda çözülür, 1 N NaOH ile pH: 7,5'e kadar titre edilir ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Katalaz aktivite ölçümü için kullanılan substrat çözeltisi: (40 mM H_2O_2 çözeltisi) 315 μL %30'luk H_2O_2 hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanır.

Katalaz aktivite ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan çözelti: (5 mM H_2O_2 çözeltisi) %30'luk H_2O_2 'den 40 μL alınarak toplam hacim saf su ile 100 mL olacak şekilde tamamlanarak hazırlanır.

Peroksidaz aktivite ölçümü için kullanılan tampon: (50 mM M pH:5,5 fosfat tamponu) 1,77 g Na_2HPO_4 yaklaşık 240 mL saf suda çözülerek pH 5,5'e ayarlanır ve son hacmi 250 mL'ye tamamlanır.

Peroksidaz aktivite ölçümü için kullanılan substrat çözeltisi: (28 mM gayakol) 313 μL gayakol bir miktar saf suda çözülüp 100 mL olacak şekilde tamamlanarak hazırlanır.

Peroksidaz aktivite ölçümü için kullanılan substrat çözeltisi: (5 mM H_2O_2) %30'luk H_2O_2 'den 40 μL alınarak toplam hacim 100 mL olacak şekilde hazırlanır.

Süperoksit dismutaz aktivite ölçümü için kullanılan tampon: (50 mM pH:7,0 fosfat tamponu) 2,2 g K_2HPO_4 bir miktar saf suda çözülür, pH 7,0'a ayarlanır ve son hacmi 250 mL'ye tamamlanır.

13 mM metiyonin çözeltisi: 0,485 g metiyonin 250 mL fosfat tamponunda (50 mM pH:7,0) çözülerek hazırlanır.

75 μM NBT çözeltisi: 0,015 g NBT 250 mL fosfat tamponunda (50 mM pH:7,0) çözülerek hazırlanır.

0,1 mM EDTA: 0,0075 g EDTA 250 mL fosfat tamponunda (50 mM pH:7,0) çözülerek hazırlanır.

2 μM riboflavin: 1 L saf suda 0,038 g riboflavin çözülür. 3 mL reaksiyon karışımına bu çözeltiden 60 μL eklenerek 2 μM 'lık konsantrasyona ulaşılır.

Elektroforezde yığma jeli hazırlamada kullanılan tampon (pH:6,8'lik 1 M Tris-HCl): 12,1 g Tris yaklaşık 90 mL saf suda çözülerek pH'sı 6,8'e ayarlanır ve toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır.

Elektroforezde ayırma jeli hazırlamada kullanılan tampon (pH: 8,8'lik 1 M Tris-HCl): 12,1 g Tris yaklaşık 90 mL saf suda çözülerek pH'sı 8,8'e ayarlanır ve toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır.

Elektroforezde kullanılan %10'luk SDS çözeltisi: 10 g SDS 90 mL saf su içinde çözülerek hazırlanır.

Elektroforezde kullanılan %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid-0,4 g bisakrilamid 34,6 g saf suda çözülerek hazırlandı.

Elektroforezde kullanılan %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat 9 mL saf su içinde çözülerek hazırlanır.

Elektroforezde kullanılan yürütme tamponu: 7,2 g glisin ve 1,5 g Tris saf suda iyice çözülür, üzerine 5 mL % 10'luk SDS ilave edilir ve son hacim 500 mL'ye tamamlanır.

Elektroforezde kullanılan indikatör çözeltisi (% 0,1'lik bromtimol mavisini): Bromtimol mavisinde 0,1 g alınarak 16 mL 0,1 M sodyum hidroksit içerisinde çözülür ve son hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

Elektroforezde kullanılan numune tamponu: 0,5 mL 1 M Tris-HCl (pH:6,8), 1 mL %100'lük gliserin, 1 mL %0,1'lik bromtimol mavisini ve 1 mL %10'luk SDS alınır ve son hacim 10 mL'ye tamamlanır. 950 µL numune tamponuna 50 µL β-merkaptoetanol ilave edilerek kullanılır.

Jel sabitleştirme çözeltisi: 10 g TCA 40 mL saf su içerisinde çözülür ve 50 mL izopropil alkol yavaş yavaş ilave edilerek hazırlanır.

Jel boyama çözeltisi: Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,1 g) boya reaktifi metanol (50 mL) içinde iyice çözüldükten sonra, asetik asit (10 mL) ve su (40 mL) eklenerek boyama çözeltisi hazırlanır.

Boyama sonrası kullanılan yıkama çözeltisi: Asetik asit (100 mL), metanol (500 mL) ve saf su (400 mL) ile hazırlanır.

Lipid peroksidasyon aktivite ölçümünde kullanılan homojenat çözeltisi (% 0,1 lik TCA): 99,9 mL saf suda 0,1 g TCA çözülerek hazırlanır.

Lipid peroksidasyon aktivite ölçümünde kullanılan çözelti (% 0,5 lik TBA): 100 mL saf su içinde 20 g TCA çözülür sonra 0,5 g TBA ilavesiyle hazırlanır.

H₂O₂ tayininde kullanılan homojenat çözeltisi (% 0,1 lik TCA): 99,9 mL saf suda 0,1 g TCA çözülerek hazırlanır.

H₂O₂ tayininde kullanılan %5'lik Ti(SO₄)₂ çözeltisi: 19 mL saf suda 1 g Ti(SO₄)₂ çözülerek hazırlanır.

H₂O₂ miktarının belirlenmesinde kullanılan %19'luk NH₄OH: 4,16 mL NH₃ 20 mL saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır.

H₂O₂ tayininde kullanılan 2 M'lık H₂SO₄: %98'lik H₂SO₄'den 40 mL alınarak 160 mL saf su içerisine ilave edilir ve son hacim 200 mL'ye tamamlanır.

Bitkilerin Büyütülmesi

Bitki materyalleri ve büyüme

Tez kapsamında *Zea mays* cv. Osk596 ve *Zea mays* cv. Arifiye olmak üzere soğuğa hassas iki çeşit mısır kullanıldı. Mısır tohumları %96'lık etanol ile yıkandı ve sodyum hipoklorit (%5'lik) içerisinde beş dakika inkübe edilerek sterilize edildi. Sterilize edilmiş mısır tohumlarının ekimi yapıldı. Tohumlar başlangıç büyüme aşamasında kontrol olarak ayarlanan normal sıcaklıkta (22 °C/18 °C, gündüz/gece) tutuldu ve her biri günlük olarak eşit oranda saf su ile sulandı ve her birine haftada bir kez olmak üzere Hoagland besin solüsyonu uygulandı. Dokuzuncu gün bitkilere 0, 10, 100, 500 ve 1000 µM SA uygulandı. SA uygulamasından sonra soğuk+kontrol ve soğuk+SA uygulanan bitkiler kesim yapılacak 10. gün, 17. gün, 24. gün ve 31. günlerden bir gün önce 10/7 °C'lik soğuk şartlara transfer edildi. Belirlenen kesim tarihlerinde **kontrol, soğuk+kontrol ve soğuk+SA** uygulanan bitkilerde kesim işlemi yapıldı.

% Donma Hasarının Belirlenmesi

Mısır yapraklarda donma hasarı, düşük sıcaklıklara uygun su banyosu ve elektriksel iletkenlik köprüsü kullanılarak belirlenmiştir (Atıcı and Nalbantoğlu 1999a). Taze yapraklar 2 cm'lik uzunluklarda kesildi ve kesik uçlardan hücrel proteinleri uzaklaştırmak için kesitler su ile yıkandı. Yıkama işlemi sırasında kesitlerden çıkan protein varlığı 280 nm'de absorbans ölçümü ile belirlendi ve yıkamaya absorbans vermeyinceye kadar devam edildi. 0.1 g yaprak deney tüplerine yerleştirilerek tüpler bir düşük sıcaklık sirkülatörüne (LTD 6 G, Grant Instruments, Cambridge, BK) konuldu. Tüpler -1°C'de 30 dakika bekletilerek sıcaklık stabil hale geldikten sonra 1°C'lik aralıklarla -20 °C'ye kademeli olarak düşürüldü. Belirtilen her bir derece için 15 dk bekleme süresi sonunda bir tüp banyodan alınarak donmuş yaprak kesiti üzerine 4 mL HPLC dereceli su ilave edildi. Bu tüpler 24 saat 4 °C'de bekletildi. Oda sıcaklığında bir elektriksel iletkenlik köprüsü ile her bir tüpteki iyon sızıntı değeri (çözeltinin iletkenliği) (µS/cm) ölçüldü. Elde edilen iyon sızıntı değeri donma hasarını belirlemek için kullanıldı. Kontrol deneylerinin en yüksek değeri %100 donma hasarı olarak alınarak diğer değerler ile karşılaştırıldı. Her bir deney için üç tekrar yapıldı (Griffith *et al.* 1992; Taşgın *et al.* 2003).

Apoplastik Proteinlerin Ekstrakte Edilmesi

Apoplastik proteinler, Hon *et al.* (1994)'e göre yaprak dokusundan elde edildi. Mısır yaprakları (7 g) 2 cm uzunluğunda kesildi ve kesik uçlardan hücrel proteinleri uzaklaştırmak için kesitler su ile yıkandı. Yıkama işlemi sırasında kesitlerden çıkan protein

varlığı 280 nm'de absorbans ölçümü ile belirlendi ve yıkamaya absorbans vermeyinceye kadar devam edildi. Yapraklar daha sonra 30 dakika boyunca 20 mM askorbik asit-CaCl₂ çözeltisi içinde vakumlu desikatör içinde 10 dk boyunca vakum uygulandı. Yapraklar kurutuldu ve 20 ml'lik bir şırıngaya dikkatli bir şekilde dikey pozisyonda yerleştirildi. Şırıngalar santrifüj tüplerine yerleştirilerek 1500 xg'de 20 dakika santrifüjlendikten sonra apoplastik ekstrat tüplerin tabanından toplandı.

Proteinler, apoplastik ekstrata hacminin 1.5 katı soğuk aseton eklenerek ve numuneler gece boyunca -20 °C'de inkübe edilerek apoplastik ekstratlardan çöktürüldü. 20 dakika 3500 xg'de santrifüjlendikten sonra, protein çökeltileri önce %96 sonra %70 soğuk etanol ile yıkandı (Taşgın *et al.* 2003). Yıkama işleminden sonra oda sıcaklığında kurutulan protein peleti buz nükleasyonu, antioksidan enzim aktiviteleri ve elektroforez işlemleri yapılana kadar -20 °C'de muhafaza edildi (Griffith *et al.* 1992; Atıcı and Nalbatoglu 1999 a,b).

Buz Nükleasyon Aktivitesinin Belirlenmesi

Eppendorf tüplerindeki kurutulmuş protein peletleri, 1 mL HPLC dereceli suda çözöldü ve tüpler daha sonra sıcaklığı ayarlanabilen bir su banyosuna yerleştirildi. -1°C'de 30 dakika bekletilerek sıcaklık stabil hale geldikten sonra 1°C'lik aralıklarla kademeli olarak düşürüldü. Tüpler her sıcaklıkta 15 dakika beklemeye bırakıldı. Her tüpteki apoplastik protein solüsyonunun donması gözlenince su banyosundan çıkarıldı. Gözlenen donma sıcaklıkları, buz nükleasyon aktivitesi olarak kabul edildi. Tüm deneyler üç kez tekrar edildi. (Griffith *et al.* 1992; Taşgın *et al.* 2003).

Apoplastik Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Kontrol, Soğuk Kontrol ve Soğuk+SA'lı mısır yapraklarından elde edilen apoplastik protein peletleri 0,2 M pH=7,5 fosfat tamponunun 1 mL'sinde çözöldü. Apoplastik çözeltideki CAT, POD ve SOD enzim aktiviteleri spektrofotometrik ölçümlerle belirlendi. Ayrıca apoplast bölgede çalışıldığının bir göstergesi olması adına G6PD enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır.

Glukoz 6-Fosfat dehidrogenaz aktivitesinin belirlenmesi

Pentoz fosfat yolunun ilk ve kontrol noktası enzimi olan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (D-glukoz-6-fosfat; NADP⁺ oksidoredüktaz E.C. 1.1.1.49) glukoz 6-fosfatın NADP⁺/NADPH aracılığı ile 6-fosfoglukono-δ-laktona dönüşümünü katalizler (Mehta *et al.* 2000).

Apoplastik bölgede bulunmayan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz'ın hücrel bölgeden karışıp karışmadığını test etmek için bu aktivite deneyi yapılmıştır. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesi tayini 37 °C Beutler metoduna göre yapılmıştır.

340 nm'de NADPH'nin maksimum absorbans vermesi Beutler metodunun esasını oluşturur. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi katalizörlüğünde NADP⁺'nin NADPH'a indirgenmesi sırasında 340 nm gözlemlenen absorbans artışı ölçülerek enzim aktivitesi belirlenir (Beutler *et al.* 1977).

Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz aktivitesinin tayininde uygulanan prosedür şu şekildedir:

Reaktifler	Kör	Deney
1M Tris-HCl pH:8.0	250µL	250µL
0,1 M MgCl ₂	250µL	250µL
2mM NADP ⁺	250µL	250µL
Bidistile su	1450µL	1450µL
Stabilizasyon çözeltisi	50µL	-
Enzim çözeltisi	-	50µL

Reaksiyon karışımları hazırlandıktan sonra son aşamada 250 µL 6 mM G6P çözeltisi kör ve deney tüplerine ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. 37 °C'de 340 nm'de 5 dk boyunca absorbans artışı kaydedildi. Absorbans farkından mL başına enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$A = \frac{\Delta OD}{\epsilon_{340}} \times \frac{V_c}{V_e} \times S_f$$

ΔOD : absorbans değişimi (bir dk); V_c : toplam hacim; V_e :enzim çözeltisi hacmi; ϵ_{340} :NADP⁺'nin molarekstinksiyon katsayısı (6,22 M⁻¹.cm⁻¹); S_f : Seyreltme faktörü 37 °C'de ve pH: 8'de 1 µmolsubstratı ürüne dönüştüren enzim miktarı 1 EU olarak tanımlanır.

Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

CAT aktivitesi, enzim reaksiyon karışımında H₂O₂'nin kaybolması takip edilerek belirlendi (Brennan and Frenkel, 1977; Du and Bramlage, 1995). CAT, aktivite ölçüm ortamındaki H₂O₂'nin O₂ ve H₂O'ya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır. Enzim ekstraktı (0,25 mL), 103 mM fosfat

tamponu (1,475 mL) ve 40 mM H₂O₂ çözeltisi (1,5 mL) ilave edilerek toplam 3 mL küvet hacmi oluşturuldu. 240 nm'de 3 dk boyunca bir dakika aralıklı olarak köre karşı absorbans okunur. Ölçüm sonucunda dakika başına absorbans azalışı hesaplanarak standart grafikten µmol birimi türünden H₂O₂ miktarına dönüştürülür. 25 °C'de 1 dk'da 1 µmol H₂O₂'yi dönüştüren enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak tanımlanmış ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak verilmiştir (Gong *et al.* 2001). CAT aktivitesi, absorbansı 0,25 ila 2,5 mM'lik standart bir H₂O₂ eğrisine karşı karşılaştırarak belirlendi. CAT aktivitesi, H₂O₂ mM /dak /mg protein olarak sunuldu.

Reaksiyonda azalan H₂O₂ miktarını belirlemede kullanılacak olan H₂O₂ standart grafiği önceden hazırlanır. Bunun için, 5 mM H₂O₂ çözeltisinden 3 mL'lik spektrofotometre tüpüne sırasıyla; 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 mL konulur. Tüpün hacmi saf su ile 1.5 mL'ye tamamlanır ve her tüpe 1.47 mL, 103.5 mM KH₂PO₄ ve 30 µL su ilave edilir. Küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 240 nm'de absorbans köre karşı okunur. Absorbans değerlerine karşılık gelen µM H₂O₂ değerleri kullanarak standart grafik elde edilir.

Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Yapraklardaki POD (EC 1.11.1.7) aktivitesi, H₂O₂ varlığında gayakolün oksidasyonu ile test edildi. Absorbanstaki artış 470 nm'de kaydedildi (Angelini *et al.* 1989). Reaksiyon karışımı 10 µL enzim ekstresi, 500 µL 5 mM H₂O₂, 500 µL 28 mM gayakol ve 1,900 µL 50 mM fosfat tamponu (pH 5,5) içerecek şekilde hazırlanmıştır. 470 nm dalga boyunda 5 dk süresince absorbansdaki artış kaydedildi. 25 °C'de 1 dk'da 0,01 absorbans artışına neden olan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak tanımlanmış ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak verilmiştir (Ye *et al.* 2002).

Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

SOD aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich (1971) yöntemi kullanılarak nitromavi tetrazolyumun (NBT) fotokimyasal indirgenmesinin inhibisyonu ölçülerek belirlendi. Reaksiyon karışımı, 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0), 13 mM metiyonin, 0,075 mM NBT, 0,1 mM EDTA, 0,002 mM riboflavin ve 0,1 ml enzim ekstratıyla oluşturulmuştur. Tüp içindeki karışım, 15 dakika süreyle bir ışık kutusu içinde dönen bir tüp tutucu üzerine yerleştirildi. Absorbans, bir spektrofotometre ile 560 nm'de okunmuştur. Enzim ekstraktı içermeyen ve maksimum renk geliştiren tam reaksiyon karışımına sahip özdeş tüpler kontrol olarak kullanıldı. Renk gelişimi olmayan, aydınlatılmamış tam bir reaksiyon karışımı kör olarak görev yaptı. Deneysel koşullar altında, yaprak ekstraktının varlığında ve yokluğunda

560 nm'de absorbans artışıındaki farkla ölçülen ilk reaksiyon hızı, enzim miktarı ile orantılıydı. Bir birim SOD aktivitesi, 560 nm'de ölçülen NBT indirgeme oranının %50'sini inhibe etmek için gereken enzim miktarı olarak tanımlandı. Ekstrenin SOD aktivitesi, aktivite birimi/g taze ağırlık (U/g FW) olarak ifade edildi.

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Kontrol, soğuk+kontrol, soğuk+SA uygulamalı mısır yapraklarından ekstrakte edilen apoplastik proteinlerdeki değişim SDS-PAGE ile kontrol edildi (Laemmli 1970).

Elektroforez için % 3-10 kesikli SDS-poliakrilamid jeli hazırlandı. Apoplastik proteinler 100 µL numunetamponu içinde çözüldükten 3 dk boyunca kaynatılarak denatüre edilmiş ve jele tatbik edilmek üzere oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur.

Ayırma jeli; 25 mL %30'luk akrilamid-%0.8'lik bisakrilamid çözeltisi

22,5 mL 1 M'luk Tris-HCl (pH:8.8)

0,9 mL %10'luk SDS

0,6 mL %5'lik TEMED

9 mL saf su konularak karıştırılır. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL amonyum persülfat çözeltisi eklenir.

Yığma jeli; 2 mL %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid çözeltisi

2, 48 mL 0,1 M'luk Tris-HCl (pH:6.8)

0,2 mL %10'luk SDS

5 µL %5'lik TEMED

15,6 mL saf su konularak karıştırılır. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,4 mL amonyum persülfat çözeltisi eklenir.

Elektroforez için kullanılacak ayırma ve yığma jelleri belirtilen içeriklere göre hazırlandıktan sonra alkol ile iyice temizlenen cam plakalar arasına plakanın 2/3'ünü dolduracak şekilde önce ayırma jeli pipetlenir. Polimerleşme gerçekleştikten sonra plakalar arasında kalan kısım yığma jeli ile tamamlanır ve kuyuların oluşması için tarak yerleştirilir. Yığma jelinin polimerleşmesi tamamlanınca tarak dikkatli bir şekilde çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirilir. Elde edilen kuyular yürütme tamponu ile yıkandıktan sonra plakalar arası boşluğa ve tanka yürütme tamponu doldurulur.

Denatüre edilmiş protein numuneleri kuyuların 2/3'ünü dolduracak şekilde jelin kuyularına tatbik edilir. Standart protein çözeltisi de aynı şekilde tatbik edilir. Elektroforez tankı güç kaynağına bağlanarak numuneler önce 120 voltta 30 dk sonra 200 voltta yaklaşık 4-5 saat yürütülür. Numuneler jelin sonuna kadar yürüdüğünde akım kesilerek jel camlar arasından dikkatlice çıkarılır ve 45 dakika sabitleme çözeltisinde çalkalamaya bırakılır. Daha sonra, 2 saat boyunca jel boyama çözeltisinde çalkalanır. Boyama işlemi sonrası jel protein bantları iyice belirginleşinceye kadar yıkama çözeltisi ile tekrar tekrar yıkanır. Protein bantları belirginleştikten sonra jelin fotoğrafı çekilir.

Lipid peroksidasyon aktivitesinin belirlenmesi

Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) analiz edilmiştir. Mısır yaprakları (0,1 g), % 0,1 triklorasetik asit içinde öğütüldü ve 10.000 x g'de 15 dakika 4 °C'de santrifüjlendi. 0,5 mL'lik süpernatanta 0,5 mL tampon ve 1 mL reaktif (% 0.5 tiyobarbitürik asit, %20 TCA içinde TBA, w/v) ilave edildi. Karışım 95 °C'de 30 dakika inkübe edildi, daha sonra soğutuldu ve 10,000xg'de 5 dakika santrifüjlendi. MDA'nın absorbansı 532 nm'de kaydedilerek ve 600 nm'de spesifik olmayan absorpsiyondan çıkarıldı. 1 mL çözeltideki MDA miktarı;

$$MDA \left(\frac{nmol}{mL} \right) = \frac{(A_{532} - A_{600})}{15500} \times 10^6$$

formülüyle hesaplandı. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde verildi (Ananieva *et al.* 2002).

H₂O₂ miktarının belirlenmesi

H₂O₂ miktarını belirlenmek için 10 mL soğuk aseton içinde 0,5 g mısır yaprağı homojenize edilmiş sonra homojenat 10 dk 10.000 xg'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantdan 1,5 mL alınarak üzerine 0,15 mL %5'lik Ti(SO₄)₂ ve 0,3 mL %19'luk NH₄OH eklenerek 10 dk 10.000 xg'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen çökelek 3 mL 2 M'lık H₂SO₄ içinde çözülerek 410 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Üç tekrar sonrası elde edilen ortalama absorbans değerleri standart grafikten ng H₂O₂ miktarına dönüştürülmüştür. Sonuçlar g yaprak başına düşen H₂O₂ miktarı (ng/g yaprak) olarak verilmiştir (He *et al.* 2005).

Standart grafik eldesi için, 3 mM %35'lik H₂O₂ çözeltisi ile hazırlanan stok çözeltiden 3,6; 7,2; 10,8; 14,4; 18,0; 21,6; 25,2; 28,8; 32,4 ve 36 ng olacak şekilde tüplere konulmuş ve hacimleri aseton ile 1,5 mL'ye tamamlanmıştır. Her tüpe 0,15 mL %5'lik Ti(SO₄)₂ ve 0,3 mL %19'luk NH₄OH ilave edilmiştir. Daha sonra karışım 10 dk 10.000 xg'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen çökelek 2 M 3 mL H₂SO₄ içinde

özölerek absorbands 410 nm'de köre karşı okunmuştur. Absorbans değlerlerine karşılık gelen ng H₂O₂ değleri kullanılarak standart grafik çizilmiştir.

Endojen SA içeriğinin ekstraksiyonu ve belirlenmesi

SA, Raskin ve diğerlerinin yöntemine göre taze bitki dokusundan bazı değışikliklerle ekstre edildi (1989). Yapraklar (0,5 g), bir homojenleştirici ile 3 mL %90 metanol içinde homojenleştirildi ve 12.000 × g'de 15 dk santrifüjlendi. Süpernatantlar, döner bir buharlaştırıcı ile 68 °C'de 5 dakika süreyle buharlaştırıldı. Tortu, 2,5 mL %5 TCA içerisinde çözüldü ve 12.000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi. 5 mL etilasetat, siklopentan ve ispropanol karışımı (100:99:1, v:v:v) süpernatanta eklendi. Süpernatant 90 °C'de 10 dk buharlaştırıldı. Tortu, 2.5 mL %20 metanol içinde çözüldü, 45 µm şırınga filtresiyle süzöldü ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemine enjekte edildi (100 µL). SA, alıkonma sürelerinin gerçek standartlarla karşılaştırılmasıyla belirlendi. Standart çözeltilerle, daha sonra kromatogramlarda karşılık gelen konsantrasyonları değlendirmek için kullanılan SA için kalibrasyon eğrileri yapıldı. Bileşğin pik alanları, Shimadzu LC solüsyon Yazılımı ile ölçöldü (Kadioğlu *et al.* 2011).

ARAşTIRMA BULGULARI

Donma Hasarı Sonuçları

Normal şartlarda (22/18 °C) büyütölen mısır (*Zea mays* cv. Hibrit) fidelerine 9. gün 0,0 mM (kontrol), 0,01 mM, 0,1 mM, 0,5mM ve 1 mM salisilik asit (SA) uygulanmış ve bitkiler kesim tarihlerinden bir gün önce (9.gün, 16.gün, 23.gün ve 30. gün) soğuk şartlara (10/7 °C) transfer edilmiştir. Bir gün soğuk şartlarda kaldıktan sonra bitki yapraklarından (10. gün, 17. gün, 24. gün ve 31. gün) örnekler alınmıştır. Alınan yapraklarda belirlenen donma hasarı değerleri çizelge ve şekillerle sunulmuştur.

Elde edilen verilere bakıldığın da hasattan önce uygulanan SA'nın donma hasarı üzerinde etkili olduğu görölmektedir. Bu etki, mısır yapraklarının büyüme süresine, çeşidine ve SA'nın konsantrasyonuna göre değişmiştir. Bu sebeple veriler ayrı ayrı değerlendirilecektir.

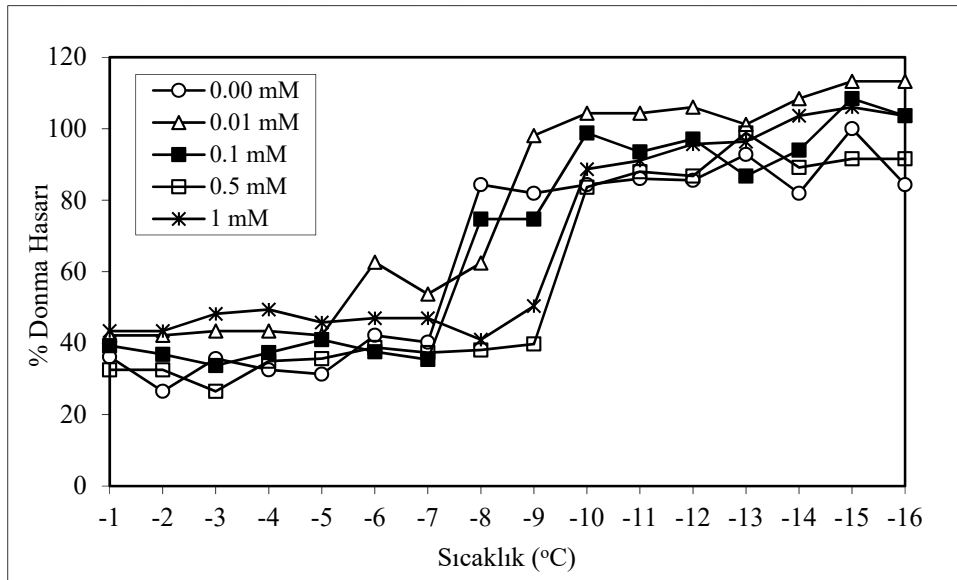
Hibrit çeşidinin donma hasarı sonuçları

10 günlük mısır (Hibrit) yapraklarından elde edilen donma hasarı verileri

Normal şartlarda (22/18 °C) büyütölen mısır (*Zea mays* cv.Hibrit) fidelerine 9. gün 0,0 mM (kontrol), 0,01 mM, 0,1 mM, 0,5 mM ve 1 mM Salisilik asit (SA) uygulanmış ve bitkiler soğuk şartlara (10/7 °C) transfer edilmiştir. Bir gün soğuk şartlarda kaldıktan sonra bitki yapraklarından örnekler alınmıştır. Alınan yapraklarda belirlenen donma hasarı sonuçları aşağıdaki çizelge ve şekilde verilmiştir.

Tablo 1.10 Günlük Mısır (Hibrit) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları

Sıcaklık (°C)	SA	İyon İletkenliği ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)					Donma Hasarı (%)				
		0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L	0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L
-1		150	175	163	135	180	36	42	39	33	43
-2		110	175	153	135	180	27	42	37	33	43
-3		148	180	140	110	200	36	43	34	27	48
-4		135	180	155	145	205	33	43	37	35	49
-5		130	175	170	148	190	31	42	41	36	46
-6		175	260	156	161	195	42	63	38	39	47
-7		167	223	147	155	195	40	54	35	37	47
-8		350	259	310	158	170	84	62	75	38	41
-9		340	407	310	165	209	82	98	75	40	50
-10		350	433	410	347	368	84	104	99	84	89
-11		357	433	388	365	378	86	104	94	88	91
-12		355	440	403	360	397	86	106	97	87	96
-13		385	420	360	410	400	93	101	87	99	96
-14		340	450	390	370	430	82	108	94	89	104
-15		415	470	450	380	440	100	113	108	92	106
-16		350	470	430	380	430	84	113	104	92	104

**Şekil 1.** 10 günlük mısır (Hibrit) yapraklarının donma hasarı yüzdeleri

10. günde hasat edilen hibrit mısır yapraklarının donma hasarı sonuçlarına bakıldığında genel olarak SA uygulamasının etkisi görülmekle beraber 0,5 ve 1 mM SA'nın daha etkili olduğu belirlenmiştir. Örneğin soğuk uygulanmış SA'sız bitki yapraklarında donma hasarı yüzdesi, -8 °C de %84 iken 0,5 ve 1mM SA uygulanmış yapraklarda sırasıyla

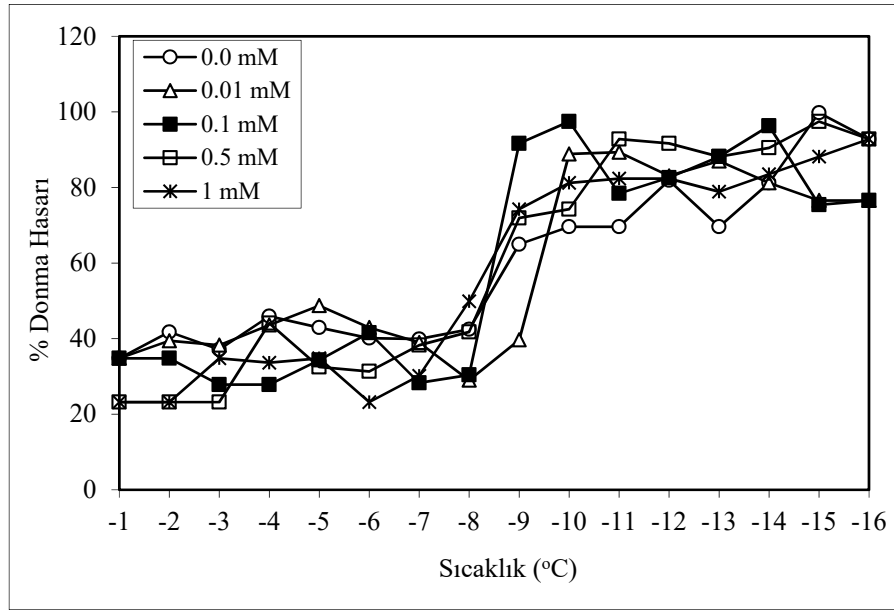
%38 ve % 41'e düşmüştür. Aynı durum bir derece daha soğumuş durumda da görülmektedir. -9 °C de soğuk kontrol bitki yapraklarının donma hasarı %82 olurken 0,5 mM SA uygulanmış yapraklarda %40, 1mM SA uygulanmış yapraklarda ise %50 ye inmiştir. Uygulanan düşük SA konsantrasyonlarının ise etkili olmadığı belirlenmiştir.

17 günlük mısır (Hibrit) yapraklarından elde edilen donma hasarı verileri

Normal şartlarda (22/18 °C) büyütülen mısır (*Zea mays* cv.Hibrit) fidelerine 9. gün 0,0 mM (kontrol), 0,01 mM, 0,1 mM, 0,5 mM ve 1 mM Salisilik asit (SA) uygulanmış ve bitkiler soğuk şartlara (10/7 °C) transfer edilmiştir. Bir gün soğuk şartlarda kaldıktan sonra bitki yapraklarından örnekler alınmıştır. Alınan yapraklarda belirlenen donma hasarı sonuçları aşağıdaki çizelge ve şekilde verilmiştir.

Tablo 2. 17 Günlük Mısır (Hibrit) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları

Sıcaklık (°C)	İyon İletkenliği (µS.cm ⁻¹)					Donma Hasarı (%)				
	0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L	0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L
-1	150	150	150	100	100	35	35	35	23	23
-2	180	170	150	100	100	42	39	35	23	23
-3	160	165	120	100	150	37	38	28	23	35
-4	198	188	120	190	145	46	44	28	44	34
-5	185	210	148	140	150	43	49	34	32	35
-6	173	185	179	135	100	40	43	42	31	23
-7	172	168	122	165	130	40	39	28	38	30
-8	183	125	131	180	215	42	29	30	42	50
-9	280	171	395	310	320	65	40	92	72	74
-10	300	383	420	320	350	70	89	97	74	81
-11	300	385	338	400	355	70	89	78	93	82
-12	353	358	356	395	355	82	83	83	92	82
-13	300	375	380	380	340	70	87	88	88	79
-14	350	350	415	390	360	81	81	96	90	84
-15	430	330	325	420	380	100	77	75	97	88
-16	400	330	330	400	400	93	77	77	93	93



Şekil 2.17 17 günlük mısır (Hibrit) yapraklarının donma hasarı yüzdeleri

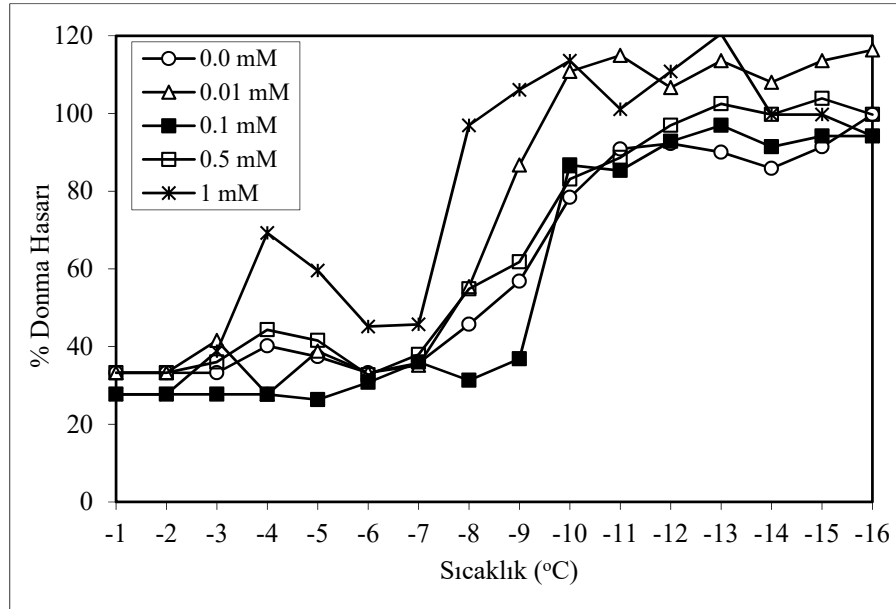
17. günde hasat edilen hibrit mısır yapraklarının donma hasarı sonuçlarına bakıldığında SA'nın bariz bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Ancak 17 günlük bitki yaprakları 10 günlüklerle kıyaslandığında da bitkinin kendisini toparlayabilmesi için kritik bir değer olarak alınan % 50'lik donma hasarına ulaşması gecikmiştir. Yine buna paralel olarak başlangıç donma hasarlarının ve tüm sıcaklıklarda ki donma hasarlarının ortalaması alındığında 17 günlük yaprakların hasarının 10 günlüklere oranla daha az olduğu görülmektedir.

24 günlük mısır (Hibrit) yapraklarından elde edilen donma hasarı sonuçları

Normal şartlarda (22/18 °C) büyütülen mısır (*Zea mays* cv.Hibrit) fidelerine 9. gün 0,0 mM (kontrol), 0,01 mM, 0,1 mM, 0,5 mM ve 1 mM salisilik asit (SA) uygulanmış ve bitkiler soğuk şartlara (10/7 °C) transfer edilmiştir. Bir gün soğuk şartlarda kaldıktan sonra bitki yapraklarından örnekler alınmıştır. Alınan yapraklarda belirlenen donma hasarı değerleri aşağıdaki Tablo ve Şekil'de sunulmuştur.

Tablo 3. 24 Günlük Mısır (Hibrit) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları

Sıcaklık (°C)	İyon İletkenliği (μS.cm ⁻¹)					Donma Hasarı (%)					
	SA	0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L	0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L
-1		120	120	100	120	100	33	33	28	33	28
-2		120	120	100	120	100	33	33	28	33	28
-3		120	150	100	130	140	33	42	28	36	39
-4		145	100	100	160	250	40	28	28	44	69
-5		135	140	95	150	215	37	39	26	42	60
-6		120	120	111	118	163	33	33	31	33	45
-7		129	127	130	137	165	36	35	36	38	46
-8		165	200	113	198	350	46	55	31	55	97
-9		205	313	133	223	383	57	87	37	62	106
-10		283	400	313	300	410	78	111	87	83	114
-11		328	415	308	320	365	91	115	85	89	101
-12		333	385	335	350	400	92	107	93	97	111
-13		325	410	350	370	435	90	114	97	102	120
-14		310	390	330	360	360	86	108	91	100	100
-15		330	410	340	375	360	91	114	94	104	100
-16		360	420	340	360	340	100	116	94	100	94

**Şekil 3.** 24 günlük mısır (Hibrit) yapraklarının donma hasarı yüzdeleri

24. günde hasat edilen hibrit mısır yapraklarının donma hasarı sonuçlarına bakıldığında SA'nın 0,5 ve 1 mM konsantrasyonlarının da hemen hemen tüm sıcaklıklarda donma hasarını arttırdığı görülmektedir. 0,01 mM'lık uygulama etkisiz görünürken, 0,1 mM

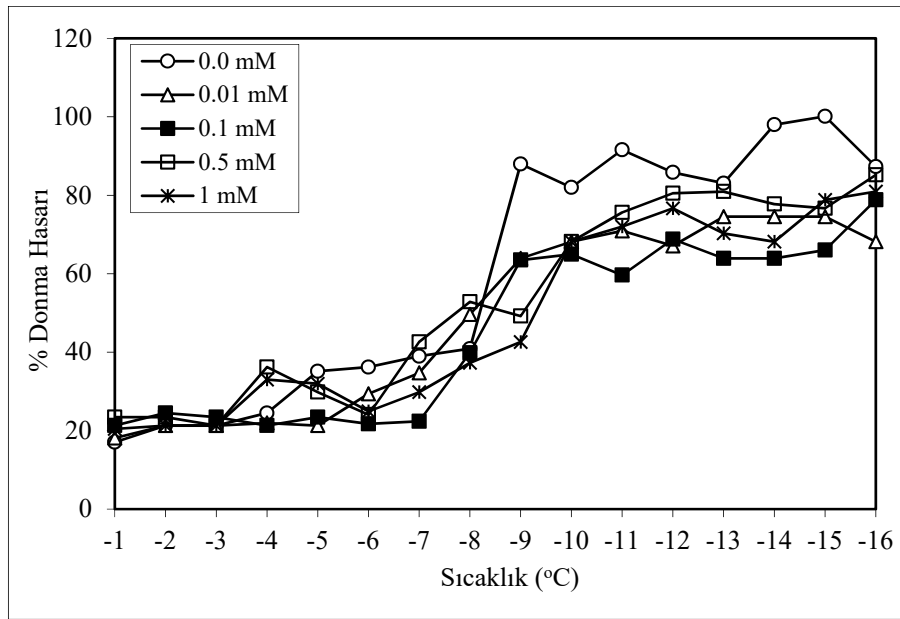
uygulamada ise donma hasarının azaltıldığı ve geciktirildiği görülmektedir. Örneğin -9 °C’de soğuk kontrol bitkisinin donma hasarı %57, 1mM uygulamalı yaprakların %106 olmasına karşın, 0,1 mM lık yaprakların hasarının %37 olduğu görülmektedir.

31 günlük mısır (Hibrit) yapraklarından elde edilen donma hasarı verileri

Normal şartlarda (22/18 °C) büyütülen mısır (*Zea mays* cv.Hibrit) fidelerine 9. gün 0,0 mM (kontrol), 0,01 mM, 0,1 mM, 0,5 mM ve 1 mM Salisilik asit (SA) uygulanmış ve bitkiler soğuk şartlara (10/7 °C) transfer edilmiştir. Bir gün soğuk şartlarda kaldıktan sonra bitki yapraklarından örnekler alınmıştır. Alınan yapraklarda belirlenen donma hasarı değerleri aşağıdaki Tablo ve Şekil’de sunulmuştur.

Tablo 4. 31 Günlük Mısır (Hibrit) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları

Sıcaklık (°C) SA	İyon İletkenliği ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)					Donma Hasarı (%)				
	0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L	0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L
-1	80	85	100	110	96	17	18	21	23	20
-2	100	100	115	110	100	21	21	24	23	21
-3	100	100	110	100	100	21	21	23	21	21
-4	115	103	100	170	155	24	22	21	36	33
-5	165	100	110	140	150	35	21	23	30	32
-6	170	138	102	113	117	36	29	22	24	25
-7	183	163	105	200	140	39	35	22	43	30
-8	192	233	187	248	175	41	50	40	53	37
-9	413	300	298	231	200	88	64	63	49	43
-10	385	320	305	320	320	82	68	65	68	68
-11	430	333	280	355	338	92	71	60	76	72
-12	403	315	323	378	360	86	67	69	81	77
-13	390	350	300	380	330	83	75	64	81	70
-14	460	350	300	365	320	98	75	64	78	68
-15	470	350	310	360	370	100	75	66	77	79
-16	410	320	370	400	380	87	68	79	85	81



Şekil 4. 31 günlük mısır (Hibrit) yapraklarının donma hasarı yüzdeleri

31. günde hasat edilen hibrit mısır yapraklarının donma hasarı sonuçlarına bakıldığında SA uygulamalarının tüm konsantrasyonlarda donma hasarını azaltmada etkili olduğu görülmektedir. Grafikte görüldüğü üzere -8 °C den sonraki sıcaklıkların tümünde SA uygulamalı yaprakların donma hasarı yüzdesinin SA sız soğuk kontrol bitkisine göre daha düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca 31. günde hasat edilen mısır yapraklarının -1 °C’deki başlangıç donma hasarlarının ortalamasının diğer günlerdeki ortalamaların tümünden daha düşük olduğu görülmektedir.

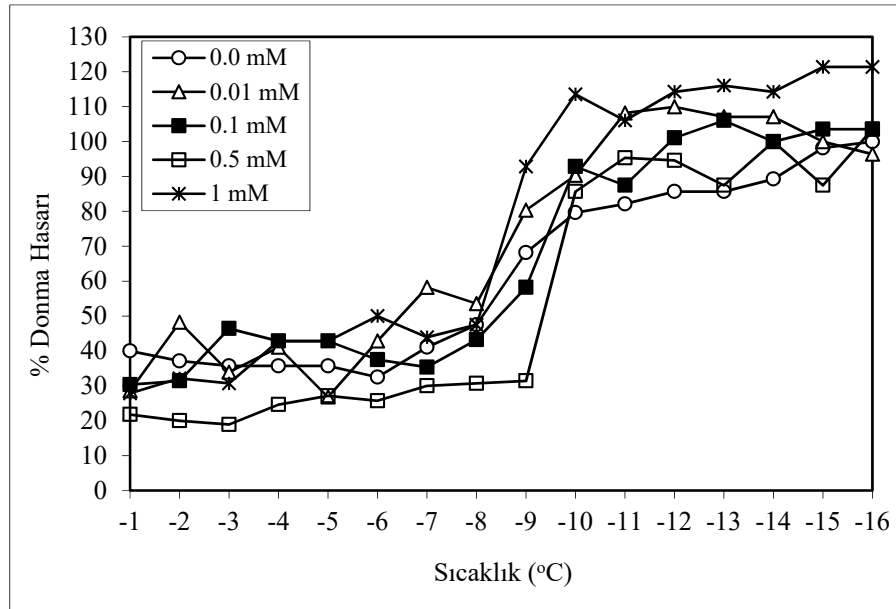
Arifiye çeşitinin donma hasarı sonuçları

10 günlük mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen donma hasarı sonuçları

Normal şartlarda (22/18 °C) büyütülen mısır (*Zea mays cv.Arifiye*) fidelerine 9. gün 0,0 mM (kontrol), 0,01 mM, 0,1 mM, 0,5 mM ve 1 mM Salisilik asit (SA) uygulanmış ve bitkiler soğuk şartlara (10/7 °C) transfer edilmiştir. Bir gün soğuk şartlarda kaldıktan sonra bitki yapraklarından örnekler alınmıştır. Alınan yapraklarda belirlenen donma hasarı değerleri aşağıdaki Tablo ve şekilde sunulmuştur.

Tablo 5. 10 Günlük Mısır (Arifiye) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları

Sıcaklık (°C) SA	İyon İletkenliği ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)					Donma Hasarı (%)				
	0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L	0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L
-1	112	80	85	61	78	40	29	30	22	28
-2	104	135	88	56	90	37	48	31	20	32
-3	100	95	130	53	86	36	34	46	19	31
-4	100	115	120	69	120	36	41	43	25	43
-5	100	75	120	76	120	36	27	43	27	43
-6	91	120	105	72	140	32	43	37	26	50
-7	115	163	99	84	123	41	58	35	30	44
-8	133	150	121	86	133	47	54	43	31	47
-9	191	225	163	88	260	68	80	58	31	93
-10	223	253	260	240	318	80	90	93	86	114
-11	230	303	245	267	297	82	108	87	95	106
-12	240	308	283	265	320	86	110	101	95	114
-13	240	300	297	245	325	86	107	106	87	116
-14	250	300	280	280	320	89	107	100	100	114
-15	275	280	290	245	340	98	100	104	87	121
-16	280	270	290	290	340	100	96	104	104	121

**Şekil 5.** 10 Günlük Mısır (Arifiye) Yapraklarının Donma Hasarı Yüzdeleri

10. günde hasat edilen arifiye bitkisinin yapraklarından elde edilen donma hasarı sonuçlarına bakıldığında, hem tüm değerlerin ortalamasında hem de donma hasarını geciktirme açısından en etkili konsantrasyonun 0,5 mM olduğu görülmektedir. Örneğin SA'

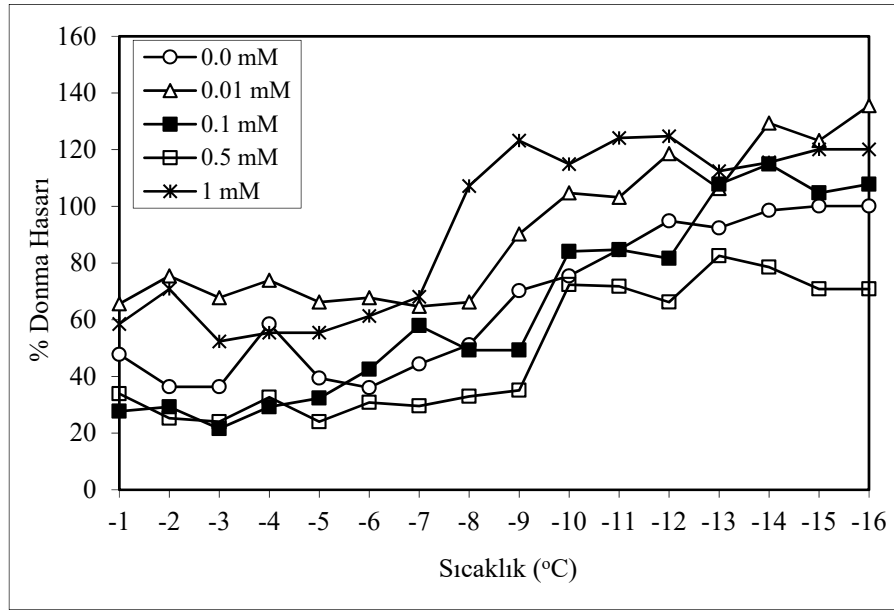
sız soğuk kontrol bitkisinin -9 °C de hasarı %68 iken 0,5 mM SA uygulamalı yapraklarda hasar %31 seviyesine düşmüştür. Arifiyenin 10 günlük donma hasarlarının ortalaması diğer günlerle kıyaslandığında ise en düşük ortalama sahip olduğu görülmektedir. Bir başka ifade ile yetiştirme günü arttıkça aynı şartlarda ölçülen donma hasarları artmaktadır. 10 günlük arifiye ile 10 günlük hibrit yapraklarında ki hasar karşılaştırıldığında ise birbirine çok yakın görünmektedir.

17 günlük mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen donma hasarı sonuçları

Normal şartlarda (22/18 °C) büyütülen mısır (***Zea mays cv.Arifiye***) fidelerine 9. gün 0,0 mM (kontrol), 0,01 mM, 0,1 mM, 0,5 mM ve 1 mM Salisilik asit (SA) uygulanmış ve bitkiler soğuk şartlara (10/7 °C) transfer edilmiştir. Bir gün soğuk şartlarda kaldıktan sonra bitki yapraklarından örnekler alınmıştır. Alınan yapraklarda belirlenen donma hasarı değerleri aşağıdaki Tablo ve Şekil’de sunulmuştur.

Tablo 6. 17 Günlük Mısır (Arifiye) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları

Sıcaklık (°C)	SA	İyon İletkenliği (µS.cm ⁻¹)					Donma Hasarı (%)				
		0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L	0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L
-1		155	213	90	110	190	48	66	28	34	59
-2		118	245	95	82	230	36	75	29	25	71
-3		118	220	70	78	170	36	68	22	24	52
-4		190	240	95	106	180	59	74	29	33	55
-5		128	215	105	78	180	39	66	32	24	55
-6		117	220	138	100	199	36	68	43	31	61
-7		144	210	188	96	221	44	65	58	30	68
-8		166	215	160	107	348	51	66	49	33	107
-9		228	293	160	114	400	70	90	49	35	123
-10		245	340	273	235	373	75	105	84	72	115
-11		275	335	275	233	403	85	103	85	72	124
-12		308	385	265	215	405	95	119	82	66	125
-13		300	345	350	268	365	92	106	108	83	112
-14		320	420	373	255	375	99	129	115	79	116
-15		325	400	340	230	390	100	123	105	71	120
-16		325	440	350	230	390	100	136	108	71	120



Şekil 6.17 17 Günlük Mısır (Arifiye) Yapraklarının Donma Hasarı Yüzdeleri

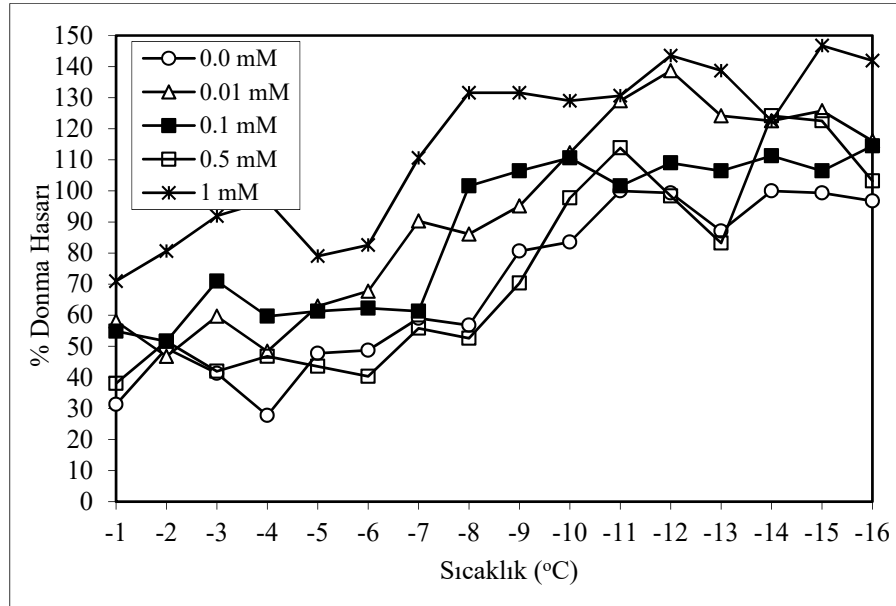
17. günde hasat edilen arifiye bitkisinin yapraklarından elde edilen donma hasarı sonuçlarına bakıldığında yine 0,5 mM SA uygulamasının en etkili konsantrasyon olduğu görülmektedir. Hem donma hasarını düşürmüş hemde geciktirmiştir. Örneğin -9 °C’de SA’sız soğuk kontrol bitkisinin donma hasarı %70 iken, 0,5 mM SA uygulamalı yaprakların donma hasarı %35’e düşmüştür. 0,01 ve 1 mM SA uygulamalı yaprakların hasarlarının kontrolün üzerinde olduğu da grafikten görülmektedir. 17 günlük yaprakların donma hasarı ortalamaları 10 günlük yaprakların ortalamaları ile karşılaştırıldığında hibrit yapraklarında ki düşüşün aksine bir artış olduğu görülmektedir. 17 günlük arifiye yapraklarının ortalama hasarı ile 17 günlük hibrit yapraklarının ortalama hasarı karşılaştırıldığında arifiye çeşidinin hasarının bariz fazla olduğu görülmektedir.

24 günlük mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen donma hasarı sonuçları

Normal şartlarda (22/18 °C) büyütülen mısır (*Zea mays* cv.Arifiye) fidelerine 9. gün 0,0 mM (kontrol), 0,01 mM, 0,1 mM, 0,5 mM ve 1 mM Salisilik asit (SA) uygulanmış ve bitkiler soğuk şartlara (10/7 °C) transfer edilmiştir. Bir gün soğuk şartlarda kaldıktan sonra bitki yapraklarından örnekler alınmıştır. Alınan yapraklarda belirlenen donma hasarı değerleri aşağıdaki Tablo ve Şekil’de sunulmuştur.

Tablo 7. 24 Günlük Mısır (Arifiye) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları

Sıcaklık (°C) SA	İyon İletkenliği ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)					Donma Hasarı (%)				
	0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L	0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L
-1	97	180	170	118	220	31	58	55	38	71
-2	153	145	160	160	250	49	47	52	52	81
-3	128	185	220	130	285	41	60	71	42	92
-4	86	150	185	145	300	28	48	60	47	97
-5	148	195	190	135	245	48	63	61	44	79
-6	151	210	193	125	256	49	68	62	40	83
-7	183	280	190	173	343	59	90	61	56	111
-8	176	267	315	163	408	57	86	102	53	132
-9	250	295	330	218	408	81	95	106	70	132
-10	259	348	343	303	400	84	112	111	98	129
-11	310	400	315	353	405	100	129	102	114	131
-12	308	430	338	305	445	99	139	109	98	144
-13	270	385	330	258	430	87	124	106	83	139
-14	310	380	345	385	380	100	123	111	124	123
-15	308	390	330	380	455	99	126	106	123	147
-16	300	360	355	320	440	97	116	114	103	142

**Şekil 7. 24** Günlük Mısır (Arifiye) Yapraklarının Donma Hasarı Yüzdeleri

24. günde hasat edilen arifiye bitkisinin yapraklarından elde edilen donma hasarı sonuçlarına bakıldığında yine etkili konsantrasyonun 0,5 mM olduğu grafikten görülmektedir. Diğer konsantrasyonların donma hasarlarının kontrole göre daha yüksek olduğu

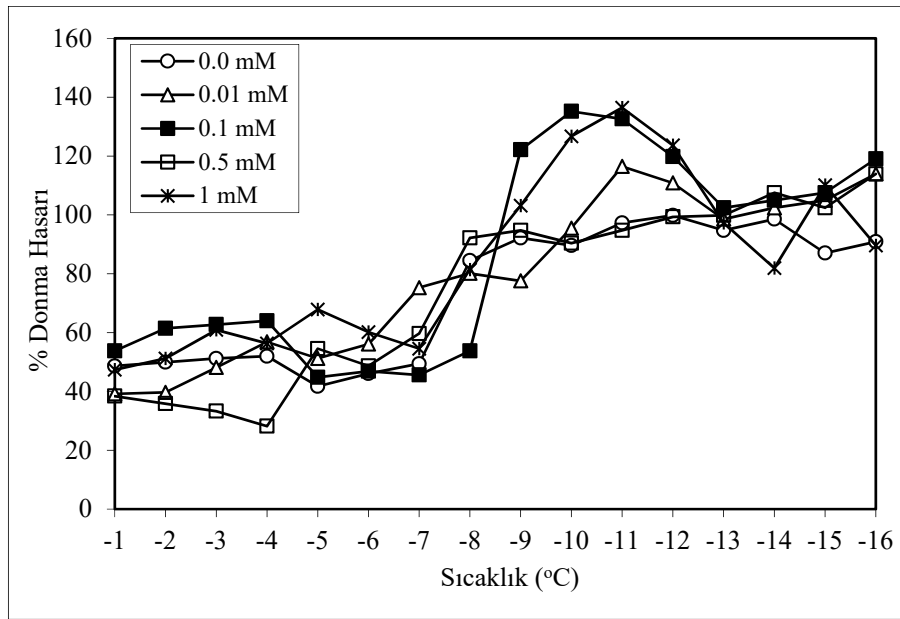
görülmektedir. 24 günlük yapraklardaki başlangıç donma hasarı değerlerinin 17 günlük yaprakların hasarlarıyla karşılaştırıldığında da daha yüksek olduğu görülmektedir. 24 günlük arifiye yapraklarının hasarlarının ortalamaları, 24 günlük hibrit yapraklarının hasarlarının ortalamaları ile karşılaştırıldığında ise arifiye yapraklarındaki hasarın daha yüksek olduğu görülmektedir.

31 günlük mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen donma hasarı sonuçları

Normal şartlarda (22/18 °C) büyütülen mısır (*Zea mays* cv.Arifiye) fidelerine 9. gün 0,0 mM (kontrol), 0,01 mM, 0,1 mM, 0,5 mM ve 1 mM Salisilik asit (SA) uygulanmış ve bitkiler soğuk şartlara (10/7 °C) transfer edilmiştir. Bir gün soğuk şartlarda kaldıktan sonra bitki yapraklarından örnekler alınmıştır. Alınan yapraklarda belirlenen donma hasarı değerleri aşağıdaki Tablo ve Şekil’de sunulmuştur.

Tablo 8. 31 Günlük Mısır (Arifiye) Yapraklarının Donma Hasarı Sonuçları

Sıcaklık (°C)	SA	İyon İletkenliği (µS.cm ⁻¹)					Donma Hasarı (%)				
		0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L	0,0 mmol/L	0,01 mmol/L	0,1 mmol/L	0,5 mmol/L	1,0 mmol/L
-1		190	153	210	150	185	49	39	54	38	47
-2		195	155	240	140	200	50	40	61	36	51
-3		200	188	245	130	238	51	48	63	33	61
-4		203	222	250	110	220	52	57	64	28	56
-5		163	200	175	213	265	42	51	45	55	68
-6		180	219	183	190	235	46	56	47	49	60
-7		193	294	178	233	213	49	75	46	60	55
-8		330	313	210	360	318	84	80	54	92	81
-9		360	303	477	370	403	92	78	122	95	103
-10		350	373	528	353	495	90	95	135	90	127
-11		380	455	518	370	533	97	116	133	95	136
-12		390	433	468	388	483	100	111	120	99	124
-13		370	385	400	390	380	95	99	102	100	97
-14		385	400	410	420	320	99	102	105	108	82
-15		340	410	420	400	430	87	105	108	102	110
-16		355	445	465	445	350	91	114	119	114	90



Şekil 8. 31 günlük mısır (Arifiye) yapraklarının donma hasarı yüzdeleri

31. günde hasat edilen arifiye bitkisinin yapraklarından elde edilen donma hasarı sonuçlarına bakıldığında çok bariz etkisi olmamakla birlikte etkili konsantrasyonun yine 0,5 mM olduğu görülmekte ve diğer konsantrasyonların donma hasarını azaltmada etkili olmadığı görülmektedir. 31 günlük yaprakların başlangıç hasarları ile 24 günlüklerin ki kıyaslandığında 31 günlüklerde bir miktar azalma olduğu görülmektedir. 31 günlük arifiye yapraklarının ortalama donma hasarları ile 31 günlük hibrit yapraklarının ortalama donma hasarları karşılaştırıldığında ise yine arifiye yapraklarındaki hasarın bariz fazla olduğu görülmektedir. Donma hasarı sonuçları açısından değerlendirildiğinde de hibrit mısır yapraklarının arifiye yapraklarına göre soğuğa daha dayanıklı olduğu söylenebilir.

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz Enzim Aktivitesinin Sonuçları

Birkaç defa tekrerr edilmesine rağmen apoplastik bölge ekstraktında glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi gözlenmemiştir. Hücre içerisinde bulunan bu enzimin aktivite göstermemesi, yapılan ekstraksiyonun sadece apoplastik bölge içeriğini özütlediğini ispatlamaktadır.

Buz Nükleasyon Aktivitesi Sonuçları

Mısır (Hibrit) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları

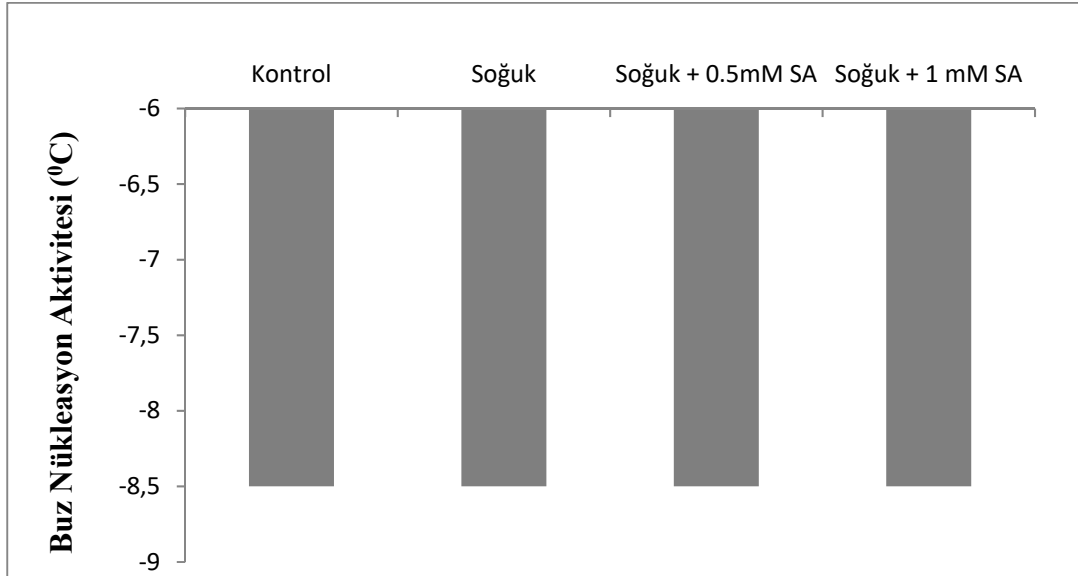
Belirlenen donma noktası ortalamaları, buz nükleasyon aktivitesi olarak Tablo 9 ve Şekil 9-12’de sunulmuştur.

Tablo 9. Mısır (Hibrit) Yaprak Apoplastından Ekstrakte Edilen Proteinlerin Buz Nükleasyon Aktivitesi Sonuçları (°C)

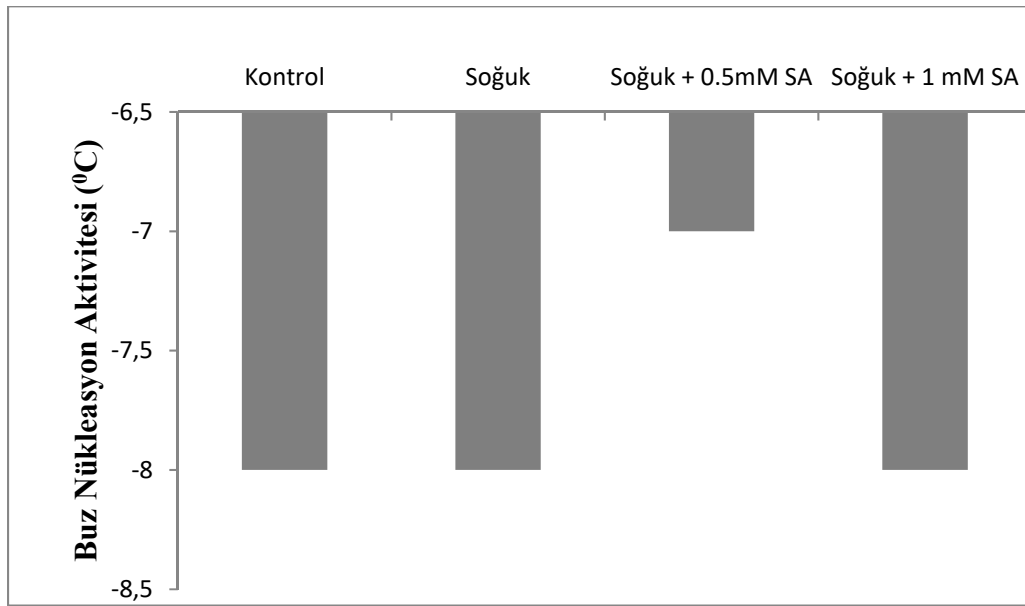
Uygulama Gün	10	17	24	31
Kontrol	-8.5 c	-8 d	-8 d	-8 d
Soğuk Kontrol	-8.5 c	-8 d	-8 d	-8 d
Soğuk + 0,5mM SA	-8.5 c	-7 e	-9.5 b	-10 a
Soğuk + 1 mM SA	-8.5 c	-8 d	-9.5 b	-8.5 c

*Tabloda Duncan Testine göre anlamlı veriler farklı harflerle gösterilmiştir (P<0.05).

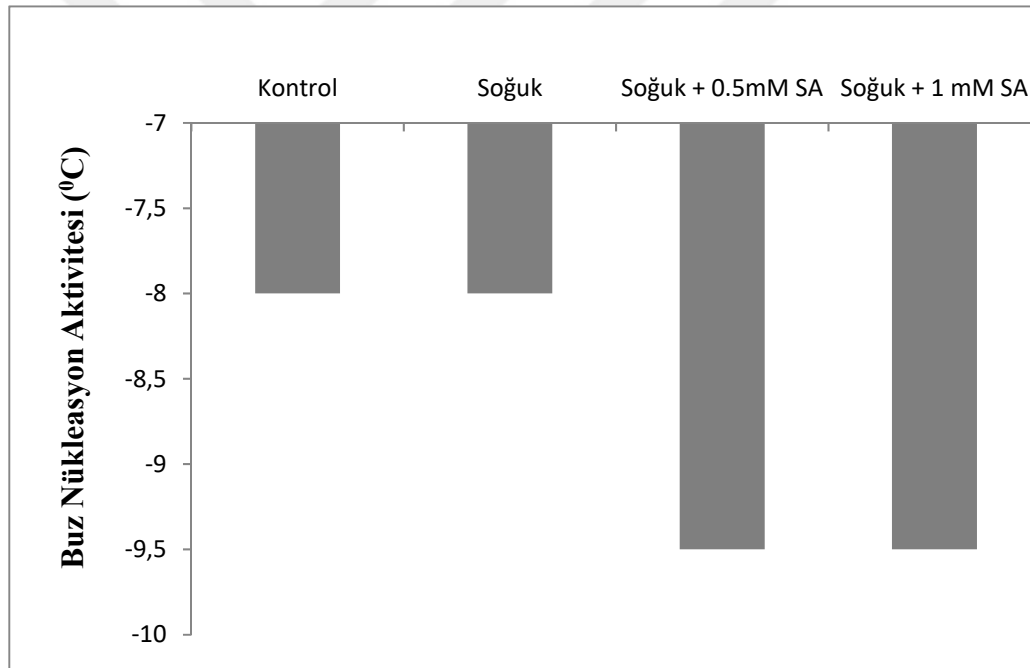
Tüm günlerdeki apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitelerine bakıldığında soğuk uygulamasının hibrit yaprakların da kontrole göre aktiviteyi değiştirmedığı görülmektedir. 24 ve 31 günlük bitkilerde ise SA uygulanmış yapraklardaki aktiviteler soğuğa kıyasla artmıştır (P<0,05). 24 günlük bitkilerde hem 0,5 mM hemde 1 mM lık SA uygulamaları aktiviteyi %18,75 artırırken, 31 günlük bitkilerde ise 0,5 mM lık SA uygulaması aktiviteyi %25 artırmış 1 mM' lık SA uygulaması ise aktiviteyi %6,25 oranında artırabilmiştir. Ancak 10 günlük bitki yaprakların da hem soğuk hem de SA uygulaması aktiviteyi etkilememiştir. 17 günlük bitkide ise 0,5 mm SA uygulaması donma noktasını ortalama 1 derece yükseltmiş, 1mM SA uygulamasının ise etkisiz olduğu görülmektedir.



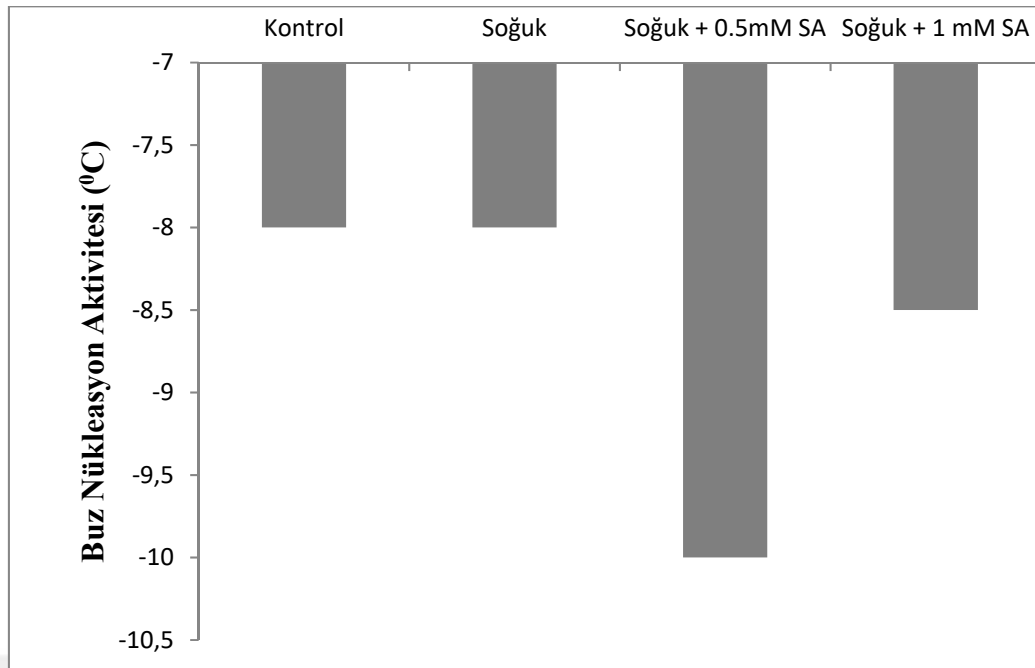
Şekil 9. 10 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları



Şekil 10. 17 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları



Şekil 11. 24 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları



Şekil 12. 31 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları

Mısır (Arifiye) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları

Belirlenen donma noktası ortalamaları, buz nükleasyon aktivitesi olarak Tablo 10 ve Şekil 13-16'de sunulmuştur.

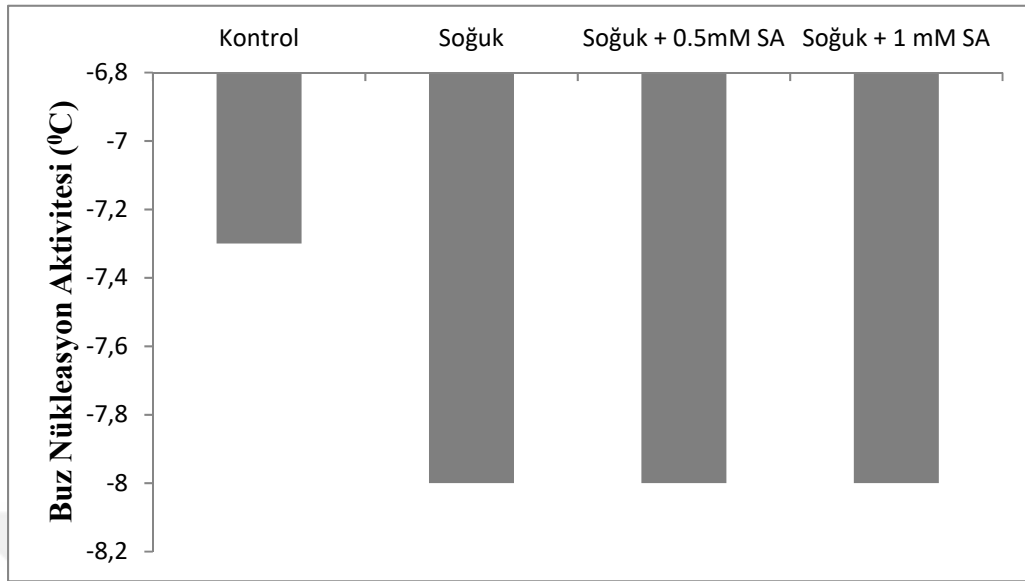
Tablo 10. Mısır (Arifiye) Yaprak Apoplastından Ekstrakte Edilen Proteinlerin Buz Nükleasyon Aktivitesi Değerleri (°C)

Uygulama \ Gün	10	17	24	31
Kontrol	-7.3 e	-8 dc	-8 dc	-8 dc
Soğuk	-8 dc	-8.6 b	-7.6 de	-7.8 d
Soğuk + 0.5mM SA	-8 dc	-8.3 c	-8.6 b	-7.3 e
Soğuk + 1 mM SA	-8 dc	-8 dc	-10.3 a	-7.3 e

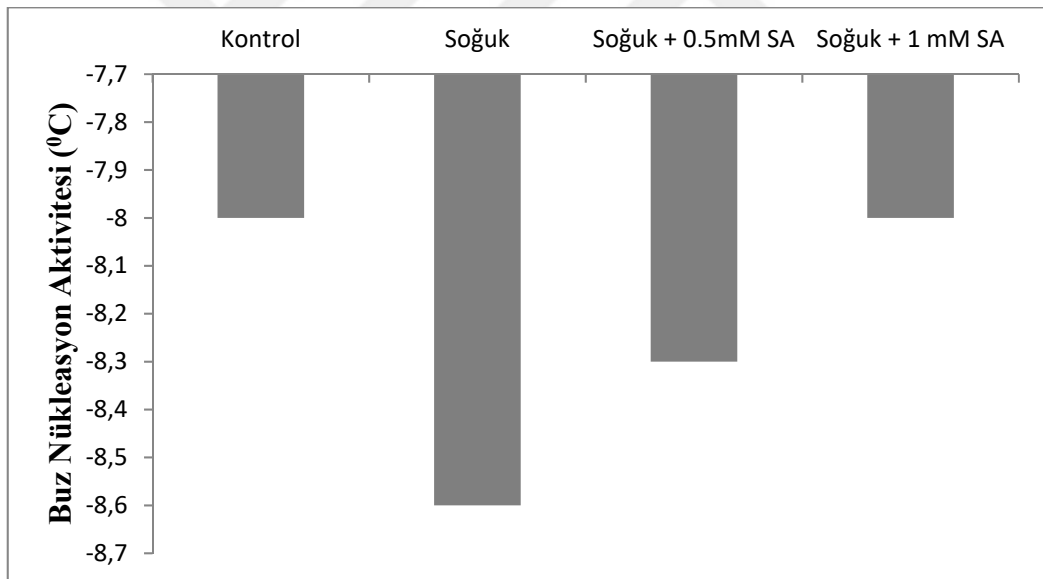
*Tabloda Duncan Testine göre anlamlı veriler farklı harflerle gösterilmiştir (P<0.05).

Arifiye yapraklarında apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesine bakıldığında soğuk uygulamasının 10 ve 17 günlüklerde aktiviteyi artırdığı, 24 ve 31 günlük lerde ise aktivitenin azaldığı görülmektedir. SA uygulamalı bitkilerin aktiviteleri SA'sız soğuk kontrol bitkileri ile kıyaslandığında, 10 günlük bitkilerdeki aktivitenin etkilenmediği, 17 günlük bitkilerde azaldığı, 24 günlük bitkilerde ise hem 0,5 mM lık hem de 1 mM lık SA uygulamalarının aktiviteyi artırdığı görülmektedir. 0,5 mM lık SA uygulamasındaki artış

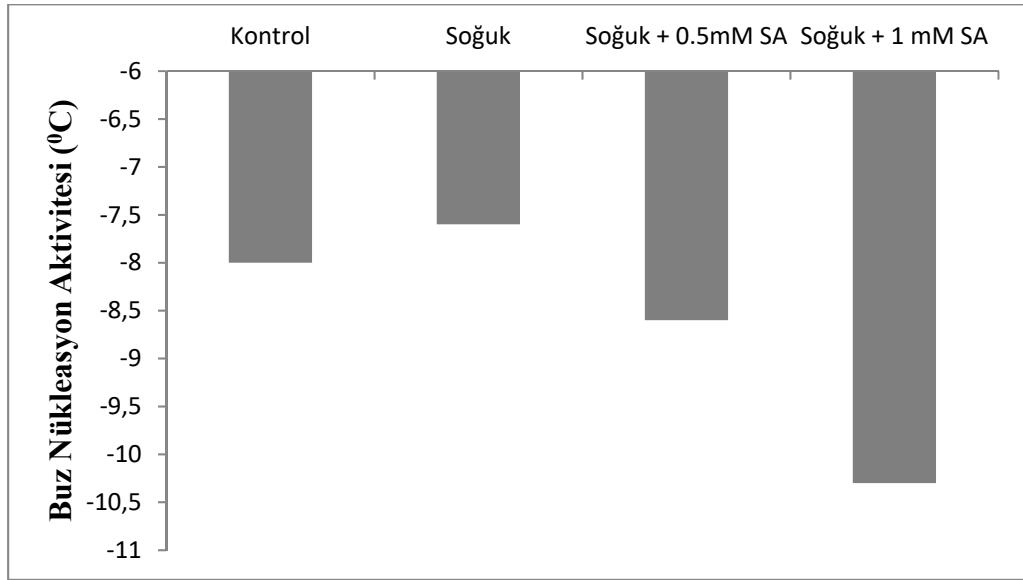
%13,1 civarında olurken, 1 mM lık SA uygulamasında %35,5 lik bir artış olmuştur. Yine 31 günlük bitkilerde SA uygulamasının soğuğa kıyasla aktiviteyi azalttığı söylenebilir.



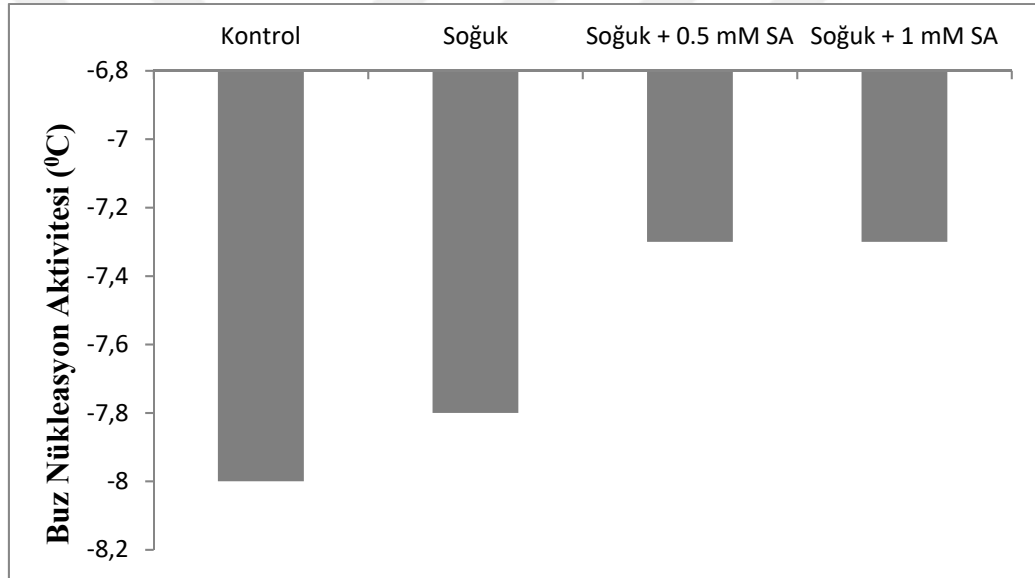
Şekil 13. 10 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları



Şekil 14. 17 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları



Şekil 15. 24 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları



Şekil 16. 31 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından ekstrakte edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi sonuçları

Apoplastik Enzim Aktivitesi Sonuçları

Mısır (Hibrit) Yapraklarından Elde Edilen Apoplastik Enzim Aktivitesi Sonuçları

Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Sonuçları

Tablo 11. Mısır (Hibrit)Yaprak Apoplastında SOD Aktivitesi Değerleri (EU/g yaprak)

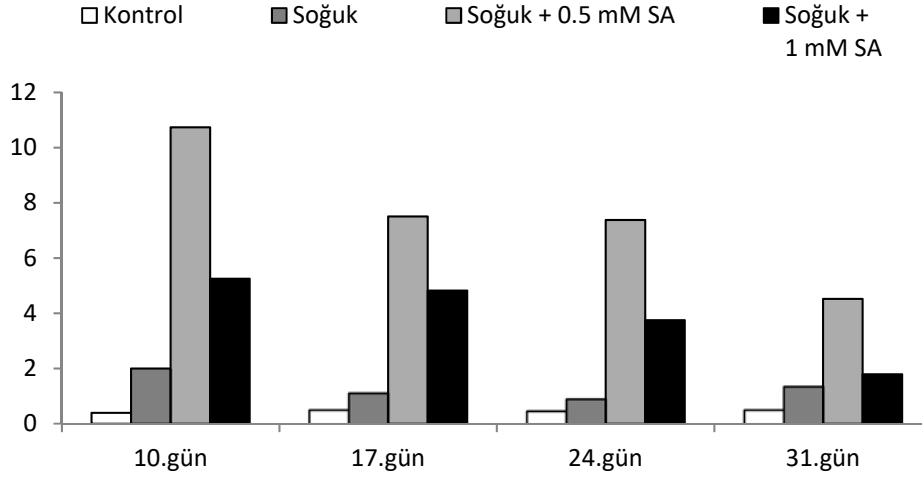
Uygulama Gün	10	17	24	31
Kontrol	0,394k	0,531j	0,491j	0,533j
Soğuk	1,997 f	1,137gh	0,925h	1,374g
Soğuk + 0.5mM SA	10,735 a	7,507 b	7,378 b	4,518 d
Soğuk + 1 mM SA	5,250 c	4,82 dc	3,746 e	1,787 f

*Tabloda Duncan Testine göre anlamlı veriler farklı harflerle gösterilmiştir (P<0.05).

Mısır hibrit yapraklarından elde edilen apoplastik SOD aktivitelerine bakıldığında kontrol bitkisinde 10. günden sonra aktivitenin arttığı ancak 17. günden sonra ise aktivitenin anlamlı bir şekilde artmadığı ($p>0,05$) görülmektedir. Soğuk uygulanmış bitkilerin büyüme periyotundaki değişimler sonucunda ise SOD şöyle etkilenmiştir: 10. günden sonra aktivite 17 ve 24. günde düşmüş ancak 31. günde tekrar artmıştır. Hem 0,5 mM SA hem de 1 mM SA uygulanmış bitkilerin apoplastik SOD aktivitelerine gün bazında bakıldığında bitki büyüdükçe aktivitenin azaldığı gözlenmiştir.

10, 17, 24 ve 31. günlerin tümünde soğuk uygulamasının kontrole kıyasla aktiviteyi önemli ölçüde artırdığı görülmektedir. Bu artış 10, 17, 24 ve 31 günlüklerde sırasıyla yaklaşık %407, %114, %88, %158 oranında olmuştur.

SA uygulamalı yaprakların sonuçları soğuk ile kıyaslandığında her iki konsantrasyonun tüm günlerde aktiviteyi çok ciddi oranda artırdığı görülmektedir. Ancak 0,5 mM SA'nın 1 mM SA uygulamasından SOD aktivitesini artırmada daha etkili olduğu tespit edilmiş ve bu fark yine tüm büyüme periyotlarında görülmüştür. 0,5 mM lık SA uygulaması soğuğa kıyasla aktiviteyi 10, 17, 24 ve 31 günlerde sırasıyla %437, %560, %697 ve %229 oranında artırmıştır. 1 mM lık SA uygulaması ise soğuğa kıyasla aktiviteyi 10, 17, 24 ve 31 günlerde sırasıyla %163, %324, %305 ve %30 oranında artırmıştır. Böylece SA uygulamasının hem hemen bir gün sonrasın da hem de 22 gün sonra bile apoplastik SOD aktivitesini önemli ölçüde artırdığı görülmüştür.



Şekil 17. Mısır (Hibrit) yaprak apoplastında SOD aktivitesi değerleri (EU/g yaprak)

Katalaz aktivitesi sonuçları

Mısır (Hibrit) yaprağına ait apoplastik CAT aktivitesi sonuçları, Tablo 12’den de görüldüğü gibi, farklı zamanlarda yetiştirilmiş Hibrit mısır bitkilerinde üç kez çalışılmasına rağmen belirlenememiştir.

Tablo 12. Mısır (Hibrit) Yaprak Apoplastında CAT Aktivitesi Değerleri (EU/g yaprak)

Uygulama	Gün	10	17	24	31
Kontrol		Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
Soğuk		Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
Soğuk + 0.5mM SA		Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
Soğuk + 1 mM SA		Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi

Peroksidaz aktivitesi sonuçları

Tablo 13. Mısır (Hibrit) Yaprak Apoplastında POD Aktivitesi Değerleri (EU/g yaprak)

Uygulama	Gün	10	17	24	31
Kontrol		20,02k	2,90 n	4,30 m	4,30 m
Soğuk		166f	127h	92 j	87 k
Soğuk + 0.5mM SA		328c	615 a	276de	333 c
Soğuk + 1 mM SA		254e	432 b	281d	116f

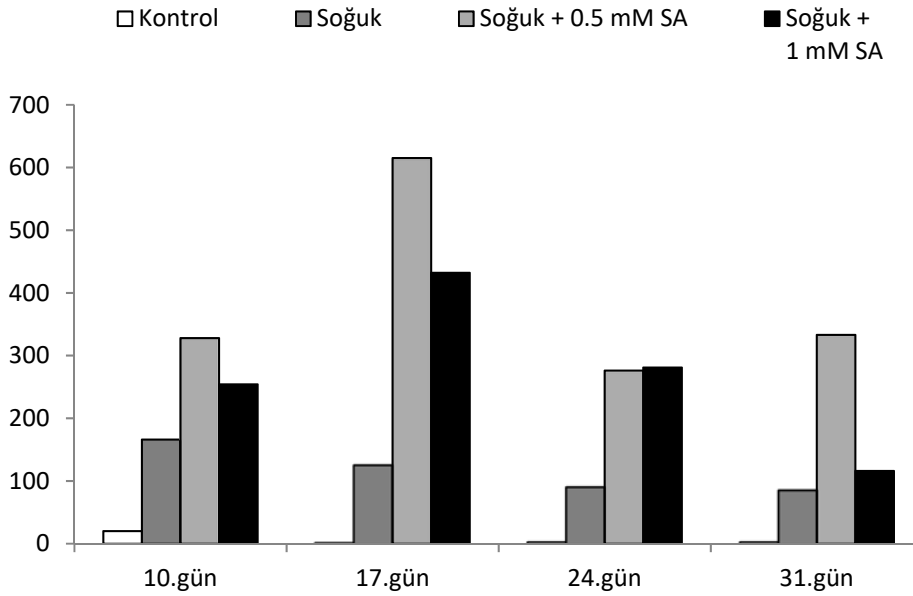
*Tabloda Duncan Testine göre anlamlı veriler farklı harflerle gösterilmiştir (P<0.05).

Mısır (hibrit) yapraklarından elde edilen apoplastik POD aktivitelerine gün bazında bakıldığında kontrol bitkisinde 17. günde aktivitede 10. güne göre düşüş olmuş 24. günde ise aktivite 10 günlükten az olmakla birlikte biraz artmıştır. 31.günde ise 24.günle aynı aktivite değerine sahip görünmektedir. Soğuk uygulanmış bitkilerin apoplastik POD aktivitelerine

günbazında bakıldığında bitki büyüme periyodu arttıkça aktivitenin azaldığı tespit edilmiştir. SA uygulanmış bitkilerin apoplastik POD aktiviteleri de bitki büyüme periyodu ile doğrudan bir korelasyon görünmemektedir.

Soğuk uygulaması kontrol bitkisine kıyasla apoplastik POD aktivitesini 10, 17, 24 ve 31 günlerde önemli ölçüde artırmıştır. Bu artış 10, 17, 24 ve 31 günlerde sırasıyla %729, %4279, %2039, %1923 oranında olmuştur.

SA uygulaması hem 0,5 mM hem de 1 mM konsantrasyon da apoplastik POD aktivitesini soğuk uygulanmış bitkiye kıyasla önemli ölçüde artırmıştır. Bu artış istisnasız tüm günlerde görülmektedir. Aynı zamanda aktivite sonuçlarına bakıldığında 0,5 mM SA'nın 1 mM SA'ya göre aktiviteyi artırmada daha etkili olduğu tespit edilmiştir. 0,5 mM SA uygulaması soğuk uygulanmış bitkiye kıyasla aktiviteyi 10, 17, 24 ve 31 günlerde sırasıyla %97, %384, %200, %282 oranında artırmıştır. 1 mM SA uygulaması ise yine soğuk uygulanmış bitkiye kıyasla aktiviteyi 10, 17, 24 ve 31 günlerde sırasıyla %53, %240, %205 ve %33 oranında artırmıştır. Bu sonuçlara topluca bakıldığında SA uygulamasının hem hemen bir gün sonrasında hem de 22 gün sonra bile apoplastik POD aktivitesini önemli ölçüde artırdığı görülmüştür.



Şekil 18.Mısır (Hibrit) yaprak apoplastında POD aktivitesi değerleri (EU/g yaprak)

Mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen apoplastik enzim aktivitesi sonuçları

Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Sonuçları

Tablo 14. Mısır (Arifiye)Yaprak Apoplastında SOD Aktivitesi Değerleri (EU/g yaprak)

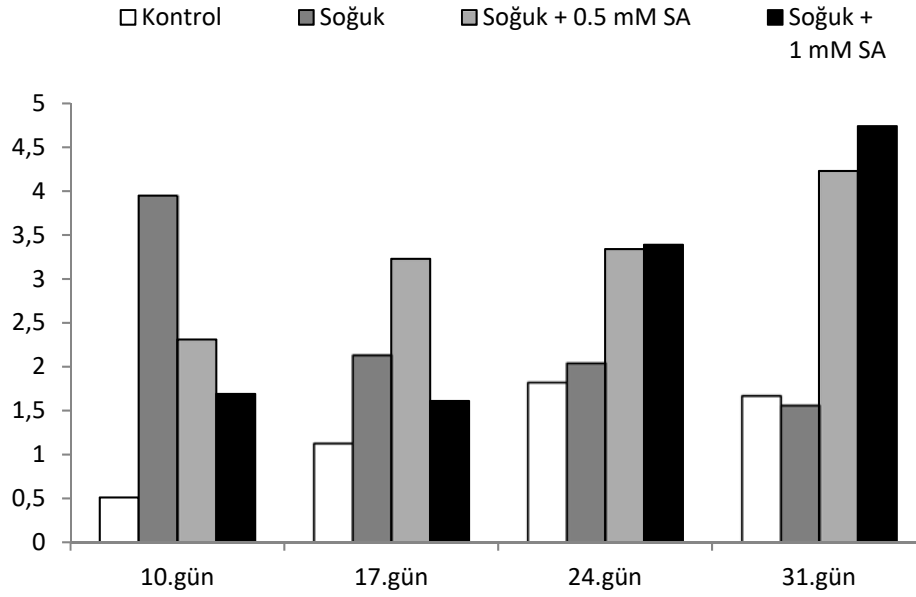
Uygulama Gün	10. gün	17. gün	24. gün	31. gün
Kontrol	0,51 h	1,14 g	1,83 f	1,68 f
Soğuk	3,95 b	2,14 de	2,05 e	1,57 f
Soğuk + 0.5mM SA	2,31 d	3,23 c	3,34 c	4,23 b
Soğuk + 1 mM SA	1,69 f	1,61 f	3,39 c	4,74 a

*Tabloda Duncan Testine göre anlamlı veriler farklı harflerle gösterilmiştir (P<0.05).

Mısır arifiye yapraklarından elde edilen apoplastik SOD aktiviteleri gün bazında incelendiğinde kontrol bitkisinde gün geçtikçe aktivitenin arttığı görülmektedir. Ancak 31 günlük bitkideki aktivite 24 günlüğe göre anlamlı bir değişim ($p>0,05$) göstermemiştir. Soğuk uygulanmış bitkilerde ise günler ilerledikçe apoplastik SOD aktivitesinde düzenli bir düşüş ölçülmüştür. 0,5 mM SA uygulanmış bitkide günler ilerledikçe enzim aktivitesi artmıştır. 1 mM SA uygulanmış bitkide ise 17. günden sonra aktivitede anlamlı bir artmış görünmektedir.

Soğuk uygulaması 10, 17 ve 24 günlük bitkilerde apoplastik SOD aktivitesinde önemli artışlara sebep olmuştur. 31 günlük bitkideki değişim ise istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir. Soğuk uygulaması kontrole kıyasla 10, 17 ve 24 günlerde apoplastik SOD aktivitesini sırasıyla %674, %88, %12 oranında artırmıştır.

SA uygulanmış bitkilerle soğuk uygulanmış bitkilerin aktiviteleri karşılaştırıldığında 0,5 mM lık SA uygulaması 10 günde aktiviteyi azaltırken, 17, 24 ve 31 günlük bitkilerde aktiviteyi artırmıştır. 0,5 mM SA 10 günlük bitkide aktiviteyi % 41 oranında azaltırken, 17, 24 ve 31 günlük bitkilerde sırasıyla %51, %63, %169 oranında artırdığı görülmüştür. 1 mM lık SA uygulaması soğuk uygulanmış bitkilerin aktivitesi ile kıyaslandığında 10 ve 17 günlük bitkilerin aktivitelerinde düşüş 24 ve 31 günlüklerde ise artış olduğu görülmektedir. 24 ve 31günlükteki aktivite artışları sırasıyla %65 ve %202 olmuştur. Bu sonuçlara bakarak soğukun ve SA nın arifiye çeşidinde apoplastik SOD aktivitesi üzerinde etkili olduğu anlaşılmaktadır. 0,5 mM lık SA nın etkisi ile 1mM lık SA uygulamasının etkisi kıyaslandığında 10 ve 17 günlerde 0,5 mM daha etkili görülürken 24 ve 31 günlerde 1 mM daha etkili görünmektedir.



Şekil 19.Mısır (Arifiye) yaprak apoplastında SOD aktivitesi değerleri (EU/g yaprak)

Katalaz aktivitesi sonuçları

Tablo 15. Mısır (Arifiye)Yaprak Apoplastında CAT Aktivitesi Değerleri (EU/g yaprak)

Uygulama	10	17	24	31
Gün				
Kontrol	0,047 f	0,031 g	0,069 e	0,052 f
Soğuk	0,036 g	0,189 c	0,110 d	0,121 d
Soğuk + 0.5mM SA	0,052 f	0,105 d	0,420b	0,462 b
Soğuk + 1 mM SA	0,031 g	0,042 f	0,015h	0,626 a

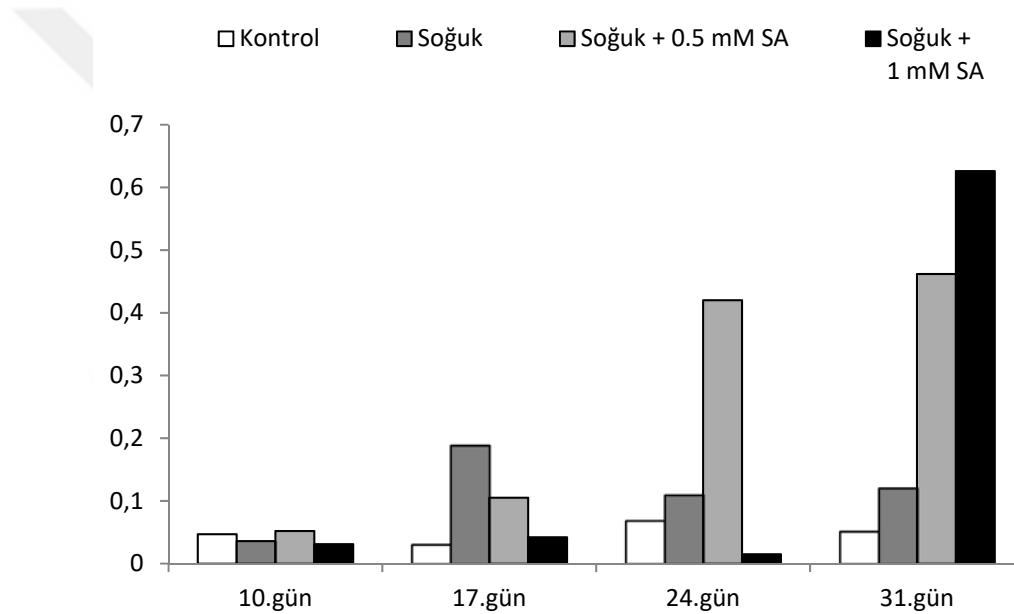
*Tabloda Duncan Testine göre anlamlı veriler farklı harflerle gösterilmiştir (P<0.05).

Mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen apoplastik CAT aktivitesi sonuçlarının büyüme periyodu ile nasıl değiştiğine bakıldığında kontrol bitkisinde aktivitede azalma ve artma şeklinde bir dalgalanma olmuş ve 31. gündeki aktivite 10. gündeki aktivite değeri ile istatistiksel olarak aynı olmuştur. Soğuk uygulanmış bitkilerde ise günler ilerledikçe 17. günde aktivite artmış 24 ve 31. günlerde 17. güne oranla aktivite azalmıştır. 0,5 mM SA uygulanmış bitkilerde büyüme periyodu arttıkça apoplastik CAT aktivitesi de düzenli olarak artmıştır. 1 mM SA uygulanmış bitkilerde ise aktivite genellikle artmış ve bu artış 31 günlük bitkide çok yüksek olmuştur.

Soğuk uygulamasının kontrol bitkisine kıyasla apoplastik CAT aktivitesini nasıl değiştirdiğine bakıldığında 10 günlük bitkilerde aktivitede küçük bir düşüş olurken, 17, 24 ve 31 günlük aktivitelerde artış olmuştur. 10 günlük aktivitede ki düşüş %23 olurken, 17, 24 ve 31 günlük bitkilerdeki aktivite artışı sırasıyla %510, %59 ve %133 oranında olmuştur.

SA uygulanmış bitkilerin soğuk uygulanmış bitkilerde ki apoplastik CAT aktivitesi ile kıyaslandığında 0,5 mM SA uygulamasının 17 günde aktivitede azalmaya sebep olurken, 10, 24 ve 31 günlük bitkilerde aktivite artışına sebep olmuştur. Bu artış 10 günlüklerde %44 oranında olurken, 24 ve 31 günlük bitkilerin her ikisinde de %282 oranında olmuştur. 1 mMSA uygulaması soğuğa kıyasla 10, 17 ve 24. Günlerde aktiviteyi azaltırken 31. Günde aktiviteyi %417 oranında artırmıştır.

Buradaki sonuçlara apoplastik CAT açısından bakıldığında soğukun aktiviteyi artırdığı, eksojen SA uygulamasının ise bu enzim aktivitesi üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Bu etki 24 ve 31günlerde daha iyi görülmektedir. Buradan hareketle uygulanan SA nın bir antioksidan enzim olan CAT aktivitesini etkileyerek bitkinin soğuk stresine cevap vermesine yardım sağlamış olduğu görülmektedir.



Şekil 20.Mısır (Arifiye) yaprak apoplastında CAT aktivitesi değerleri (EU/g yaprak)

Peroksidaz aktivitesi sonuçları

Tablo 16. Mısır (Arifiye)Yaprak Apoplastında POD Aktivitesi Değerleri (EU/g yaprak)

Uygulama Gün	10	17	24	31
Kontrol	28,6 j	28,6 j	1,43 m	14,3 k
Soğuk	214,5 g	328,9 e	214,5 g	128,7 h
Soğuk + 0.5mM SA	400,4 c	357,5 d	257,4 f	486,2 b
Soğuk + 1 mM SA	257,4 f	243,1 f	600,6 a	443,3bc

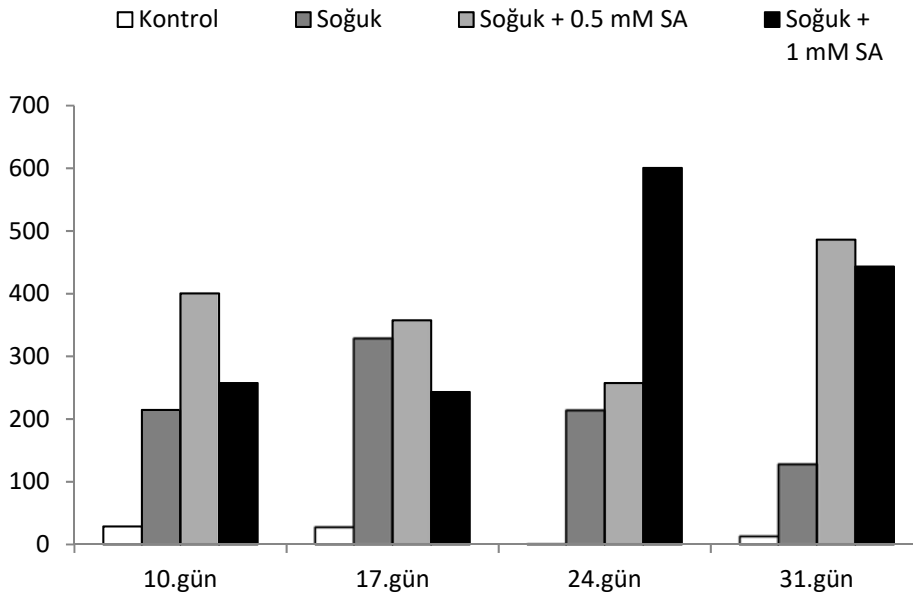
*Tabloda Duncan Testine göre anlamlı veriler farklı harflerle gösterilmiştir (P<0.05).

Mısır arifiye yapraklarından elde edilen apoplastik POD aktivitesinin bitki büyüme periyoduna göre nasıl değiştiğine bakıldığında kontrol bitkisinde 10 ve 17. günde aktivite

değişmemiş, 24. günde azalma olmuş 31. günde 24 günlüğe göre artma olmuş ancak 10. günde ki aktiviteden daha az olduğu belirlenmiştir. Soğuk uygulanmış bitkilerdeki aktivitenin artış ve azalış şeklinde dalgalandığı tespit edilmiştir. 0,5 mM SA uygulanmış bitkilerde aktivite 17 ve 24. günde düşmüş 31. günde tekrar artmıştır. 1 mM SA uygulanmış bitkilerde ise aktivite 17. günde 10. güne göre çok değişmemiş 24. günde artmış ve 31. günde biraz düşmüştür.

Soğuk uygulanmış bitkiler kontrol şartlarında yetiştirilen bitkilerle kıyaslandığında soğuk uygulamasının tüm günlerde apoplastik POD aktivitesini önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Bu artış 10, 17, 24 ve 31 günlüklerde sırasıyla %650, %1050, %14900, %800 oranında olmuştur.

SA uygulanmış bitkiler soğuk uygulanmış bitkilerle kıyaslandığında 0,5 mM lık SA uygulaması apoplastik POD aktivitesini tüm günlerde artırmıştır. Bu artış 10, 17, 24 ve 31. günlerde sırasıyla %86, %9, %20 ve %277 oranında olmuştur. 1 mM lık SA uygulaması soğuk ile karşılaştırıldığında 10, 24 ve 31 günlüklerde aktiviteyi sırasıyla %20, %180 ve %244 oranında artırmıştır.



Şekil 21.Mısır (Arifiye) yaprak apoplastında POD aktivitesi değerleri (EU/g yaprak)

Lipid Peroksidasyon Aktivitesi Sonuçları

Mısır (Hibrit) yapraklarındaki lipid peroksidasyon aktivitesi sonuçları

Tablo 17. Mısır (Hibrit) Yapraklarında Ölçülen Lipid Peroksidasyon Aktivitesi (nmol/g yaprak) Verileri

Uygulama Gün	10	17	24	31
Kontrol	1,90 efg	1,79 fg	2,26 cd	1,69 g
Soğuk	2,06 def	1,81 fg	2,41 c	2,84 b
Soğuk +0,5mM SA	2,06 def	1,95 defg	3,22 a	3,04 ab
Soğuk + 1 mM SA	2,16 cde	2,05 def	2,82 b	3,22 a

*Tabloda Duncan Testine göre anlamlı veriler farklı harflerle gösterilmiştir (P<0.05).

**48 verinin tümü birden DUNCAN One-Way ANOVA ile analiz edilmiştir.

Mısır (hibrit) yapraklarından elde edilen lipid peroksidasyon aktivite sonuçlarının bitkinin büyüme periyodu ile nasıl değiştiğine bakıldığında ; Kontrol bitkisinde 17. günde bir azalma , 24. günde artma ve 31. günde tekrar azalma olduğu görülmektedir. Soğuk uygulaması yapılmış bitkilerde günlere bağlı olarak 17. günde azalma, 24. günde artma ve 31. günde artma olmuştur. SA uygulamalı bitkilerde ise 0,5 mM SA uygulamalı bitkilerde 17. günde azalma, 24. günde artma ve 31. günde azalma olmuştur. 1 mM SA uygulamalı bitkilerde 17. günde azalma, 24. günde artma ve 31. günde yine artma olmuştur. Buradaki artma ve azalma değerlendirmesi bir önceki hasat gününde ortaya çıkan LPO değerlerine kıyaslanarak yapılmıştır. Sonuçlar itibari ile bitkinin büyüme periyodu ile LPO arasında bariz bir korelasyon görünmemektedir. Ancak tüm 17 günlük bitkilerde (Kontrol, Soğuk, Soğuk+0,5mM SA ve Soğuk+1mM SA) LPO daki düşüş dikkat çekicidir.

Tablo 18. Mısır (Hibrit) Yapraklarında Ölçülen Lipid Peroksidasyon Aktivitesi (nmol/g yaprak) Verileri

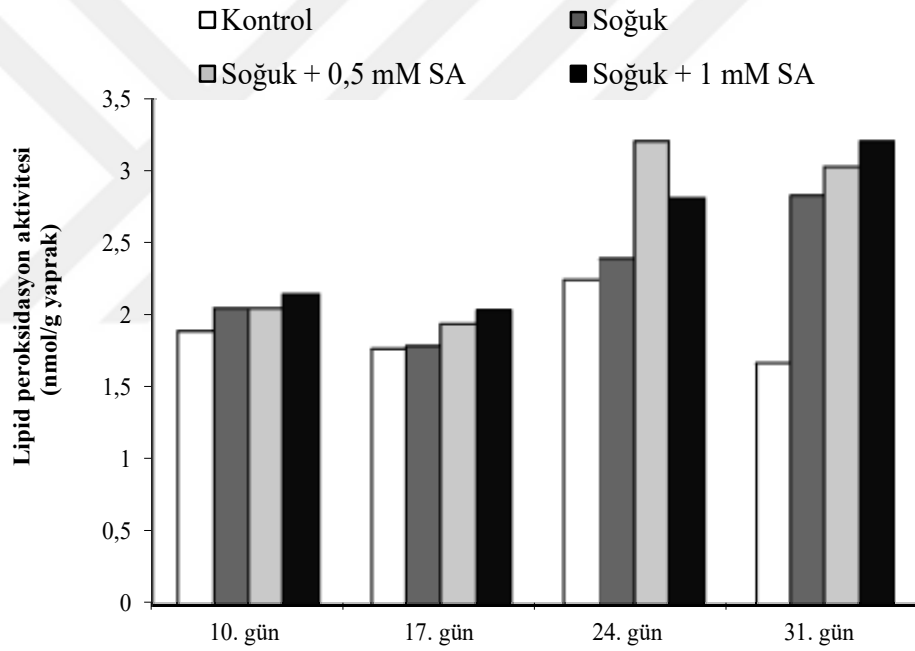
Uygulama Gün	10	17	24	31
Kontrol	1,90 a	1,79 a	2,26 c	1,69 c
Soğuk	2,06 a	1,81 a	2,41 bc	2,84 b
Soğuk +0,5mM SA	2,06 a	1,95 a	3,22 a	3,04 ab
Soğuk + 1 mM SA	2,16 a	2,05 a	2,82 ab	3,22 a

*Tabloda Duncan Testine göre anlamlı veriler farklı harflerle gösterilmiştir (P<0.05).

**Herbir sütun kendi içerisinde DUNCAN One-Way ANOVA ile analiz edilmiştir

Mısır (hibrit) yapraklarından elde edilen lipid peroksidasyon aktivite sonuçlarına soğuk uygulamasının nasıl etki ettiğine bakıldığında; 10, 17, 24 ve 31 günlüklerde soğuk uygulamasının LPO'yu artırdığı görülmüştür. 10 ve 17 günlüklerdeki artış istatistiksel olarak anlamlı değil iken 24 ve 31 günlüklerdeki artış Duncan testine göre anlamlıdır. Bu artış 24 günlük bitkilerde %6,6 olurken, 31 günlük bitkilerde %68 oranında olmuştur.

SA uygulaması yapılmış bitkiler ile soğuk uygulaması yapılmış bitkilerin LPO değerleri kıyaslandığında 0,5 mM lık SA uygulaması 10 ve 17 günlük bitkilerde anlamlı değişikliğe sebep olmazken, 24 ve 31 günlük bitkilerde LPO da artışa sebep olmuştur. Bu artış 24 günlük bitkilerde %33,6 olurken, 31 günlük bitkilerde %7 oranında olmuştur. 1 mM SA uygulaması ise tüm günlerde LPO'yu artırmıştır ancak 10 ve 17 günlüklerde yine anlamlı bir değişikliğe sebep olmamış iken 24 ve 31 günlüklerde sırasıyla %17 ve %13,4 oranında artışa sebep olmuştur.



Şekil 22. Mısır (Hibrit) yapraklarında ölçülen lipid peroksidasyon aktivitesi (nmol/g yaprak) verileri

Mısır (Arifiye) yapraklarındaki lipid peroksidasyon aktivitesi sonuçları

Tablo 19. Mısır (Arifiye) Yapraklarında Ölçülen Lipid Peroksidasyon Aktivitesi (nmol/g yaprak) Verileri

Uygulama	10	17	24	31
Gün				
Kontrol	1,28de	1,26 de	1,04 e	1,59cd
Soğuk	1,63bcd	1,85bc	1,52cd	1,89bc
Soğuk + 0,5mM SA	0,97e	1,88bc	1,49cd	2,32a
Soğuk + 1 mM SA	1,05e	1,70bcd	1,63bcd	2,06ab

*Tabloda Duncan Testine göre anlamlı veriler farklı harflerle gösterilmiştir (P<0.05).

**48 verinin tümü birden DUNCAN One-Way ANOVA ile analiz edilmiştir.

Mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen lipid peroksidasyon aktivite sonuçlarının bitkinin büyüme periyodu ile nasıl değiştiğine bakıldığında ; kontrol bitkisinde 10 günde ölçülen LPO değeri 17 günde değişmemiş sonra 24 günde azalmış ve 31. Günde artmıştır. Soğuk uygulaması sonrası 10. Günde ölçülen LPO değeri 17. Günde artmış, 24. Günde bir miktar azalmış ve 31. Günde tekrar artmıştır. 0,5 mM SA uygulanmış bitkilerin gün bazında LPO daki değişimine bakıldığında 10. Günde ölçülen değer 17. Günde artmış, 24. Günde azalmış ve 31 günde artarak en yüksek değerine ulaşmıştır. 1 mM SA uygulanmış bitkilere gün bazında bakıldığında 10. Gündeki değerin 17. Günde arttığı görülmüş, 24 günde ölçülen değerde anlamlı bir değişiklik olmamış 31 günde ise artarak yine en yüksek değerine ulaşmıştır. Buradaki artma ve azalma değerlendirmesi bir önceki hasat gününde ortaya çıkan LPO değerlerine kıyaslanarak yapılmıştır. Sonuçlara toplu bakıldığında günler ilerledikçe LPO da bir artış olma eğilimi görülmektedir. Tüm gruplarda en yüksek LPO miktarının 31. Günde olması bu fikri desteklemektedir.

Tablo20. Mısır (Arifiye) Yapraklarında Ölçülen Lipid Peroksidasyon Aktivitesi (nmol/g yaprak) Verileri

Uygulama	10	17	24	31
Gün				
Kontrol	1,28 a	1,26 b	1,04 b	1,59 c
Soğuk	1,63 a	1,85 a	1,52 a	1,89 bc
Soğuk + 0,5mM SA	0,97 a	1,88 a	1,49 a	2,32 a
Soğuk + 1 mM SA	1,05 a	1,70 a	1,63 a	2,06 ab

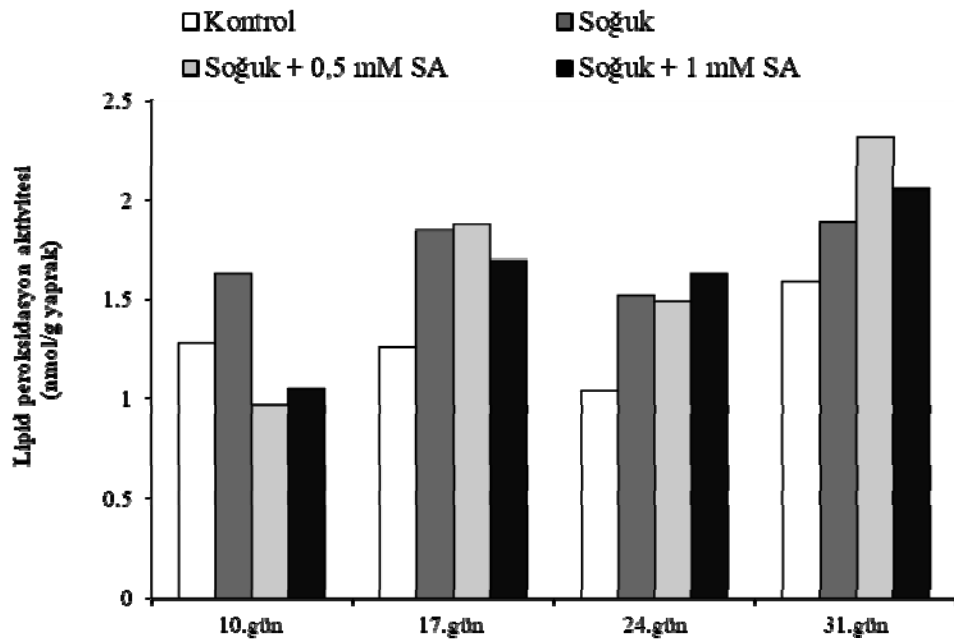
*Tabloda Duncan Testine göre anlamlı veriler farklı harflerle gösterilmiştir (P<0.05).

**Herbir sütun kendi içerisinde DUNCAN One-Way ANOVA ile analiz edilmiştir.

Mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen lipid peroksidasyon aktivite sonuçlarına soğuk uygulamasının nasıl etki ettiğine bakıldığında ; 10, 17, 24 ve 31 günlüklerde soğuk uygulamasının LPO yu artırdığı görülmüştür. 10 günlüklerdeki artış %27,3 , 17 günlükte %46,8 , 24 günlükte %46,1 ve 31 günlüklerdeki artış %18,8 oranında olmuştur.

SA uygulaması yapılmış bitkiler ile soğuk uygulaması yapılmış bitkilerin LPO değerleri kıyaslandığında 0,5 mM lık SA uygulaması 10 ve 24 günlük bitkilerde azalmaya, 17 ve 31 günlük bitkilerde artmaya sebep olmuştur. İstatistiksel olarak en anlamlı artış 31 günlüklerde gerçekleşmiştir. 1 mM SA uygulaması ise 10 ve 17 günlüklerde LPO değerlerinin azalmasına 24 ve 31 günlüklerde ise artmasına sebep olmuştur. 10 günlüklerde yaklaşık %35,6 oranında 17 günlüklerde ise %8,1 oranında LPO azalmıştır. 24 günlüklerde LPO da %7,2 artış olurken 31 günlüklerde %9 civarında artış olmuştur. Bu sonuçlardan her iki konsantrasyon daki SA uygulamasının LPO yu 10 ve 17. Günlerde düşürmede etkili olduğu görülmüştür. SA uygulamaları özellikle 31. Günde LPO yu artırmıştır.

Mısır (Hibrit) ile mısır (Arifiye) çeşitleri LPO değerleri açısından karşılaştırılırsa; kontrol grubu bitkilerinin tüm günlerinde hibrit çeşidinde LPO değerlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Soğuk uygulaması her iki varyetede LPO değerini artırmıştır. Ancak yine tüm günlerde soğukun sebep olduğu LPO değerlerihibrit çeşidinde arifiyeye göre daha yüksek olmuştur. SA uygulamaları hibrit çeşidinde LPO yu hep artırmışken, arifiye çeşidinde LPO da düşüş olduğu görülmüştür.



Şekil 23. Mısır (Arifiye) yapraklarında ölçülen lipid peroksidasyon aktivitesi (nmol/g yaprak) verileri

H₂O₂ Miktarı Sonuçları

Mısır (Hibrit) yapraklarındaki H₂O₂ miktarı sonuçları

Tablo21. Mısır (Hibrit) Yapraklarında Ölçülen H₂O₂ Miktarı (ng/g yaprak) Değerleri

Uygulama Gün	10	17	24	31
Kontrol	385,13 bcd	453,44 ab	298,57 d	345,09 bcd
Soğuk	383,96 bcd	422,23 abc	372,77 bcd	522,34 a
Soğuk + 0,5mM SA	434,6 abc	358,63 bcd	409,87 bc	423,41 abc
Soğuk + 1 mM SA	439,9 abc	329,78 cd	432,24 abc	522,93 a

*Tabloda Duncan Testine göre anlamlı veriler farklı harflerle gösterilmiştir (P<0.05).

**48 verinin tümü birden DUNCAN One-Way ANOVA ile analiz edilmiştir.

Mısır (Hibrit) yapraklarında belirlenen hidrojen peroksit miktarlarına bitki büyüme periyodu ile nasıl değiştiğine bakıldığında kontrol şartlarında 10 günlük deki miktarın 17. Günde arttığını ve sonra 24. Günde azalma olduğunu ve 31. Günde ise tekrar artış gerçekleştiği görülmektedir. Soğuk şartlarındaki değerler kontrolle paralellik göstermektedir. Şöyle ki 10 günlük değerlerin 17. Günde arttığı ve sonra 24. Günde azalma olduğu ve 31. Günde tekrar arttığı belirlenmiştir. 0,5 mM ve 1mM SA uygulanmış bitkilerde ise günler ilerledikçe hidrojen peroksit miktarında ki değişim benzerlik göstermiştir. 10. Gündeki miktar 17. Günde azalmış sonra 24 ve 31. Günlerde artış göstermiştir.

Tablo22. Mısır (Hibrit) Yapraklarında Ölçülen H₂O₂ Miktarı (ng/g yaprak) Değerleri

Uygulama Gün	10	17	24	31
Kontrol	385,13a	453,44a	298,57b	345,09 b
Soğuk	383,96a	422,23a	372,77ab	522,34 a
Soğuk + 0,5mM SA	434,6a	358,63a	409,87a	423,41 ab
Soğuk + 1 mM SA	439,9a	329,78a	432,24 a	522,93 a

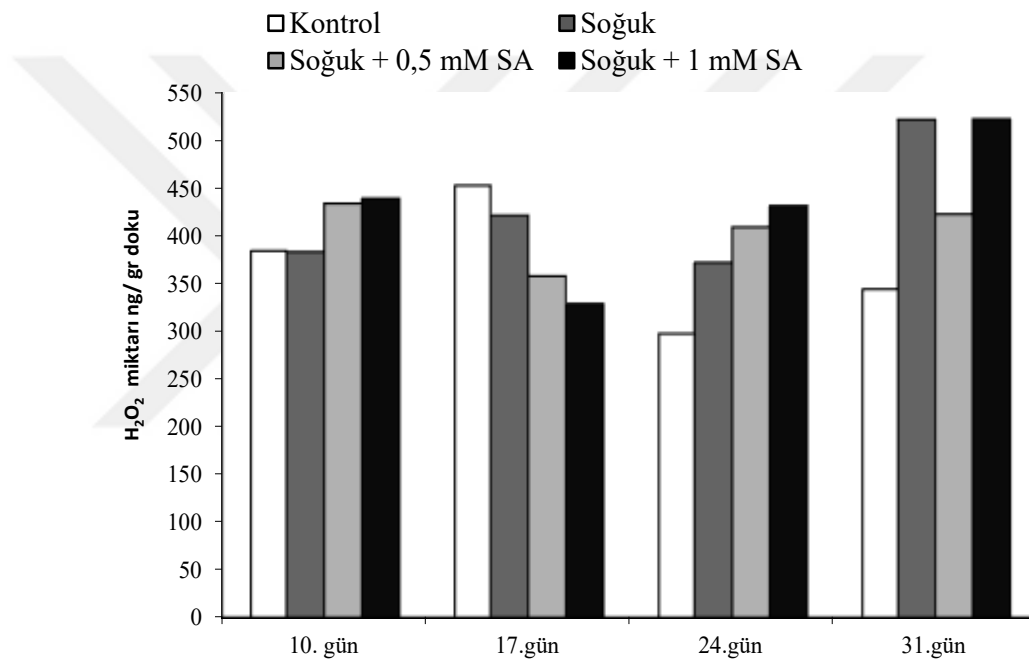
*Tabloda Duncan Testine göre anlamlı veriler farklı harflerle gösterilmiştir (P<0.05).

**Herbir sütun kendi içerisinde DUNCAN One-Way ANOVA ile analiz edilmiştir.

Mısır (Hibrit) yaprakların da belirlenen hidrojen peroksit miktarlarına soğukun, kontrol şartları ile kıyaslandığında nasıl etki ettiğine baktığımız da 10 ve 17. Günlerde anlamlı bir değişikliğe sebep olmaz iken 24 ve 31. Günlerde H₂O₂ miktarının arttığı görülmektedir.

Bu artış 24 günlük yapraklarda %24,8 civarında olurken 31 günlük yapraklarda daha yüksek olup %51,3 civarındadır.

SA uygulaması yapılmış bitkiler ile soğuk uygulaması yapılmış bitkilerin H_2O_2 miktarları karşılaştırıldığında 0,5 mM SA uygulaması 10günlüklerde yaklaşık%13,2 oranında artmaya, 17 günlük bitkide yaklaşık %15 oranında azalmaya 24 günlük bitkide %9,95 lik artışa, 31 günlüklerde ise yaklaşık %19 luk azalmaya sebep olmuştur. 1mM SA uygulaması ise soğuğa kıyasla 31 günlük bitkilerde %23,5 artışa sebep olmuş diğer günlerde ise büyük bir değişikliğe sebep olmamıştır. Ayrıca 1mM SA uygulaması yapılmış yapraklarda ki H_2O_2 miktarının 0,5 mM SA uygulamalı yapraklardakinden miktar olarak fazla olduğu belirlenmiştir.



Şekil 24. Mısır (Hibrit) yapraklarında ölçülen H_2O_2 miktarı (ng/g yaprak) değerleri

Mısır (Arifiye) Yapraklarındaki Hidrojen Peroksit Miktarı Sonuçları

Tablo 23. Mısır (Arifiye) Yapraklarında Ölçülen H_2O_2 Miktarı (ng/g yaprak) Değerleri

Uygulama	10	17	24	31
Gün				
Kontrol	395,14 abcd	352,74 bcd	322,12 cd	358,63 bcd
Soğuk	382,78 abcd	355,1 bcd	363,93 bcd	325,07 cd
Soğuk + 0,5mM SA	312,11 d	428,71 ab	318,59 d	473,47 a
Soğuk + 1 mM SA	368,64 bcd	381,6 abcd	368,64 bcd	424,59 abc

*Tabloda Duncan Testine göre anlamlı veriler farklı harflerle gösterilmiştir (P<0.05).

**48 verinin tümü birden DUNCAN One-Way ANOVA ile analiz edilmiştir.

Mısır (Arifiye) yaprakların da belirlenen hidrojen peroksit miktarlarına bitki büyüme periyodu ile nasıl değiştiğine bakıldığında kontrol şartlarında 10 günlük deki miktarın 17. Günde azaldığı, 24. Günde azalmanın devam ettiği ancak 31. Günde artarak 17. Gündeki seviyeye geldiği görülmektedir. Soğuk şartlarında günler geçtikçe hidrojen peroksit miktarında bir azalma olduğu görülmektedir. 0,5 mM ve 1mM SA uygulanmış bitkilerde ise günler ilerledikçe hidrojen peroksit miktarında ki değişim benzerlik göstermiştir. 10. Gündeki miktar 17. Günde artmış, 24. Günde azalarak 10. gündeki değerine yaklaşmış ve 31. Günlerde tekrar artış göstermiştir.

Tablo 24. Mısır (Arifiye) Yapraklarında Ölçülen H₂O₂ Miktarı (ng/g yaprak) Değerleri

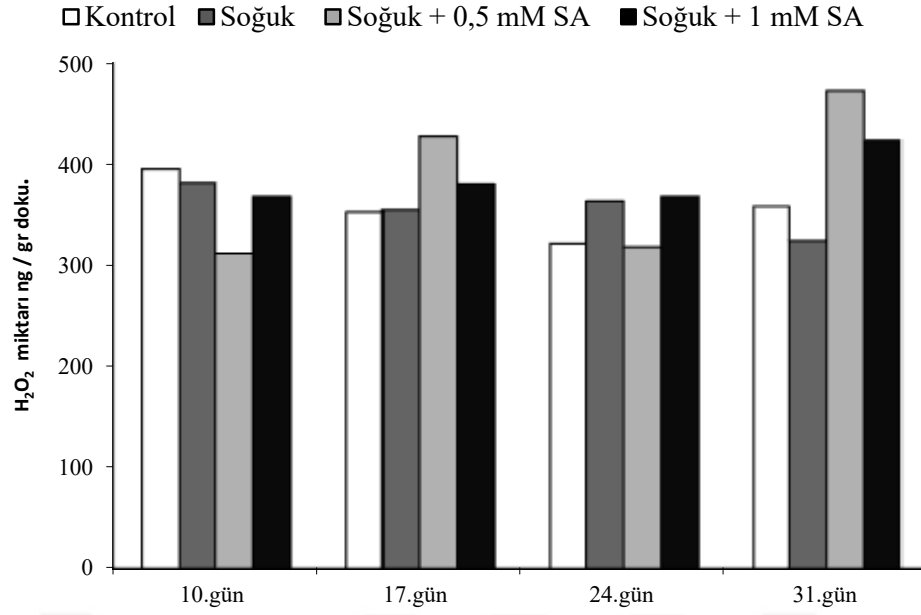
Uygulama Gün	10	17	24	31
Kontrol	395,14 a	352,74 a	322,12 a	358,63ab
Soğuk	382,78 a	355,1 a	363,93 a	325,07b
Soğuk + 0,5mM SA	312,11 a	428,71 a	318,59 a	473,47 a
Soğuk + 1 mM SA	368,64 a	381,6 a	368,64 a	424,59 ab

*Tabloda Duncan Testine göre anlamlı veriler farklı harflerle gösterilmiştir (P<0.05).

**Herbir sütun kendi içerisinde DUNCAN One-Way ANOVA ile analiz edilmiştir.

Mısır (Arifiye) yaprakların da belirlenen hidrojen peroksit miktarlarına soğukun, kontrol şartları ile kıyaslandığında nasıl etki ettiğine baktığımız da 10. ve 17. Günlerde fazla bir değişikliğe sebep olmadığı görülürken 24. Günde yaklaşık %13 oranında artma olmuş ve 31 günlüklerde %9,3 oranında azalma olmuştur.

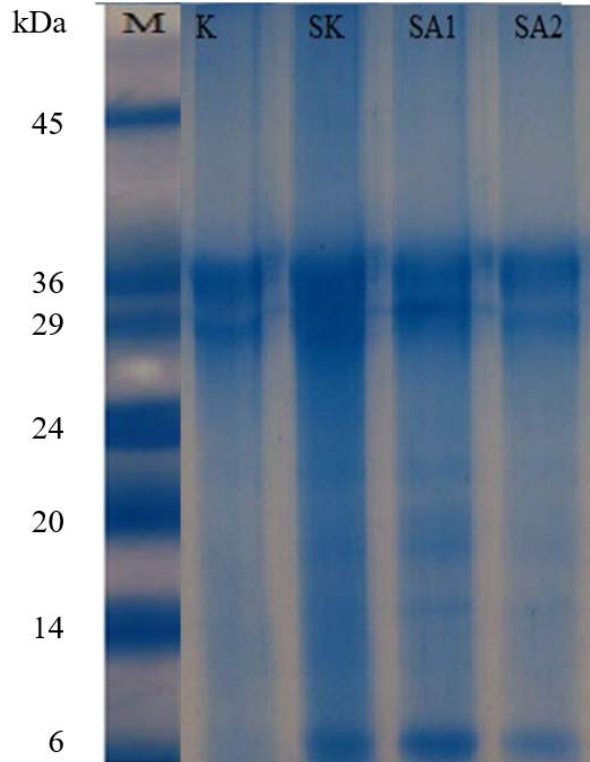
SA uygulaması yapılmış bitkiler ile soğuk uygulaması yapılmış bitkilerin H₂O₂ miktarları karşılaştırıldığında 0,5 mM SA uygulaması 10 ve 24. günlerde azalmaya 17 ve 31. günlerde artmaya sebep olduğu görülmektedir. 17. günde %20,7 civarında artma olurken, 31. günde yaklaşık %45,6 oranında artma olmuştur. 1 mM SA uygulaması soğuk ile kıyaslandığında 10 günlüklerde bir azalmaya sebep olurken diğer günlerde artmaya sebep olduğu belirlenmiştir. 31. gündeki artış %30,6 civarındadır. Hem 0,5 hemde 1 mM lık uygulamaların H₂O₂ miktarı üzerinde en etkili olduğu günün 31. gün olduğu belirlenmiştir.



Şekil 25. Mısır (Arifiye) yapraklarında ölçülen H₂O₂ miktarı (ng/g yaprak) değerleri

Sodyum Dodesil Sülfat -Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) Sonuçları

Mısır (Hibrit) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçları



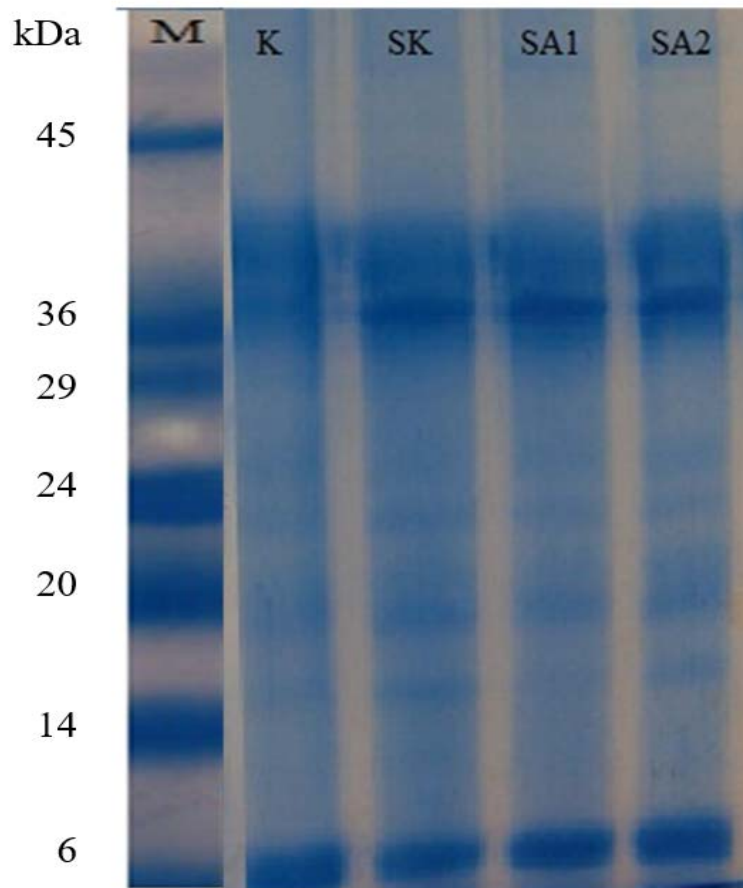
Şekil 26. 10 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü

* M: Standart Proteinler, K: Kontrol, SK: Soğuk Kontrol, SA1: Soğuk + 0.5 mM SA, SA2: Soğuk + 1 mM SA.

10 günlük mısır (Hibrit) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-PAGE fotoğrafına bakıldığında mol kütlesi bilinen standart polipeptidlerin jelde yürüme mesafeleri ile karşılaştırılırsa yaklaşık 6 kDa ile 40 kDa arasında kütleye sahip polipeptidler olduğu görülür. Ayrıca kontrol ile soğuk arasında ve soğuk ile soğuk+SA uygulanmış yaprakların apoplastik proteinlerinin oluşturduğu bantlar arasında belirgin farklar görülmektedir.

Kontrol grubunda yaklaşık 29 ve 36 kDa kütleye sahip iki bant görünmektedir. Soğuk uygulanmış bitkide ise ekstra olarak 6 kDa civarında yeni bir bant oluşmuştur. Ayrıca soğuk uygulamasında yaklaşık 29 ve 36 kDa luk polipeptidlerin miktarının artması da dikkat çekmektedir.

Soğuk ile 0,5 mM SA arasında karşılaştırma yapıldığında 6 kDa luk polipeptidin miktarının arttığı ve zayıf olmakla birlikte 14 ile 24 kDa arasında yeni bantlar olduğu görülmektedir. 1mM SA uygulanmış yaprakların bantlarına bakıldığında soğuğa kıyasla 6 kDa luk polipeptid miktarında azalma görülmektedir. Ayrıca 0,5 mM SA da görülen 14-24 kDa arasında ki bantlarında miktarının azaldığı belirlenmiştir.



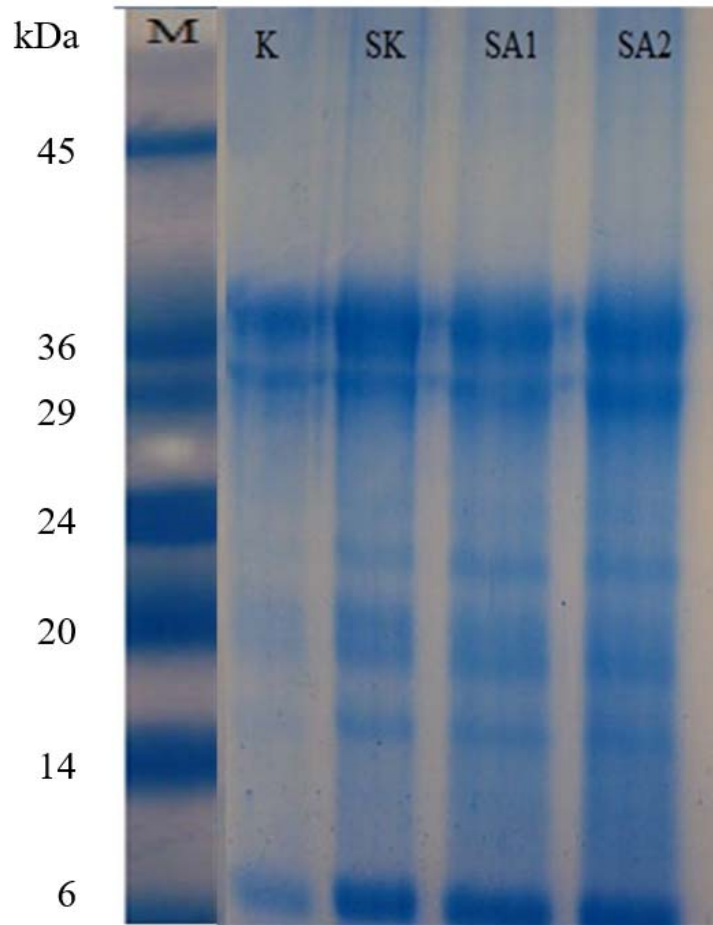
Şekil 27. 17 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü

* M: Standart Proteinler, K: Kontrol, SK: Soğuk Kontrol, SA1: Soğuk + 0.5 mM SA, SA2: Soğuk + 1 mM SA.

17 günlük mısır (Hibrit) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-PAGE fotoğrafına bakıldığında mol kütlesi bilinen standart polipeptidlerin jelde yürüme mesafeleri ile karşılaştırılırsa yaklaşık 6 kDa ile 40 kDa arasında kütleye sahip polipeptidler olduğu görülür. Ayrıca kontrol ile soğuk arasında ve soğuk ile soğuk+SA uygulanmış yaprakların apoplastik proteinlerinin oluşturduğu bantlar arasında farklar görülmektedir.

Kontrol grubunda 6kDa, 36kDa ve 40 kDa civarında net koyu bantlar görülürken 14 ile 24 kDa arasında ise çok zayıf bantların varlığı görülmektedir. Soğuk uygulanmış bitkilerle kontrol grubu kıyaslandığında da kontrolde var olan bütün bantların varlığı devam etmekle birlikte bantlarda bir koyulaşma olduğu açıktır.

Soğuk ile 0,5 mM SA arasında karşılaştırma yapıldığında 6 kDa civarındaki polipeptid de biraz artış 14 ile 24 kDa arasındaki polipeptidlerde ise bir seyrelme olduğu söylenebilir. 1mM SA ile soğuk kıyaslandığında da 6 kDa luk polipeptid zincirinde bir yoğunlaşma olduğu söylenebilir. Ayrıca 1mM SA nın 0,5 mM SA ya göre polipeptid zincirlerinin miktarını daha fazla artırdığı görülmektedir.



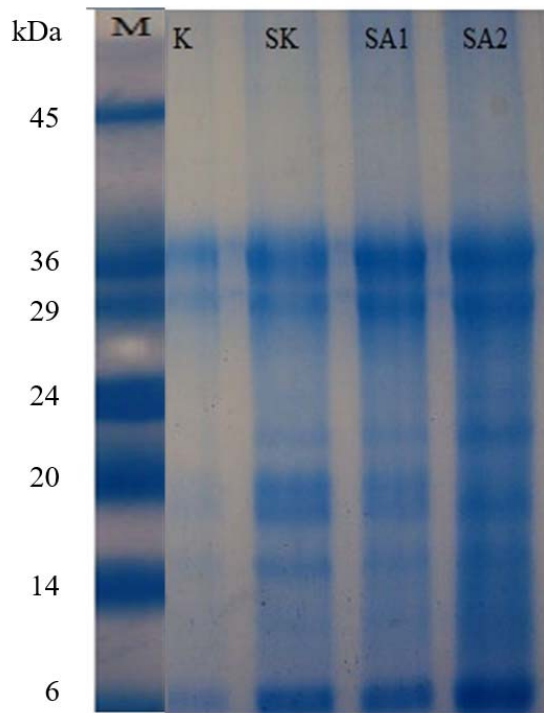
Şekil 28. 24 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü

* M: Standart Proteinler, K: Kontrol, SK: Soğuk Kontrol, SA1: Soğuk + 0.5 mM SA, SA2: Soğuk + 1 mM SA.

24 günlük mısır (Hibrit) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-PAGE fotoğrafına bakıldığında mol kütlesi bilinen standart polipeptidlerin jelde yürüme mesafeleri ile karşılaştırılırsa yaklaşık 6 kDa ile 40 kDa arasında kütleye sahip polipeptidler olduğu görülür. Ayrıca kontrol ile soğuk arasında ve soğuk ile soğuk+SA uygulanmış yaprakların apoplastik proteinlerinin oluşturduğu bantlar arasında bariz farklar görülmektedir.

Kontrol grubunda 6 kDa 36 kDa ve 40 kDa civarında belirgin bantlar bulunurken 14 ile 24 kDa arasında zayıf bantlar görülmektedir. Soğuk uygulanmış bitkilerle kontrol grubu kıyaslandığında da kontrolde var olan bütün bantların varlığı devam etmekle birlikte bantlarda bir koyulaşma olduğu açıktır.

Soğuk ile 0,5 mM SA karşılaştırıldığında SA uygulamasının bariz bir etkisi görülmemektedir. 1 mM SA ile soğuk kıyaslandığında da yaklaşık 30-40 kDa arasındaki iki banttaki polipeptid miktarında artış görülmektedir. Diğer bantlarda ise bariz değişiklik yapmamıştır.



Şekil 29. 31 günlük mısır (Hibrit) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü

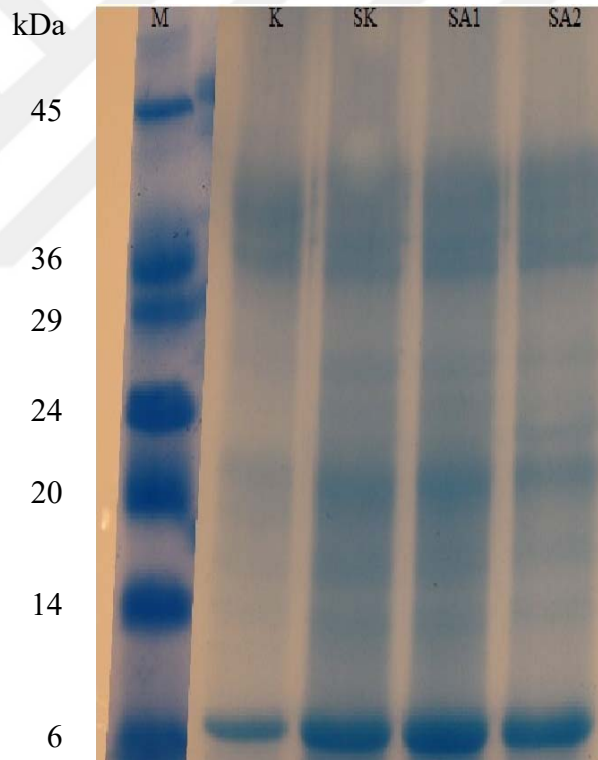
* M: Standart Proteinler, K: Kontrol, SK: Soğuk Kontrol, SA1: Soğuk + 0.5 mM SA, SA2: Soğuk + 1 mM SA.

31 günlük mısır (Hibrit) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-PAGE fotoğrafına bakıldığında mol kütlesi bilinen standart polipeptidlerin jelde yürüme mesafeleri ile karşılaştırılırsa yaklaşık 6 kDa ile 40 kDa arasında kütleye sahip polipeptidler olduğu görülür. Ayrıca kontrol ile soğuk arasında ve soğuk ile soğuk+SA uygulanmış yaprakların apoplastik proteinlerinin oluşturduğu bantlar arasında bariz farklar görülmektedir.

Kontrol grubunda 6 kDa, 29 kDa ve 36 kDa civarında belirgin bantlar bulunurken 14 ile 24 kDa arasında çok zayıf bantlar görülmektedir. Soğuk uygulanmış bitkilerle kontrol grubu kıyaslandığında kontrolde var olan bütün bantların varlığı devam etmekle birlikte 20 ile 24 kDa arasında ekstra bir bantın varlığı görülmektedir. Ayrıca soğuk uygulamasıyla tüm bantlarda bir koyulaşma olduğu görülmektedir.

Soğuk ile 0,5 mM SA karşılaştırıldığında SA uygulamasının 29 ve 36 kDa civarındaki polipeptid miktarını bariz artırdığı ancak 14 ile 24 kDa arasındaki polipeptid miktarını azalttığı söylenebilir. 1 mM SA ile soğuk kıyaslandığında tüm polipeptidlerin miktarının artırmış olduğu görünmektedir. Ayrıca 1 mM SA uygulamasının 0,5 mM SA uygulamasına göre polipeptid miktarını artırmada daha etkili olduğu görünmektedir.

Mısır (Arifiye) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçları



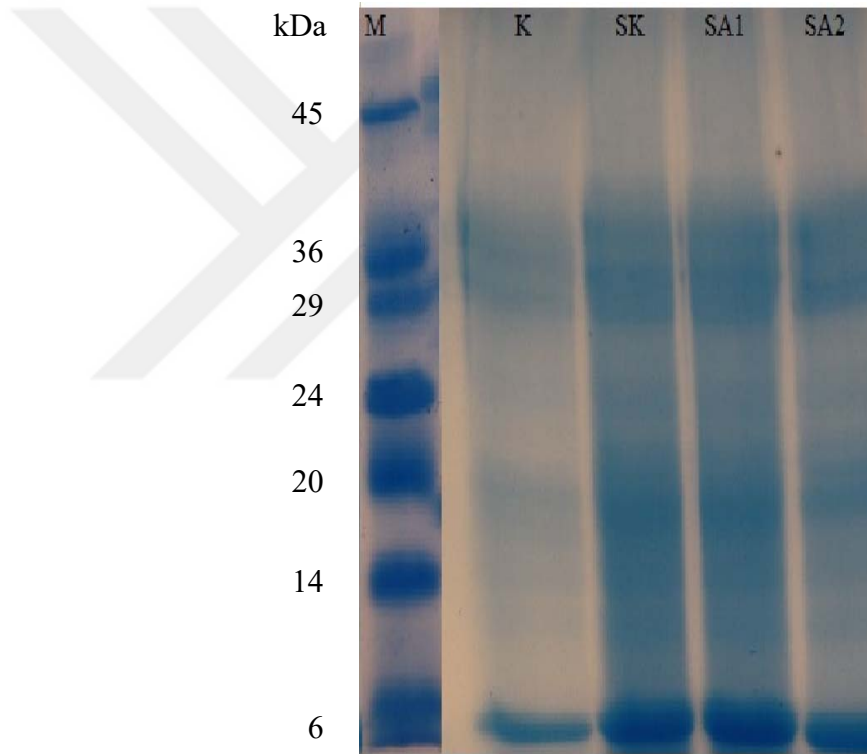
Şekil 30. 10 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü

* M: Standart Proteinler, K: Kontrol, SK: Soğuk Kontrol, SA1: Soğuk + 0.5 mM SA, SA2: Soğuk + 1 mM SA.

10 günlük mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-PAGE fotoğrafına bakıldığında mol kütlesi bilinen standart polipeptidlerin jelde yürüme mesafeleri ile karşılaştırılırsa yaklaşık 6 kDa ile 40 kDa arasında kütleyle sahip polipeptidler olduğu görülür. Ayrıca kontrol ile soğuk arasında ve soğuk ile soğuk+SA uygulanmış yaprakların apoplastik proteinlerinin oluşturduğu bantlar arasında bariz farklar görülmektedir.

Kontrol grubunda 6 kDa, 30 kDa ve 40 kDa civarında belirgin bantlar bulunurken 14 ile 24 kDa arasında çok zayıf bantlar görülmektedir. Soğuk uygulanmış bitkilerle kontrol grubu kıyaslandığında da kontrolde var olan bütün bantların varlığı devam etmekle birlikte özellikle 6 kDa luk polipeptid miktarındaki artış çok belirgindir. Ayrıca soğuk uygulaması diğer bantlardaki polipeptid miktarında da artışa neden olmuştur.

Soğuk ile 0,5 mM SA uygulaması karşılaştırıldığında SA uygulamasının 6 kDa luk polipeptid miktarında artışa sebep olduğu görülmekte iken diğer bantlarda bariz değişikliğe sebep olmamıştır. 1 mM lık SA uygulaması soğuk ile kıyaslandığında ise 14 ile 24 kDa arasındaki polipeptid miktarlarının azaldığı söylenebilir. Yine özellikle 6 kDa luk polipeptid miktarındaki artış bariz olmakla birlikte 0,5 mM SA uygulaması 1mM SA uygulamasına göre polipeptid miktarlarını daha fazla artırmıştır.



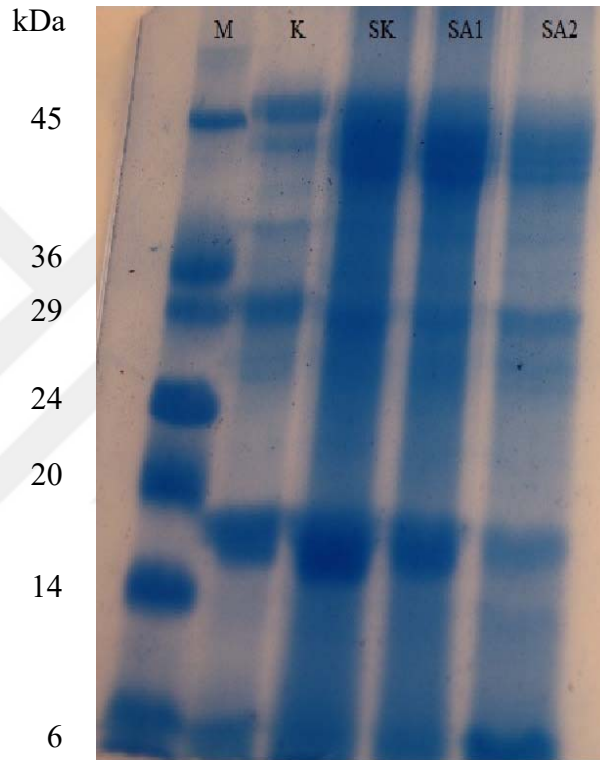
Şekil 31. 17 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü

* M: Standart Proteinler, K: Kontrol, SK: Soğuk Kontrol, SA1: Soğuk + 0.5 mM SA, SA2: Soğuk + 1 mM SA.

17 günlük mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-PAGE fotoğrafına bakıldığında mol kütlesi bilinen standart polipeptidlerin jelde yürüme mesafeleri ile karşılaştırılırsa yaklaşık 6 kDa ile 40 kDa arasında kütleye sahip polipeptidler olduğu görülür. Ayrıca kontrol ile soğuk arasında ve soğuk ile soğuk+SA uygulanmış yaprakların apoplastik proteinlerinin oluşturduğu bantlar arasında bariz farklar görülmektedir.

Kontrol grubunda 6 kDa, 30 kDa ve 40 kDa civarında belirgin bantlar bulunmaktadır. Soğuk uygulanmış bitkilerle kontrol grubu kıyaslandığında da kontrolde var olan bütün bantların varlığı devam etmekle birlikte özellikle 6 kDa luk polipeptid miktarındaki artış çok belirgindir. Ayrıca soğuk uygulaması diğer bantlardaki polipeptid miktarında da artışa neden olmuştur.

Soğuk ile 0,5 mM SA uygulaması karşılaştırıldığında SA uygulaması polipeptid miktarlarında bariz değişikliğe sebep olmamıştır. 1 mM lık SA uygulaması soğuk ile kıyaslandığında da da belirgin bir değişiklik göze çarpmamaktadır.



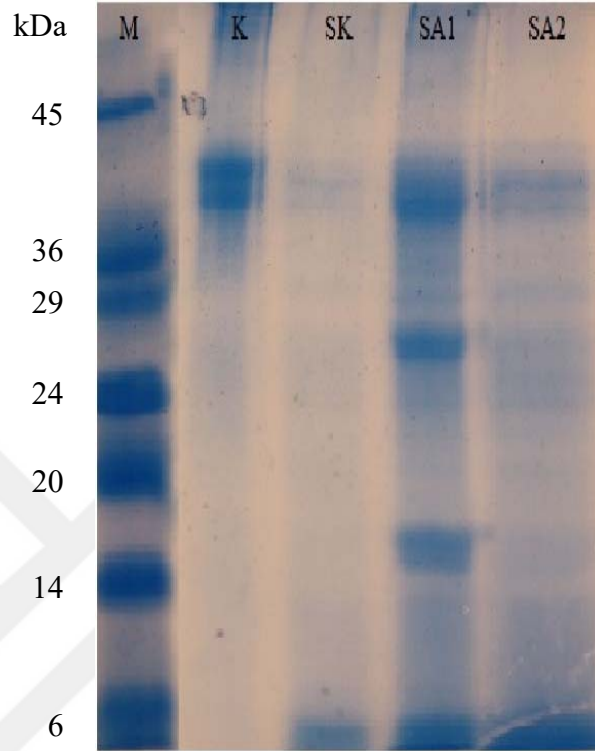
Şekil 32. 24 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü

* M: Standart Proteinler, K: Kontrol, SK: Soğuk Kontrol, SA1: Soğuk + 0.5 mM SA, SA2: Soğuk + 1 mM SA.

24 günlük mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-PAGE fotoğrafına bakıldığında mol kütlesi bilinen standart polipeptidlerin jelde yürüme mesafeleri ile karşılaştırılırsa yaklaşık 6 kDa ile 45 kDa arasında kütleye sahip polipeptidler olduğu görülür. Ayrıca kontrol ile soğuk arasında ve soğuk ile soğuk+SA uygulanmış yaprakların apoplastik proteinlerinin oluşturduğu bantlar arasında bariz farklar görülmektedir.

Kontrol grubunda 6 kDa, 18 kDa, 29 kDa ve 45 kDa civarında belirgin bantlar bulunmaktadır. Soğuk uygulanmış bitkilerle kontrol grubu kıyaslandığında da 18 ve 45 kDa kütleli polipeptid miktarlarında artma görülmektedir.

Soğuk ile 0,5 mM SA uygulaması karşılaştırıldığında da SA uygulaması 18 kDa civarındaki polipeptid miktarında bir azalmaya sebep olmuştur. 1 mM SA uygulamasında ise 18 kDa civarındaki polipeptid miktarında azalmaya sebep olurken 6 ve 29 kDa luk polipeptid miktarını artırmıştır.



Şekil 33. 31 günlük mısır (Arifiye) yaprak apoplastından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü

* M: Standart Proteinler, K: Kontrol, SK: Soğuk Kontrol, SA1: Soğuk + 0.5 mM SA, SA2: Soğuk + 1 mM SA.

31 günlük mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS-PAGE fotoğrafına bakıldığında mol kütlesi bilinen standart polipeptidlerin jelde yürüme mesafeleri ile karşılaştırılırsa yaklaşık 6 kDa ile 40 kDa arasında kütleyle sahip polipeptidler olduğu görülür. Ayrıca kontrol ile soğuk arasında ve soğuk ile soğuk+SA uygulanmış yaprakların apoplastik proteinlerinin oluşturduğu bantlar arasında bariz farklar görülmektedir.

Kontrol grubunda 40 kDa civarında belirgin bantlar bulunmaktadır. Soğuk uygulanmış bitkilerde ise kontrole göre 40 kDa civarında bulunan iki polipeptid miktarında da azalma olmuştur. Soğuk uygulanmış bitkilerde kontrolde bulunmayan 6 kDa kütleli polipeptid bantı görülmektedir.

Soğuk ile 0,5 mM SA uygulaması karşılaştırıldığında da SA uygulaması 18 kDa ve 25 kDa civarında kütleyle sahip yeni polipeptid oluşmasına sebep olmuştur. Ayrıca 6 ve 40 kDa civarındaki kütleyle sahip polipeptidlerin miktarını da artırmıştır. 1 mM SA uygulamasında ise yaklaşık 6 ve 40 kDa kütleli polipeptidlerin miktarında artışa sebep

olmuştur. 0,5 mM ile 1 mM SA uygulamalarını kıyaslarsak 0,5 mM SA uygulamasının apoplastik polipeptidlerin miktarını artırmada daha etkili olduğu görülmektedir.

Endojen SA sonuçları

Tablo 25. Mısır Yapraklarındaki Endojen SA Seviyeleri ($\mu\text{g/g}$ yaprak).

Günler	Şartlar	Mısır	
		<i>Zea mays</i> cv. Hibrit ($\mu\text{g/g}$ yaprak)	<i>Zea mays</i> cv. Arifiye ($\mu\text{g/g}$ yaprak)
10	Kontrol	0,035 ^{bc}	0,030 ^d
	Soğuk	0,034 ^c	0,028 ^d
17	Kontrol	0,037 ^{bc}	0,042 ^a
	Soğuk	0,035 ^{bc}	0,038 ^b
24	Kontrol	0,041 ^{ab}	0,040 ^{ab}
	Soğuk	0,040 ^{ab}	0,037 ^{bc}
31	Kontrol	0,039 ^{ab}	0,038 ^b
	Soğuk	0,040 ^{ab}	0,037 ^{bc}

* Tabloda farklı harflerle gösterilen veriler arasındaki fark Duncan testine göre önemlidir ($p < 0.05$)

Hibrit ve Arifiye çeşidi mısır yapraklarındaki endojen SA seviyelerinin soğuk strese tepkisini belirlemek için serbest SA içerikleri incelenmiştir. Sonuçlar, Hibrit çeşidinde 10. günde soğuk uygulama ile kontrol karşılaştırıldığında azaldığını göstermiştir. Arifiye çeşidinde ise tüm günlerde serbest SA içeriğinde kontrole göre azalma görülmüş ancak 10. günde azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

TARTIŞMA-SONUÇ

Bitki büyümesi, hem bitkilerin yetiştirileceği coğrafi aralığa hem de potansiyel verimi belirleyen sıcaklığa büyük ölçüde bağlıdır. Tropikal bölgeler dışında, sıfırın altındaki sıcaklıklar hemen hemen her yerde meydana gelebilir ve bu da donma hasarını küresel bir sorun haline getirir. Bitkilerin soğuğa dayanıklılığı tolere edebildikleri düşük sıcaklık stresi düzeyine bağlı olarak değişir. Tütün, domates, patates, mısır ve elma gibi pek çok ılıman tarımsal mahsul "çok hassas" veya "yarı dayanıklı" olarak kabul edilir ve 0 ile 4 °C arasında donma hasarına maruz kalırlar (Bredow and Walker, 2017).

Tez çalışması kapsamında düşük sıcaklıklara hassas iki çeşit mısıra önce yapraklara püskürtmek suretiyle SA uygulanıp daha sonra farklı zaman periyotlarında bu bitkiler soğuk strese maruz bırakıldı. Soğuk stresin ve SA uygulamasının apoplastik bölgeye etkisini belirlemek amacıyla % donma hasarı, buz nükleasyon aktivitesi, apoplastik SOD, POD, CAT antioksidan enzimlerinin aktivitesi ve apoplastik proteinlerin elektroforezleri incelendi. Ayrıca oksidatif stres belirteçleri olan lipid peroksidasyon ve hidrojen peroksit miktarı da belirlendi. Bunun yanında literatürde hakkında çok kısıtlı çalışma bulunan soğuğun endojen SA'yı nasıl etkilediği ile ilgili çalışma da yapılmıştır. Ayrıca, bitkilerin soğuk toleransının artırılmasında, salisilik asidin hem en etkili olduğu konsantrasyon hem de etki süresi belirlendi. Çalışmanın sonucunda SA'nın apoplastik bölgeyi nasıl etkilediği belirlendiği için tez kapsamında elde edilen bulguların soğuğa hassas bitkilerin soğuğa cevap mekanizmasının anlaşılmasında yardımcı olacağı düşünülmektedir. Çalışma sonucu elde edilen bulgular ve konuyla ilgili diğer çalışmalara ait değerlendirmeler aşağıda sunulmuştur.

Donma Hasarı Sonuçları ve İlgili Çalışmalar

Donma hasarı 0 ile 15 °C arasındaki sıcaklıklarda meydana gelebilir (Kratsch and Wise 2000; Allen and Ort 2001). Düşük sıcaklık sebebiyle yaprak klorofil içeriğinde azalma, solma, kloroz ve nekroz dahil olmak üzere fenotipik stres semptomları olabildiği gibi doymamış yağ asidi içeriklerindeki azalmalar ve hücre zarlarının geçirgenliğindeki artışlar gibi farklı metabolik modifikasyonlar da tetiklenebilir. Elektrolit sızıntısı, hücre zarlarının yarı geçirgenlik kaybının bir ölçüsüdür ve zar hasarının bir göstergesi olarak kabul edilir. Aynı zamanda donma hasarının bir göstergesi olarak da kullanılır (McCollum and McDonald, 1991).

10. günde hasat edilen hibrit mısır yapraklarının donma hasarı sonuçlarına bakıldığında genel olarak SA uygulamasının etkisi görülmekle beraber düşük SA konsantrasyonlarının etkili olmadığı, 0,5 ve 1mM SA'nın daha etkili olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). 17. günde hasat edilen hibrit mısır yapraklarının donma hasarı sonuçlarına bakıldığında SA'nın bariz bir etkisinin olmadığı görülmektedir (Tablo 2). 24. günde hasat edilen hibrit mısır yapraklarının donma hasarı sonuçlarına bakıldığında SA'nın 0,5 ve 1 mM konsantrasyonları hemen hemen tüm sıcaklıklarda donma hasarını arttırırken, 0,01 mM uygulama etkisiz, 0,1 mM uygulamada ise donma hasarının azaldığı ve geciktiği görülmektedir (Tablo 3). 31. günde hasat edilen hibrit mısır yapraklarının donma hasarı sonuçlarına bakıldığında SA uygulamalarının tüm konsantrasyonlarda donma hasarını azaltmada etkili olduğu görülmektedir (Tablo 4).

Hibrit mısırdaki 17 günlük bitki yaprakları 10 günlüklerle kıyaslandığında bitkinin kendisini toparlayabilmesi için kritik bir değer olarak kabul edilen %50'lik donma hasarına ulaşması gecikmiştir. 31 günlük bitkilerde ise donma hasarı ortalaması en düşük değere ulaşmıştır. Buna göre bitki büyüme periyodu arttıkça donma hasarı düşmüştür.

Arifiye bitkisinin donma hasarı sonuçlarına göre tüm günlerde donma hasarını azaltma ve geciktirme açısından en etkili konsantrasyonun 0,5 mM olduğu görülmektedir. Arifiye mısır türünde bitki büyüme periyodu arttıkça hibrit türün tersine donma hasarı ortalaması artış göstermiştir. 10 günlük arifiye türünün ortalama donma hasarı hibrit türünün ortalama donma hasarı ile yakınken diğer günlerde arifiye türünün ortalama donma hasarı hibrit türüne göre daha yüksektir (Tablo 5-8).

SA uygulaması ve/veya soğuk uygulama içeren çeşitli çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Kışlık buğdayda (*Triticum aestivum* cv. Doğu-88) kontrol (20/18 °C-15, 30 ve 45 gün için) ve soğuk (15 gün için 15/10 C, 30 gün için 10/5 C ve 45 gün için 5/3 C) şartlarda salisilik asitin (SA) (0,01, 0,1 ve 1 mM) donma toleransı üzerinde etkilerinin araştırıldığı çalışmada SA uygulaması yapılmayan her bir bitki grubundan (15, 30 ve 45 günlük) en yüksek donma hasarı değeri %100 donma hasarı olarak kabul edilmiştir. 15 gün sonra çıkarılan yapraklar için 0,01 mM SA uygulaması donma hasarını kontrol sıcaklığında SA'sız değere kıyasla %18 ve soğuk kontrole kıyasla %25 azalttığı bulunmuştur. 15/10 °C'de donma hasarı, 1 mM SA uygulaması ile 0,01 mM SA uygulamasında %19, 0,1 mM SA uygulamasında %24 ve 1 mM SA uygulamasında %22 azalmıştır. 30 gün sonra çıkarılan yapraklar için, donma hasarı (10/5 °C) 0,01 mM ile %19, 0,1 mM ile %24 ve 1 mM %22 azalmıştır. 45 gün sonra çıkarılan yapraklar için donma hasarı, kontrol sıcaklığında SA'sız

değere kıyasla (5/3 °C) %51 azalmıştır. 30 ve 45 gün sonra çıkarılan yapraklar için donma hasarı, soğuk (10/5 C) ve (5/3C) iklimlendirmeleri altında SA uygulamaları ile değişmediği bulunmuştur (Taşgın *et al.* 2003).

Kitosanlı ve kitosansız salisilik asidin veya kitosan-g salisilik asit kompleksinin, 2 °C'de 12 gün artı 20°C'de 2 gün depolanan salatalığın üşüme hasarı ve hasat sonrası kalitesi üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada SA tedavisinin salatalığın donma hasarı semptomlarını hafiflettiği bulunmuştur. Kontrol ile karşılaştırıldığında, kitosan-g salisilik asit kompleksi ile kaplanmış salatalık önemli ölçüde ($p<0,05$) daha az ağırlık kaybı sergilemiştir. 12. günde kontrol, kitosansız ve kitosanlı salisilik asit uygulanan salatalığın ağırlık kaybı sırasıyla %3,52, %3,44 ve %2,71'e ulaşırken, kitosan-g salisilik asit kompleksi ile kaplanan salatalığın ağırlık kaybı sadece %2,29 olmuştur (Zhang *et al.* 2015).

Erik meyvesindeki elektrolit sızıntısı, soğuk depolamanın ilk 30 günü boyunca biraz arttığı, ancak daha sonra keskin bir şekilde arttığı belirlenmiştir. SA ile işlenen meyvenin benzer bir eğilim gösterdiği, ancak SA uygulama sonucu 60. günde kontrole göre yaklaşık %77'si kadar sızıntı artışını engellediği bulunmuştur (Luo *et al.* 2011).

Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve salisilik asitin (SA) fizyolojik rolünü karşılaştırmak için iki domates çeşidinde (Streenb ve Floridat) yapılan çalışmada SA uygulamasının domates yaprağı dokularında elektrolit sızıntıyı azalttığı bulunmuştur. Bunun sonucu olarak SA uygulamasının domates bitkilerinin zar fonksiyonlarını düzenlediği belirtilmiştir (Orabi *et al.* 2015).

Buğday fidelerinde salisilik asit (SA) uygulamasının etkilerini incelemek için iki farklı deney kullanılan çalışmada ilk yöntemde, kökler 0, 0,25 ve 2,5 mM SA içeren Hoagland besin çözeltisine daldırılmıştır. İkinci yöntemde ise, iki haftalık fidelere aynı SA konsantrasyonları püskürtülerek uygulama gerçekleştirilmiştir. Ölçülen elektrolit sızıntı her iki yöntemde de kontrole göre 0,25 mM SA konsantrasyonunda azalırken 2,5 mM SA konsantrasyonunda artmıştır (Chen *et al.* 2016)

Soğuk ve salisilik asit (SA) uygulamanın donma stresi altındaki buğday yapraklarında etkilerinin incelendiği çalışmada elektrolit sızıntı ölçülmüş ve kontrolde maksimum hasarın %50'sine ulaşılan sıcaklık -4,4 °C iken soğukta -5,3 °C, soğuk+SA uygulamasında -5,8 °C'ye düşmüştür. SA ve soğuk uygulamanın buğday yapraklarında donmaya bağlı doku dehidrasyonunu azaltabileceği sonucuna varılmıştır (Wang *et al.* 2022).

Bahsi geçen çalışmalara bakıldığında soğuk uygulamasının donma hasarını artırması çalışmamızla paralellik göstermektedir. Yine ilgili çalışmalara bakıldığında SA

uygulamasının genellikle donma hasarını azalttığı fakat yüksek konsantrasyonlarda hasarı artırdığı görülmektedir. Tez çalışmamızda da bu literatür bilgileriyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Literatürde soğuğa hassas bitkilerde zamana bağlı donma hasarının nasıl değiştiğini gösteren çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu açıdan tez çalışmasının sunduğu bulgular literatüre önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Buz Nükleasyon Aktivitesi Sonuçları ve İlgili Çalışmalar

Bitki hücrelerine verilen hasar, her zaman, hücre dışı boşlukta buz kristallerinin büyümesini takiben ortaya çıkar (Guy, 1990; Pearce and Ashworth, 1992; Wisniewski *et al.* 1997). Daha küçük olanlar pahasına büyük buz kristallerinin büyümesi, buzun yeniden kristalleştirilmesi olarak bilinen termodinamik olarak uygun bir işlemle gerçekleşir. Hücreler, yeniden kristalleşmiş buzdan çözünen maddelerin dışlanması dayattığı ozmotik dengesizliğin neden olduğu hücre içi suyun tutulmasından kaynaklanan mekanik hasara veya hücrel dehidrasyona maruz kalabilir (Steponkus 1984; Pearce 2001).

Buz çekirdeklenme bölgesi ve çekirdeklenmenin meydana geldiği sıcaklık, donma hasarı ölçüsünün önemli bir belirleyicisidir. Buz kristalleri, su molekülleri birleşerek bir "buz çekirdeği" oluşturmak üzere birleştiğinde oluşur ve çevredeki su için bir buz kristali kafesi oluşturmak üzere bir başlangıç noktası görevi görür. Homojen çekirdeklenme sıfırın altındaki çok düşük sıcaklıklarda kendiliğinden oluşabilir. Bununla birlikte, buz kristali oluşumu, toz, tuzlar, organik moleküller veya buz çekirdeği aktif (INA) bakterilerin varlığıyla katalize edilen heterojen çekirdeklenme ile daha yüksek sıcaklıklarda meydana gelir (Pearce 2001). Bununla birlikte, çekirdeklenme, buzun stoma açıklıkları, hidatodlar veya kütikül yüzeyindeki çatlaklardan girmesiyle, bitki dokularının yüzeyinde içsel veya dışsal olarak meydana gelebilir (Ashworth and Kieft 1995; Wisniewski and Fuller 1999; Pearce and Fuller 2001).

Apoplast genellikle daha yüksek bir donma sıcaklığına sahip olduğu ve dışsal buz çekirdekleyicileri için ilk erişim noktası olduğu için, buz kristalleri tipik olarak ilk olarak apoplastik boşlukta ortaya çıkar. Bununla birlikte, sıcaklıklar hızla düşerse, hücre içi buz kristalleri de oluşabilir ve bu da geri dönüşü olmayan hücre hasarına neden olabilir (Steponkus, 1984). Bu nedenle apoplast, hayati hücre içi bileşenler ile dış çevre arasında bir sınır görevi görür ve hayatta kalmak için buz çekirdeklenmesi apoplast ile sınırlandırılmalıdır. Tez çalışması kapsamında buz nükleasyon aktivitesi olarak tanımlanan ilk çekirdeklenme sıcaklığı, apoplast bölgeden ekstrakte edilen protein çözeltilerinin donma noktası ölçülerek belirlenmiştir.

Sonuçlara bakıldığında hibrit yapraklarında tüm günlerdeki apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktiviteleri soğuk uygulamasından etkilenmemiştir. 10 ve 17 günlük bitki yapraklarında SA uygulaması aktiviteyi etkilemezken 24 ve 31 günlük bitkilerde ise SA uygulanmış yapraklardaki aktiviteler soğuğa kıyasla artmıştır (Tablo 9).

Buradaki sonuçlar bize SA'nın uygulanmasından 15 gün ve 22 gün sonra bile donma noktasını önemli ölçüde düşürecek kadar etkili olduğunu göstermiştir. Donma hasarı deneyleriyle paralellik gösteren bir sonuçta 0,5 mM lık SA uygulamasının daha etkili olmasıdır.

Bu deney sonuçlarında dikkat çeken durumlardan biride şudur: 10 ve 17 günlük bitkilerde uygulanan SA'nın etkisiz, 24 ve 31 günlük bitkilerde etkili olması yapraklara verilen eksojen SA'nın bizzat kendi etkisinin olmadığını ve bir sinyal molekülü olarak difüze olup çeşitli yolları aktive ettiğinin bir göstergesidir.

Arifiye yapraklarında apoplastik proteinlerin buz nükleasyon aktivitesine bakıldığında soğuk uygulamasının 10 ve 17 günlüklerde aktiviteyi artırdığı, 24 ve 31 günlüklerde ise aktivitenin azaldığı görülmektedir. SA uygulamalı bitkilerin aktiviteleri SA'sız soğuk kontrol bitkileri ile kıyaslandığında, 10 günlük bitkilerdeki aktivitenin etkilenmediği, 17 günlük bitkilerde azaldığı, 24 günlük bitkilerde ise SA uygulamalarının aktiviteyi artırdığı görülmektedir. Yine 31 günlük bitkilerde SA uygulamasının soğuğa kıyasla aktiviteyi azalttığı söylenebilir (Tablo 10).

SA uygulaması ve/veya soğuk uygulama içeren çeşitli çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Buğday yapraklarının apoplast bölgesinden elde edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesinin belirlendiği çalışmada, kontrol (20/18 °C for 15, 30 and 45-day), soğuk (15/10 °C for 15-day, 10/5 °C for 30-day and 5/3 °C for 45-day) ve soğuk+SA şartlarında çalışma gerçekleştirilmiştir. 15 gün sonra hasat edilen yapraklarda kontrol şartlarında yetiştirilen SA uygulamalı yapraklardan elde edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi SA uygulanmayanlara göre 1,5 °C artmıştır. Soğuk şartlarda (15/10 °C) yetiştirilen SA uygulamalı yapraklardan elde edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesi SA uygulanmayanlara göre 2,5 °C artmıştır. 45 günlük bitkilerde SA uygulaması kontrol şartlarında buz nükleasyon aktivitesini artırırken soğuk şartlarda değiştirmemiştir (Taşgın *et al.* 2003).

10, 17, 24 ve 31 günlerde hasat edilen iki çeşit arpa (Tokak ve Akhisar) yapraklarının apoplast bölgesinden elde edilen proteinlerin buz nükleasyon aktivitesini soğuk ve soğuk+SA

uygulamasının nasıl değiştirdiği belirlenmiştir. Tokak çeşidinde soğuk uygulama 10 ve 17. günde aktiviteyi artırırken 24 ve 31. günde azaltmıştır. Akhisar çeşidinde soğuk uygulama 10, 17 ve 24 günlük yapraklarda aktiviteyi artırırken 31 günlükte etkili olmamıştır. Soğuk+SA uygulaması Tokak çeşidinde buz nükleasyon aktivitesini tüm günlerde artırırken, Akhisar çeşidinde sadece 10 günlük yapraklarda aktiviteyi artırmıştır (Mutlu 2009).

Apoplastik Enzim Aktivitesi Sonuçları ve İlgili alışmalar

Soğuk stres, bitkilerde oksidatif hasara neden olan singlet oksijen, $O_2^{\bullet}$, H_2O_2 ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimini indükleyebilir (Lyons, 1973). Hücrelerin soğuk stres altında oksidatif hasardan korunmasının, soğuğa direncinin ana mekanizması olduğu ve bu direncin muhtemelen antioksidan enzim aktivitesi seviyesine bağlı olduğu düşünülmektedir (Wang & Baker, 1979). Bitki dokuları, SOD, CAT, POD, vb. dahil olmak üzere ROS'u temizleyebilen çeşitli enzimler içerir. ROS, bu antioksidan enzimler tarafından temizlenebilir ve H_2O_2 'nin bitki dokularındaki zararlı etkilerini önleyebilir. SOD, süper oksit anyonunu ($O_2^{\bullet-}$), H_2O_2 'ye dönüştürerek hücreleri oksidan streten koruyabilir (Mittler 2002). Bu antioksidan enzimler apoplast bölgede de lokalize olmuştur. Tez alışması kapsamında soğuk ve soğuk+SA uygulanmış mısır yapraklarının apoplast bölgesinde SOD, CAT ve POD aktiviteleri incelenmiştir.

Mısır hibrit yapraklarından elde edilen apoplastik SOD aktivitelerine bakıldığında 10, 17, 24 ve 31. günlerin tümünde soğuk uygulamasının kontrole göre aktiviteyi önemli ölçüde artırdığı görülmektedir. SA uygulamalı yaprakların sonuçları soğuk ile kıyaslandığında her iki konsantrasyonun tüm günlerde aktiviteyi çok ciddi oranda artırdığı görülmektedir. Ancak 0,5 mM SA nın 1 mM SA uygulamasından daha etkili olduğu tespit edilmiş ve bu fark yine tüm büyüme periyotlarında grlmştır (Tablo 11). Ayrıca SA uygulamasının hemen bir gün sonrasında ve hatta 22 gün sonra bile apoplastik SOD aktivitesini önemli ölçüde artırdığı grlmştır (şekil 17).

Soğuk uygulaması arifiye mısır türünde 10, 17 ve 24 günlük bitkilerde apoplastik SOD aktivitesinde önemli artışlara sebep olmuştur. 31 günlük bitkideki değişim ise istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir. SA uygulanmış bitkilerle soğuk uygulanmış bitkilerin aktiviteleri karşılaştırıldığın da 0,5 mM lık SA uygulaması 10 günde aktiviteyi azaltırken, 17, 24 ve 31 günlük bitkilerde aktiviteyi artırmıştır. 1 mM lık SA uygulaması soğuk uygulanmış bitkilerin aktivitesi ile kıyaslandığında 10 ve 17 günlük bitkilerin aktivitelerinde düşüş 24 ve 31 günlüklerde ise artış olduğu görülmektedir (Tablo 14). Bu sonuçlara bakarak soğuğun ve SA'nın arifiye çeşidinde apoplastik SOD aktivitesi üzerinde etkili olduğu anlaşılmaktadır. 0,5 mM lık SA'nın etkisi ile 1mM lık SA uygulamasının etkisi kıyaslandığın da 10 ve 17.

günlerde 0,5 mM daha etkili görülürken 24 ve 31. günlerde 1 mM daha etkili görünmektedir (Şekil 19).

Mısırın hibrit çeşidinin arifiye ile kıyaslaması yapıldığında şu hususlar dikkat çekmektedir: arifiye ile hibritin kontrol şartlarında yetiştirilen bitkilerinin apoplastik SOD aktiviteleri kıyaslandığında arifiyenin tüm günlerde enzim aktivitesinin hibritten fazla olduğu görülmektedir. Soğuk uygulaması her iki varyetede aktiviteyi artırırken, aktivitenin daha fazla olması arifiyenin soğuğa olan tepkisinin daha fazla olduğunu yani daha hassas olduğunu düşündürmektedir. SA uygulamasına verilen tepkiye bakıldığında her iki konsantrasyonun hibrit çeşidinde daha etkili olduğu, aktiviteyi arifiyeye kıyasla çok daha fazla artırdığı görülmüştür (Tablo 11,14). Bu enzim aktivitesi açısından bakıldığında da önemli bir ROS süpürücü olan SOD un aktivitesinin SA'nın etkisi ile artması soğuğa tolerans geliştirmede SA'nın etkili olduğunu göstermiştir.

Mısır (Hibrit) yaprağına ait apoplastik CAT aktivitesi sonuçları farklı zamanlarda yetiştirilmiş hibrit mısır bitkilerinde belirlenememiştir (Tablo 12).

Mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen apoplastik CAT aktivitesini soğuk uygulamasının kontrol bitkisine kıyasla nasıl değiştirdiğine bakıldığında 10 günlük bitkilerde aktivitede düşüş olurken, 17, 24 ve 31 günlük aktivitelere artış olmuştur. SA uygulanmış bitkilerin apoplastik CAT aktivitesi soğuk uygulanmış bitkiler ile kıyaslandığında; 0,5 mM SA uygulaması 17. günde aktivitede azalmaya sebep olurken, 10, 24 ve 31 günlük bitkilerde aktivite artışına sebep olmuştur. 1 mM SA uygulaması soğuğa kıyasla 10, 17 ve 24. günlerde aktiviteyi azaltırken 31. günde artırmıştır (Şekil 20).

Soğuk uygulaması hibrit mısır türünde kontrol bitkisine kıyasla apoplastik POD aktivitesini 10, 17, 24 ve 31 günlerde önemli ölçüde artırmıştır. SA uygulaması hem 0,5 mM hem de 1 mM konsantrasyon da apoplastik POD aktivitesini soğuk uygulanmış bitkiye kıyasla önemli ölçüde artırmıştır. Bu artış istisnasız tüm günlerde görülmektedir. Aynı zamanda aktivite sonuçlarına bakıldığında 0,5 mM SA'nın 1 mM SA'ya göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 18).

Mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen apoplastik POD aktivitesi soğuk uygulanmış bitkiler ile kontrol şartlarında yetiştirilen bitkiler kıyaslandığında soğuk uygulamasının tüm günlerde apoplastik POD aktivitesini önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. SA uygulanmış bitkiler soğuk uygulanmış bitkilerle kıyaslandığında 0,5 mM lık SA uygulaması apoplastik POD aktivitesini tüm günlerde artırmıştır. 1 mM'lık SA uygulaması soğuk ile karşılaştırıldığında 17. günde aktiviteyi azaltırken, 10, 24 ve 31 günlüklerde aktiviteyi artırmıştır (Şekil 21).

Hibrit ile arifiye çeşitleri apoplastik POD aktivitesi açısından kıyaslandığında hem kontrol grubunda hem de soğuk uygulanmış grupta arifiyenin aktivitelerinin daha fazla olduğu görülmektedir. Ancak soğuk uygulamasına karşı apoplastik POD aktivitelerindeki oransal artışın hibrit çeşidinde daha yüksek olduğu görülmektedir. SA uygulamasının her iki konsantrasyonu soğuğa kıyasla hibrit çeşidinde aktiviteyi arifiye çeşidine göre oransal olarak daha çok artırmıştır (Tablo 13, 16).

Kışlık buğday (*Triticum aestivum* cv. Doğu-88) yapraklarında salisilik asit (SA) ve soğukun apoplastik katalaz (CAT), peroksidaz (POD) aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bitkiler, hem kontrol (30 ve 45 gün için 20/18 °C) hem de soğuk (30 gün için 10/5 °C ve 45 gün için 5/3 °C) şartlarda 10 mM SA uygulaması ile ve SA uygulaması olmadan büyütülmüştür. 45 günlük kontrol grubunda CAT, POD aktivitelerinin 30 günlük kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubuna SA uygulaması 30 ve 45. Günlerde CAT aktivitesini düşürürken POD aktivitesini artırmıştır. Soğuk uygulamada 30. Günde CAT aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmezken 45. Günde azalma gözlenmiştir. Soğuk uygulamada 30 ve 45. Günlerde POD aktivitesinde önemli ölçüde artış gözlenmiştir. SA uygulanmış ve soğuk şartlara transfer edilmiş yapraklarda SA'sız soğuk uygulanan yapraklara göre CAT ve POD aktivitesi 30 ve 45. günlerde azaldığı tespit edilmiştir (Taşgın 2003).

3 yapraklı karpuz fidelerine 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 mM SA uygulanmış, soğukta (10 °C) yetiştirilmiş ve daha sonra 1, 2, 4, 6 ve 8. günlerde hasat edilmiş sonrasında SOD, CAT ve POD aktiviteleri belirlenmiştir. SOD aktivitesi, 3 ve 4 mM SA uygulamalarında kontrole göre azalırken diğer uygulamalarda artmıştır. Hem kontrol grubunda hem de SA lı grupta 1. günde SOD aktivitesi artmış daha sonraki günlerde ise azaldığı bulunmuştur. CAT aktivitesi 2 günlük soğuk uygulamada tüm SA konsantrasyonlarında artmış ve sonraki günlerde azalmıştır. POD aktivitesi ile SA konsantrasyonu arasında ters orantı bulunmuştur. 4 mM SA uygulamasında kontrolden daha düşük POD aktivitesi gözlenmiştir (Jing-Hua *et al.* 2008).

Şeftali meyvesi ile yapılan bir çalışmada hasat sonrası meyveler 0 °C de depolanmış ve depolanmadan önce kontrol grubu, SA uygulanmış grup, sıcak inkübasyonlu ve Sıcak+ SA şeklinde deney gruplarına ayrılmış ve depolamanın çeşitli günlerinde SOD ve CAT aktivitelerine bakılmıştır. Kontrol meyvesinde ilk günlerde SOD aktivitesi değişmezken sonraki günlerde artış gözlenmiştir. Tüm depolama boyunca SOD aktivitesi SA uygulanmış grupta kontrol grubuna göre farklılık göstermemiştir. Bununla birlikte sıcaklık uygulaması ve sıcak+ SA uygulamaları depolamanın 21. gününde kontrole göre aktiviteyi sırasıyla %54 ve %69 oranında artırmıştır. CAT aktivitesi ise kontrol grubunda ilk 14 gün azalırken sonraki

günlerde artmıştır. 21 günlük bitkide kontrole göre yalnızca SA veya sıcak+SA uygulamasında CAT aktivitesi artmıştır. 35 günlük depolamadan sonra ise sıcak+SA uygulaması aktiviteyi yalnız sıcak ve kontrole göre %76 ve %99 oranında artırmıştır (Cao *et al.* 2010).

Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit ile tohum hazırlamanın etkileri incelendiği çalışmada hibrit mısır tohumları 20 ve 40 mg.L⁻¹ salisilik asit çözeltisinde 24 saat bekletilmiş ve ekim yapılmıştır. Bitkiler 4. yaprak döneminde hasat edilmiş ve bitkiler fide gücü ve antioksidan analizlerine tabi tutulmuştur. SA uygulanmayan mısır tohumları kontrol olarak kullanılmıştır. Kontrol grubunda CAT spesifik aktivitesi 15,84 U/mg protein iken 20 mg/mL SA uygulamasında 19,20 U/mg protein, 40 mg/mL SA uygulamasında 19,24 U/mg protein maksimum CAT aktivitesi gözlenmiştir. POD aktivitesi ise kontrol grubunda 4,39 U/mg protein iken 20 mg/mL SA uygulamasında 5,67 U/mg protein, 40 mg/mL SA uygulamasında 5,66 U/mg protein bulunmuştur (Ahmad *et al.* 2011).

Bir çalışmada, iki çilek çeşidinin ('Aromas' ve 'Diamante') yapraklarındaki apoplastik antioksidan enzimler ve bunların soğuğa dayanıklılık ile ilişkisi incelenmiştir. Çeşitlerin 1 yaşındaki tarla bitkilerinden tamamen genişlemiş, üniform boyuttaki yapraklar Kasım'da, Ocak'ta ve Temmuz'da toplanmıştır. Yaprak örnekleri, soğuğa dayanıklılıklarını belirlemek için 5, -5, -10, -20 ve -30 °C gibi düşük sıcaklıklara 12 saat maruz bırakılmıştır. Yaprak apoplastındaki katalaz, peroksidaz aktiviteleri soğuğa dayanıklılıktaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. Kasım ve Ocak aylarında toplanan yapraklardaki ortalama CAT aktivitesi (Ocak: 52,4 nmol/mL, Kasım: 33,9 nmol/mL) Temmuz ayında toplanan yapraklardan önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur (Temmuz: 19,2 nmol/mL). Her iki çilek çeşidinin apoplastik POD aktivitesi, Ocak ayında (0,25 ünite/mL), Kasım ayına (0,12 ünite/mL) ve Temmuz ayına (0,11 ünite/mL) göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (Turhan *et al.* 2012).

Soğuğa hassas ve dayanıklı iki çeşit arpada yapılan bir çalışmada soğuk ve soğuk + SA uygulamasının apoplastik SOD, CAT ve POD üzerinde nasıl etki ettiği incelenmiş soğuğa dayanıklı varyetede 10, 17, ve 31. günlerde soğuk uygulaması SOD aktivitesini kontrole göre düşürürken 24. günde ise artırmıştır. Soğuğa hassas Akhisar çeşidinde de soğuk uygulamasıyla tüm günlerde SOD aktivitesinde düşüş görülmüştür. Soğuk+SA uygulaması ise dayanıklı çeşitte 10 ve 24. günlerde düşüş, 17 ve 31. günlerde ise artışa sebep olmuştur. Soğuğa hassas varyetede ise Soğuk+SA uygulaması SOD aktivitesini tüm günlerde artırmıştır. Soğuğa dayanıklı varyetede 10. günde soğuk uygulaması CAT aktivitesini kontrole göre düşürürken diğer günlerde ise artırmıştır. Soğuğa hassas Akhisar çeşidinde soğuk uygulaması CAT aktivitesini 17. günde artırırken diğer günlerde azaltmıştır. Soğukta yetiştirilen bitkilere kıyasla soğuk+0,1 mM SA uygulaması ise dayanıklı çeşitte 10 ve 17.

günde CAT aktivitesini azaltırken 24 ve 31. günlerde ise artışa sebep olmuştur. Soğuğa hassas varyetede ise Soğuk+ 0,1 mM SA uygulaması CAT aktivitesini tüm günlerde artırmıştır. Soğuğa dayanıklı varyetede POD aktivitesini kontrole göre tüm günlerde artırmıştır. Soğuğa hassas Akhisar çeşidinde soğuk uygulaması POD aktivitesini 17 ve 24. günlerde artırırken diğer günlerde azaltmıştır. Soğukta yetiştirilen bitkilere kıyasla soğuk+0,1 mM SA uygulaması dayanıklı çeşitte 17. günde POD aktivitesini artırırken diğer günlerde azaltmıştır. Soğuğa hassas varyetede ise soğukta yetiştirilen bitkilere kıyasla soğuk+0,1 mM SA uygulaması POD aktivitesini 24. günde azaltırken diğer günlerde artırmıştır. Soğuk+ 1 mM SA uygulaması ise POD aktivitesini tüm günlerde artırmıştır (Mutlu *et al.* 2013).

Kitosanlı ve kitosansız salisilik asidin veya bir kitosan-g salisilik asit kompleksinin, 2 °C'de 12 gün artı 2 gün 20°C'de depolanan salatalığın donma hasarı ve hasat sonrası kalitesi üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada tek başına SA uygulamasının uygulanması, kontrole kıyasla depolama sırasında daha yüksek SOD, CAT aktivitelerine yol açtığı bulunmuştur (Zhang *et al.* 2015).

Hidrojen peroksit (H₂O₂) ve salisilik asitin (SA) fizyolojik rolünü karşılaştırmak için iki domates çeşidinde (streenb ve floridat) yapılan çalışmada floridat çeşidi, taze yaprak veya kök dokularında streenb çeşidinden daha yüksek CAT, POD aktivitesi göstermiştir. H₂O₂ uygulamaları ve SA uygulamaları, düşük sıcaklık koşullarında yetiştirilen her iki domates çeşidinin taze yaprak ve kök dokularında kontrol bitkilerine göre POD aktivitesinde önemli artışa sebep olurken CAT aktivitesinde belirgin düşüşlere neden olmuştur (Orabi *et al.* 2015).

Buğday fidelerinde salisilik asit (SA) uygulamasının etkilerini incelemek için iki farklı deney kullanılan çalışmada ilk yöntemde, kökler 0, 0,25 ve 2,5 mM SA içeren Hoagland besin çözeltisine daldırılmıştır. İkinci yöntemde ise, iki haftalık fidelere aynı SA konsantrasyonları püskürtülerek uygulama gerçekleştirilmiştir. Farklı SA konsantrasyonlarının ve uygulamalarının, buğdaydaki antioksidan enzimlerin aktiviteleri kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında, 0,25 mM SA ile muamele edilmiş bitkilerde enzimlerin spesifik aktivitelerinde önemli bir artış tespit edilmiştir. Bununla birlikte, 2,5 mM SA uygulaması, her iki uygulama yönteminde de SOD, CAT spesifik aktivitelerinde bir azalmaya neden olmuştur. Çalışma sonucu kök daldırma yönteminin genellikle yaprak spreylemeye göre antioksidan enzimlerin spesifik aktivitelerinde daha belirgin değişikliklere neden olduğu ileri sürülmüştür (Chen *et al.* 2016).

Bir çalışma, ekzojen asetilsalisilik asit (ASA) uygulamasının soğuk stresinin zararlı etkilerini azaltmadaki rolünü değerlendirmeyi amaçlamıştır. Phaseolus vulgaris L. fideleri, 0-3 mM konsantrasyonlarda yapraktan püskürtülen ASA ile muamele edilmiş ve ardından 2

veya 4 gün boyunca 4 °C'de soğuk strese tabi tutulmuştur. Uygulama sonucu antioksidan enzimler POD ve SOD'un aktiviteleri, farklı stres seviyelerine yanıt olarak önemli ölçüde ($p < 0.05$) arttığı; ancak CAT aktivitesinin azaldığı bulunmuştur. Antioksidan enzim aktivitelerinin eksojen ASA uygulamasına yanıt olarak önemli ölçüde artarak, soğuk stresin olumsuz etkilerini hafiflettiği ileri sürülmüştür (Soliman et al 2018).

Bir çalışmada, buğday fidelerine soğuğa transfer edilmeden bir gün önce 100 µM SA uygulanmış ve 7 gün soğukta yetiştirilmiştir. Daha sonra hasat edilen yapraklarda SOD aktivitelerine bakılmış hem kontrol şartlarında hem de soğuğa maruz kalan bitkilerde SA uygulaması aktiviteyi sırasıyla %60 ve %90 artırmıştır. Soğuğa maruz kalma süresi arttıkça da hem SA'lı hem SA'sız bitkilerde SOD aktivitesi artmıştır. CAT aktivitesi ise 2 gün boyunca 4 °C'de kalan bitkilerde kontrole göre yaklaşık %15 artmış, 3. ve 7. Günde düşmüştür. SA uygulamasında CAT aktivitesi, SOD aktivitesine kıyasla daha az değişmiştir. SA uygulaması soğuk uygulamadan önce CAT aktivitesini %13 artırmıştır ve soğuk uygulamada (4 °C) enzim aktivitesi SA ile muamele edilmemiş bitkilere kıyasla 3. ve 7. günde daha yüksek bulunmuştur (Ignatenko *et al.* 2019).

Lipid Peroksidasyon Aktivitesi Sonuçları ve İlgili Çalışmalar

Çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu (LPO) olarak tanımlanır ve bu yıkımın son ürünlerinden biri olan MDA miktarı ile iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

Bu çalışmada iki farklı çeşit mısır (Hibrit ve Arifiye) yapraklarında soğuk ve soğuk+SA'nın LPO üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Mısır (Hibrit) yapraklarından elde edilen lipid peroksidasyon aktivite sonuçlarına soğuk uygulamasının nasıl etki ettiğine bakıldığında; 10, 17, 24 ve 31 günlüklerde soğuk uygulamasının lipid peroksidasyon miktarını artırdığı görülmüştür. SA uygulamaları da yapraklardaki lipid peroksidasyon miktarını artırmıştır (Şekil 22).

Mısır (Arifiye) yapraklarından elde edilen lipid peroksidasyon aktivite sonuçlarına soğuk uygulamasının nasıl etki ettiğine bakıldığında; 10, 17, 24 ve 31 günlüklerde soğuk uygulamasının lipid peroksidasyon miktarını artırdığı görülmüştür. 0,5 mM'lık SA uygulaması 10 ve 24 günlük bitkilerde, 1 mM SA uygulaması ise 10 ve 17 günlüklerde LPO değerlerinin azalmasına sebep olmuşken SA uygulamaları istatistiksel olarak anlamlı değişikliğin olduğu grupta (31 günlük) LPO'yu artırmıştır (Tablo 19).

Mısır (Hibrit) ile mısır (Arifiye) çeşitleri LPO değerleri açısından karşılaştırılırsa; kontrol grubu bitkilerinin tüm günlerinde hibrit çeşidinde LPO değerlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Soğuk uygulaması her iki varyetede LPO değerini artırmıştır. Ancak yine tüm günlerde soğukun sebep olduğu LPO değerleri hibrit çeşidinde arifiyeye göre daha yüksek olmuştur. SA uygulamaları hibrit çeşidinde LPO yu hep artırmışken, arifiye çeşidinde LPO nun düştüğü gruplar görülmüştür. Soğuğa karşı toleransın oluşturulmasında LPO değerinin artması veya azalması olgularından hangisinin daha etkili olduğunu söylemek gerçekten güçtür. LPO'nun artması sinyal moleküllerinin aktive olmasını tetikleyebilir ya da LPO'nun azalması hücre zarının permabilitesini kontrol altında tutarak geçişlerin daha düzenli olmasını sağlıyor veya sekresyona uğrayacak salgıların düzenli salınmasını sağlıyor olabilir (Tablo 17, 19).

LPO üzerine literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızla ilgili olanlar şöyle özetlenmiştir:

Soğuğa hassas ve dayanıklı olan farklı iki arpa varyetesinde yapraklarda ki LPO değerlerinin soğuktan ve SA uygulamasından nasıl etkilendiği çalışılmış ve her iki çeşitte soğuk uygulaması LPO değerini artırmıştır. SA uygulamaları da LPO aktivitesini düşürmüştür (Mutlu *et al.* 2013).

Farklı iki pirinç varyetesinde hem kontrol şartlarında hem de 150 mM NaCl uygulamasında SA nın MDA miktarını nasıl değiştirdiği araştırılmış ve kontrol şartlarına göre tuz uygulamasının MDA miktarını artırdığı ve uygulanan SA nın ise MDA miktarını azalttığı tespit edilmiştir (Sheteiwy *et al.* 2019).

Soğuğa transfer edilmeden bir gün önce 0 μ M ve 100 μ M SA solüsyonuna alınan buğday fideleri soğukta yetiştirilmiş ve MDA içeriği ölçülmüştür. Buğday yapraklarında soğuk uygulamasının MDA miktarını kontrole göre artırdığı gözlenmiştir. Ancak soğuğa maruz kalma süresi 2 güne ulaştığında MDA miktarı en fazla değerine ulaşmış daha sonra ki zamanlarda yani 2 günden daha fazla soğuğa maruz kalan yapraklarda ölçülen MDA miktarı daha az olmuştur. SA uygulaması ise kontrol şartların da MDA miktarını artırırken aynı süre soğuğa maruz kalmış SA'sız yapraklara göre MDA içeriği düşmüştür (Ignatenko *et al.* 2019).

Hasat sonrası SA'sız ve 1,5 mM SA'lı erik meyveleri soğukta depolanmış ve 15, 30, 45 ve 60. günlerde MDA içeriklerine bakılmıştır. Hem SA'lı hemde SA'sız meyvelerde soğuğa maruz kalma süresi arttıkça MDA içeriği artmıştır. Ancak SA uygulamalı meyvelerde SA'sız olanlara göre MDA miktarı daha az olarak ölçülmüştür. Depolama sonunda SA'lı olan meyvelerin MDA miktarı %14 daha az bulunmuştur (Luo *et al.* 2011).

Farklı iki tür domates ile yapılan çalışmada dikimden 15 ve 30 gün sonra 0,5 ve 1 mM SA uygulaması yapılmış ve soğukta yetiştirilmiştir. SA uygulaması her iki varyetede de MDA içeriğini kontrole göre azaltmıştır (Orabi *et al.* 2015).

Hidrojen Peroksit Miktarı Sonuçları ve İlgili Çalışmalar

Mısır (Hibrit) yapraklarında belirlenen hidrojen peroksit miktarlarına soğukun, kontrol şartları ile kıyaslayıp nasıl etki ettiğine bakıldığında 24 ve 31. günlüklerde H_2O_2 miktarını artırdığı görülmektedir. 0,5 mM SA uygulaması 24 ve 31. günlerde anlamlı değişikliğe sebep olmuş ancak farklı etki göstererek 24. günde artış 31. günde azalma gözlenmiştir. 1 mM SA uygulamasında ise 24 günlüklerde anlamlı bir artışa sebep olurken 31 günlüklerde bir değişikliğe sebep olmamıştır. Ayrıca 1mM SA uygulaması yapılmış yapraklarda ki H_2O_2 miktarının 0,5 mM SA uygulamalı yapraklardakinden miktar olarak fazla olduğu belirlenmiştir (Tablo 22).

Mısır (Arifiye) yaprakların da belirlenen hidrojen peroksit miktarlarına soğukun, kontrol şartları ile kıyaslayıp nasıl etki ettiğine bakıldığında 31. günde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe sebep olmuştur. SA uygulamalarında da anlamlı değişiklik sadece 31 günlük bitkilerde olmuş ve hem 0,5 mM ve hem de 1 mM SA uygulamaları H_2O_2 miktarını artırmıştır (Tablo 24).

Farklı iki pirinç varyetesinde hem kontrol şartlarında hemde 150 mM NaCl uygulamasında SA'nın H_2O_2 miktarını nasıl değiştirdiği incelenmiş ve her iki çeşitte ve her iki şartta SA uygulamasının H_2O_2 miktarını azalttığı görülmüştür (Sheteiwy *et al.* 2019).

Soğuğa transfer edilmeden bir gün önce 0 μ M ve 100 μ M SA solüsyonuna alınan buğday fideleri soğukta yetiştirilmiş ve H_2O_2 içeriği ölçülmüştür. Soğuğa (+4 °C) transfer edilen bitkide ilk bir günde H_2O_2 miktarı artmış daha sonra soğuğa maruz kalma süresi arttıkça H_2O_2 miktarı azalmıştır. SA uygulaması H_2O_2 üzerinde etkili olmamıştır (Ignatenko *et al.* 2019).

Hasat sonrası mango meyveleri 0,00 mM ve 1 mM SA çözeltisine batırılmış, kuruduktan sonra soğuğa (+5 °C) aktarılmış ve depolanmıştır. Soğuğa maruz kalma süresi arttıkça H_2O_2 miktarı da artmıştır. Ancak SA'lı meyvelerdeki H_2O_2 içeriği SA'sız olanlara göre daha düşük bulunmuştur (Junmatong *et al.* 2015).

SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları ve İlgili Çalışmalar

Bitki apoplastı, hücre duvarı matrisini ve hücreler arası boşlukları içerir ve su ve besin taşınması, bitki-patojen etkileşimleri ve çevresel sinyallerin algılanması ve iletilmesi dahil

olmak üzere çok çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar. Bitki apoplastında bulunan proteinler, bu geniş fonksiyonel çeşitliliği yansıtır. Apoplast protein bileşiminin dinamik değişimi üzerine yapılan çalışmalar, bitkilerin abiyotik strese verdiği tepkiler, besin kaynağı, yaralanma, su eksikliği, patojen tepkisi ve ksilem bileşimi hakkında yeni bilgiler sunar (Zhang *et al.* 2009).

Tez kapsamında kontrol, soğuk, soğuk+0,5 mM SA, soğuk+1 mM SA şartlarında apoplastik proteinlerin SDS-PAGE ile analizi yapıldı. Hibrit çeşidinde tüm günlerde 6-40 kDa aralığında polipeptid varlığı saptandı. Soğuk uygulamada kontrol grubuna kıyasla elde edilen polipeptid bantların miktarında artış görülmüştür (Şekil 26-29). Ayrıca 20-24 kDa aralığında kontrol grubunda bulunmayan yeni bir polipeptidin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 29). 0,5 mM SA uygulaması ile 14-24 kDa aralığında kontrol ve soğuk uygulamada bulunmayan yeni polipeptidlerin varlığı görülmüştür (Şekil 26). 1 mM SA uygulamasının ise soğuk uygulama ile kıyaslandığında genel olarak bütün polipeptidlerin miktarında artmaya sebep olduğu söylenebilir (Şekil 26-29). Arifiye çeşidinde tüm günlerde 6-40 kDa aralığında polipeptidlerin varlığı saptandı (Şekil 30-33). Soğuk uygulamada kontrol grubuna kıyasla elde edilen polipeptid bantların miktarında artış görülmüştür özellikle yaklaşık 6 kDa kütleli polipeptidin miktarındaki artış dikkat çekmektedir (Şekil 30). Yaklaşık 18 kDa kütleli polipeptidin miktarı soğuk uygulama ile artış gösterirken her iki SA konsantrasyonunda azalmıştır. 1 mM SA uygulamasının bu azalmada etkisi daha fazladır (Şekil 32).

Bu sonuçlardan hareketle mısır yapraklarının apoplastında kontrol şartlarında polipeptidlerin var olduğu, soğukun bitkinin apoplast bölgesindeki polipeptidleri etkilediği, bu polipeptidlerin farklı kütlelere sahip olduğu, bitkiye uygulanan eksojen SA'nın bu polipeptidlerin çeşidini ve miktarını etkilediği, uygulanan SA konsantrasyonunun salınan polipeptidler üzerinde etkili olduğu söylenebilir. Bitki büyüme periyoduna bağlı olarak da polipeptidlerin çeşit ve miktarında değişiklik olduğu belirlenmiştir (Şekil 26-33).

Kontrol, kontrol+SA, soğuk ve soğuk+SA şartlarda yetiştirilen kışlık buğday yapraklarının apoplastik proteinleri SDS-PAGE ile incelendiği çalışmada polipeptitlerin moleküler kütlelerinin 20 ila 66 kDa arasında değiştiği gösterilmiştir. SA uygulamasının kontrole göre 66, 64, 36 ve 32 kDa'lık polipeptit birikimini arttırdığı belirtilmiştir. Hem soğuk uygulaması hem de soğuk+SA uygulamasının bazı polipeptitlerin birikimini arttırdığı bazılarını ise azalttığı bildirilmiştir (Taşgın 2006).

1, 3 ve 6 saat tuz uygulanan ve kontrol grubundan elde edilen pirinç kökü apoplast proteinlerinin iki boyutlu elektroforez ile analiz edildiği çalışmada her numunede yaklaşık 100 protein noktası tespit edilmiştir. Tuz stresli ve kontrol grubu numuneler arasındaki

protein ekspresyon profilleri birbirine benzer olmasına rağmen, bazı protein noktalarının tuz stresine maruz kalma süresi arttıkça önemli ölçüde değiştiğini gösterilmiştir (Zhang *et al.* 2009).

Çin'in kuzeyindeki kışlık şalgamda (*Brassica rapa* L.) soğuk uygulamanın etkisi SDS-PAGE ile incelenmiştir. Apoplastik antifriz proteinlerinin SDS-PAGE fotoğrafları incelendiğinde düşük sıcaklık stresinin protein bantlarının miktarında artışa neden olduğu bulunmuştur (Fang *et al.* 2017).

Endojen SA sonuçları

Endojen SA birikimi, bitkilerde çeşitli abiyotik stres faktörlerden etkilenebilir (Chen *et al.* 2016). Örneğin, su eksikliği ve UV-B radyasyonu altında arpa köklerinde ve yapraklarda SA birikimi indüklenmiştir (Bandurska and Cieslak 2013). Bir çalışmada 1 günlük soğuk uygulamada incelenen iki mısır çeşidinin yapraklarındaki serbest SA seviyeleri yaklaşık üç kat arttığı tespit edilmiştir. Ancak, 5 günlük soğuk stresin ardından serbest SA içeriği önemli ölçüde azalmıştır. Bu sonuç, uzun süreli soğutma stresinin (5 °C) mısır fidelerinin normal metabolizmasını bozduğunu ve dolayısıyla endojen SA biyosentezini de etkilediğini göstermiştir. Bu tez çalışmasında soğuk uygulamanın endojen SA'yı nasıl değiştirdiği incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre hibrit çeşidinde 10. günde soğuk uygulamada serbest SA içeriği azalmış, diğer günlerde değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Arifiye çeşidinde ise tüm günlerde serbest SA miktarı azalmış ancak 10. gündeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 25).

Salatalık fidelerinde endojen SA içeriğinin soğuk uygulamada değişip değişmediğinin araştırıldığı çalışmada SA seviyeleri UPLC ile hem yapraklarda hem de köklerde ölçülmüştür. Fidler 8 °C'ye maruz bırakıldığında serbest SA artmıştır. Bununla birlikte, yapraklarda ve köklerde SA birikimi farklı zaman dilimlerinde meydana gelmiştir. Yapraklarda, serbest SA kademeli olarak arttı ve 72 saatlik soğuk uygulamada zirveye (3,84 kat) ulaştı; ardından SA, uygulamanın 120. saatinde hafifçe azalmıştır (Dong *et al.* 2014).

Sonuç olarak çalışma bir bütün olarak değerlendirildiğinde soğuk uygulamanın ve SA'nın soğuğa hassas iki mısır çeşidinin hem hücresel bölgede hem de apoplastik bölgede önemli değişikliklere yol açtığı görülmüştür. Donma hasarı ve lipid peroksidasyonunun artması gibi soğüğün sebep olduğu olumsuz etkilerin, SA uygulaması ile tolere edilebildiği belirlenmiştir. Daha önce ölü bir bölge olarak kabul edilen ancak son yıllarda yapılan çalışmalarla önemi daha çok anlaşılan apoplastik bölgenin oldukça kompleks içeriği tam olarak aydınlatılamadığından çalışmalar hala devam etmektedir. Bu çalışmanın soğuğa hassas

bitkilerin soğuga cevap mekanizmasının anlaşılmasında apoplastik bölgenin fonksiyonunu açıklamaya yardımcı olacağı düşünülmektedir.



KAYNAKÇA

- Ahmad, I., Khaliq, T., Ahmad, A., Basra, S. M., Hasnain, Z., & Ali, A. (2012). Effect of seed priming with ascorbic acid, salicylic acid and hydrogen peroxide on emergence, vigor and antioxidant activities of maize. *African Journal of Biotechnology*, 11(5), 1127-1132.
- Akkuş, İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları*, Konya, 1, 57-63.
- Allen, D. J., & Ort, D. R. (2001). Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in plant science*, 6(1), 36-42.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., (2002). Role of superoxide dismutases in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, (53), 1331-1341
- Ananieva, E. A., Alexieva, V. S., & Popova, L. P. (2002). Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 159(7), 685-693.
- Ananieva, E.A., Christov K.N. and Popova L.P., (2004). Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. *Journal of Plant Physiology*, (161), 319-328.
- Anderson, M. D., Prasad, T. K., Martin, B. A., & Stewart, C. R. (1994). Differential gene expression in chilling-acclimated maize seedlings and evidence for the involvement of abscisic acid in chilling tolerance. *Plant Physiology*, 105(1), 331-339.
- Angelini, R. and Federico R., 1989. Histochemical evidence of poliamin oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *J.Plant Physiol*, (135), 212-217.
- Antikainen, M. (1996). Cold acclimation in winter rye (*Secale cereale* L.): Identification and characterization of proteins involved in freezing tolerance. *Ann. Univ. Turkuensis*, 87, 1-53.
- Asghari, M., & Aghdam, M. S. (2010). Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 502-509.
- Ashworth, E. N., & Kieft, T. L. (1995). Ice nucleation activity associated with plants and fungi. *Biological ice nucleation and its applications*, 8, 137-162.
- Atıcı, Ö., & Nalbantoğlu, B. (2003). Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry*, 64(7), 1187-1196.
- Atıcı, Ö. and Nalbantoğlu B. 1999a. Apoplastic proteins associated with the cold acclimation process in leaves. *Bio-Sci. Res. Bull*, (15), 55-60.
- Atıcı, Ö., Nalbantoğlu B., 1999b. Effect of apoplastic proteins on freezing tolerance in leaves. *Phytochemistry*, (50), 755-761.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.
- Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *Journal of biotechnology*, 53(2-3), 253-263.

- Bandurska, H., & Cieślak, M. (2013). The interactive effect of water deficit and UV-B radiation on salicylic acid accumulation in barley roots and leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 9-18.
- Barkla, B. J., & Pantoja, O. (2010). Plasma membrane and abiotic stress. In *The plant plasma membrane* (pp. 457-470). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Barman, K., and R. Asrey. 2014. Salicylic acid pre-treatment alleviates chilling injury preserve bioactive compounds and enhances shelf life of mango fruit during cold storage. *Journal of Scientific & Industrial Research* 73:713–718.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287.
- Bergmeyer, J., & Grabl, M. (1983). *Methods of enzymatic analysis*. (Third Edition), pp.190-302, Germany.
- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313-20316.
- Berwal, M., & Ram, C. (2018). Superoxide dismutase: A stable biochemical marker for abiotic stress tolerance in higher plants. *Abiotic and biotic stress in plants*, 1-10.
- Beutler, E., Blume, K. G., Kaplan, J. C., Löhr, G. W., Ramot, B., & Valentine, W. N. (1977). International Committee for Standardization in Haematology: Recommended methods for red-cell enzyme analysis. *British journal of haematology*, 35(2), 331-340.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., & Asada, K. (1994). Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(3), 199-218.
- Bredow, M., & Walker, V. K. (2017). Ice-binding proteins in plants. *Frontiers in plant science*, 8, 2153.
- Brennan, T., & Frenkel, C. (1977). Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiology*, 59(3), 411-416.
- Cabané, M., Calvet, P., Vincens, P., & Boudet, A. M. (1993). Characterization of chilling-acclimation-related proteins in soybean and identification of one as a member of the heat shock protein (HSP 70) family. *Planta*, 190(3), 346-353.
- Cadenas, E., & Sies, H. (1998). The lag phase. *Free radical research*, 28(6), 601-609.
- Cai, H., He, M., Ma, K., Huang, Y., & Wang, Y. (2015). Salicylic acid alleviates cold-induced photosynthesis inhibition and oxidative stress in *Jasminum sambac*. *Turkish Journal of Biology*, 39(2), 241-247.
- Cao, S., Hu, Z., Zheng, Y., & Lu, B. (2010). Synergistic effect of heat treatment and salicylic acid on alleviating internal browning in cold-stored peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 58(2), 93-97.
- Chang, M. Y., Chen, S. L., Lee, C. F., & Chen, Y. M. (2001). Cold-acclimation and root temperature protection from chilling injury in chilling-sensitive mungbean (*Vigna radiata* L.) seedlings. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42.
- Chaudière, J., & Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and chemical toxicology*, 37(9-10), 949-962.
- Chen, Y. E., Cui, J. M., Li, G. X., Yuan, M., Zhang, Z. W., Yuan, S., & Zhang, H. Y. (2016). Effect of salicylic acid on the antioxidant system and photosystem II in wheat seedlings. *Biologia plantarum*, 60(1), 139-147.

- Chikov, V. I., & Bakirova, G. G. (2004). Role of the apoplast in the control of assimilate transport, photosynthesis, and plant productivity. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51, 420-431.
- Chu, X. T., Fu, J. J., Sun, Y. F., Xu, Y. M., Miao, Y. J., Xu, Y. F., & Hu, T. M. (2016). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on cold stress-induced oxidative damage in leaves of *Elymus nutans* Griseb. *South African Journal of Botany*, 104, 21-29.
- Davies, M.J. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and biophysical research communications*, 305(3), 761-770.
- Dietz, K. J., Turkan, I., & Krieger-Liszkay, A. (2016). Redox-and reactive oxygen species-dependent signaling into and out of the photosynthesizing chloroplast. *Plant Physiology*, 171(3), 1541-1550.
- Dong, C. J., Li, L., Shang, Q. M., Liu, X. Y., & Zhang, Z. G. (2014). Endogenous salicylic acid accumulation is required for chilling tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Planta*, 240, 687-700.
- Du, Z., & Bramlage, W. J. (1995). Peroxidative activity of apple peel in relation to development of poststorage disorders. *HortScience*, 30(2), 205-208.
- Duran-Carril, M. V., & Bujan, C. R. (1998). Antioxidant systems in the leaf apoplast compartment of *Pinus pinaster* Ait. and *Pinus radiata* D. Don. plants exposed to SO₂. *Annals of applied biology*, 133(3), 455-466.
- Erdal, S. (2010). Memeli cinsiyet hormonlarının arpa ve nohut bitkilerinin büyüme ve gelişmeleri üzerine etkileri, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical Biology and medicine*, 11(1), 81-128.
- Ewart, K. V., Lin, Q., & Hew, C. L. (1999). Structure, function and evolution of antifreeze proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55, 271-283.
- Fang, Y., Liu, L., Sun, W., Liu, Z., Yang, G., Yuan, J., ... & Mi, C. (2017). SDS-PAGE electrophoresis analysis on apoplast antifreeze protein in winter and spring turnip rape (*Brassica rape* L.) and their first-filial generation. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 30(1), 34-39.
- Farmer, E. E., & Mueller, M. J. (2013). ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual review of plant biology*, 64, 429-450.
- Flora, S. J. S. (2007). Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cellular and Molecular Biology*, 53(1), 1-2.
- Frankel, E. N. (1984). Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Progress in lipid research*, 23(4), 197-221.
- Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 44 (1), 147-159.
- Furt, F., Simon-Plas, F., & Mongrand, S. (2011). Lipids of the plant plasma membrane. *The plant plasma membrane*, 3-30.
- García, G., Clemente-Moreno, M. J., Díaz-Vivancos, P., García, M., & Hernández, J. A. (2020). The apoplastic and symplastic antioxidant system in onion: Response to long-term salt stress. *Antioxidants*, 9(1), 67.

- Gechev, T. S., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inzé, D., Dukiandjiev, S., Toneva, V., & Minkov, I. (2002). Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59, 708-714.
- Genişel, M., 2012. Alternatif solunumun moleküler düzeyde aktifleştirilmesi ile nohut ve buğday bitkilerinin soğuk stresine karşı dirençlerinin artırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Gilroy, S., Bialasek, M., Suzuki, N., Górecka, M., Devireddy, A. R., Karpiński, S., & Mittler, R. (2016). ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant physiology*, 171(3), 1606-1615.
- Giménez, M. J., Serrano, M., Valverde, J. M., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D., & Guillen, F. (2017). Preharvest salicylic acid and acetylsalicylic acid treatments preserve quality and enhance antioxidant systems during postharvest storage of sweet cherry cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(4), 1220-1228.
- Gong, Y., Toivonen, P. M., Lau, O. L., & Wiersma, P. A. (2001). Antioxidant system level in 'Braeburn' apple is related to its browning disorder. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42.
- 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.
- Guerra-Guimaraes, L., Tenente, R., Pinheiro, C., Chaves, I., Silva, M. D. C., Cardoso, F. M., ... & Ricardo, C. P. (2015). Proteomic analysis of apoplastic fluid of *Coffea arabica* leaves highlights novel biomarkers for resistance against *Hemileia vastatrix*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 478.
- Guy, C. L. (1990). Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annual review of plant biology*, 41(1), 187-223.
- 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.
- Hahn, M., & Walbot, V. (1989). Effects of cold-treatment on protein synthesis and mRNA levels in rice leaves. *Plant Physiology*, 91(3), 930-938.
- Hale, M.G., Orcutt D.M., 1987. *The physiology of plants under stress*, John Wiley and Sons, New York, 206p.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine*, 91(3), S14-S22.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., & Aruoma, O. I. (1987). The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical biochemistry*, 165(1), 215-219.
- He, Y., Liu, Y., Cao, W., Huai, M., Xu, B., & Huang, B. (2005). Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in Kentucky bluegrass. *Crop science*, 45(3), 988-995.
- Hon, W. C., Griffith, M., Chong, P., & Yang, D. S. (1994). Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant physiology*, 104(3), 971-980.

- Huang, R. H., Liu, J. H., Lu, Y. M., & Xia, R. X. (2008). Effect of salicylic acid on the antioxidant system in the pulp of 'Cara cara' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) at different storage temperatures. *Postharvest biology and technology*, 47(2), 168-175.
- Huang, S., Van Aken, O., Schwarzl nder, M., Belt, K., & Millar, A. H. (2016). The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants. *Plant physiology*, 171(3), 1551-1559.
- Ignatenko, A., Talanova, V., Repkina, N., & Titov, A. (2019). Exogenous salicylic acid treatment induces cold tolerance in wheat through promotion of antioxidant enzyme activity and proline accumulation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(6), 1-10.
-  şeri,  . D., K rpe, D. A., Sahin, F. I., & Haberal, M. (2013). Hydrogen peroxide pretreatment of roots enhanced oxidative stress response of tomato under cold stress. *Acta physiologiae plantarum*, 35, 1905-1913.
- Jing, C. H. E. N., Cheng, Z. H. U., Li, L. P., Sun, Z. Y., & Pan, X. B. (2007). Effects of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. *Journal of Environmental sciences*, 19(1), 44-49.
- Jing-Hua, Y., Yuan, G., Yan-Man, L., Xiao-Hua, Q., & Zhang, M. F. (2008). Salicylic acid-induced enhancement of cold tolerance through activation of antioxidative capacity in watermelon. *Scientia Horticulturae*, 118(3), 200-205.
- Junmatong, C., Faiyue, B., Rotarayanont, S., Uthaibutra, J., Boonyakiat, D., & Saengnil, K. (2015). Cold storage in salicylic acid increases enzymatic and non-enzymatic antioxidants of Nam Dok Mai No. 4 mango fruit. *Science Asia*, 41(12), 12-21.
- Kadio lu, A. (2004). *Bitki fizyolojisi*. Trabzon: Lokman Yayın, 453.
- Kadioglu, A., Saruhan, N., Sa lam, A., Terzi, R., & Acet, T. (2011). Exogenous salicylic acid alleviates effects of long term drought stress and delays leaf rolling by inducing antioxidant system. *Plant Growth Regulation*, 64, 27-37.
- KAVAK IO LU, B. (2012). Isolation, purification and characterization of catalase from *Phanerochaete Chrysosporium* (Doctoral dissertation, DE  Fen Bilimleri Enstit s ).
- Kerchev, P., Waszczak, C., Lewandowska, A., Willems, P., Shapiguzov, A., Li, Z., ... & Van Breusegem, F. (2016). Lack of GLYCOLATE OXIDASE1, but not GLYCOLATE OXIDASE2, attenuates the photorespiratory phenotype of CATALASE2-deficient *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 171(3), 1704-1719.
- Khademi, O., Ashtari, M., & Razavi, F. (2019). Effects of salicylic acid and ultrasound treatments on chilling injury control and quality preservation in banana fruit during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 249, 334-339.
- Kim, K.Y., Kwon S.Y., Lee H.S., Hur Y., Bang C.W., Choi K.S. and Kwak S.S., (2000). Differential expression of four sweet potato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethephon. *Phytochemistry*, (54), 19-22.
- Koca alı kan, I. (2004). *Bitki Fizyolojisi*. 335-336 s. Dumlupınar  niv. K tahya.
- Kramer, E. M. (2006). How far can a molecule of weak acid travel in the apoplast or xylem?. *Plant physiology*, 141(4), 1233-1236.
- Kratsch, H. A., & Wise, R. R. (2000). The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell & Environment*, 23(4), 337-350.
- Kuru, H.  . (2007). Arseni in insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler  zerine etkileri, Y ksek Lisans Tezi, Dumlupınar  niversitesi Fen Bilimleri Enstit s , K tahya.
- Laemmli, D.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the heat of

- bacteriophage, T4. *Nature (London)* 227, 680-685.
- Li, Q. B., Haskell, D. W., & Guy, C. L. (1999). Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *Plant molecular biology*, 39, 21-34.
- Lu, X. H., Sun, D. Q., Mo, Y. W., Xi, J. G., & Sun, G. M. (2010). Effects of post-harvest salicylic acid treatment on fruit quality and anti-oxidant metabolism in pineapple during cold storage. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85(5), 454-458.
- Luo, Z., Chen, C., & Xie, J. (2011). Effect of salicylic acid treatment on alleviating postharvest chilling injury of 'Qingnai' plum fruit. *Postharvest biology and technology*, 62(2), 115-120.
- Luwe, M. W., Takahama, U., & Heber, U. (1993). Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant physiology*, 101(3), 969-976.
- Lyons, J. M. (1973). Chilling injury in plants. *Annual review of plant physiology*, 24(1), 445-466.
- López MA, Vicente J, Kulasekaran S, Velloso T, Martínez M, Irigoyen ML et al (2011) Antagonistic role of 9-lipoxygenase-derived oxylipins and ethylene in the control of oxidative stress, lipid peroxidation and plant defence. *Plant J* 67:447–458
- Marklund, S. L. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79 (24), 7634-7638.
- McClung, C. R. (1997). Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(3), 489-496.
- McCollum, T. G., & McDonald, R. E. (1991). Electrolyte leakage, respiration, and ethylene production as indices of chilling injury in grapefruit. *HortScience*, 26(9), 1191-1192.
- Mehta, A., Mason, P. J., & Vulliamy, T. J. (2000). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 13(1), 21-38.
- Mhamdi, A., & Van Breusegem, F. (2018). Reactive oxygen species in plant development. *Development*, 145(15), dev164376.
- Miller, D. M., Buettner, G. R., & Aust, S. D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(1), 95-108.
- Minibaeva, F. V., & Gordon, L. K. (2003). Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russian journal of plant physiology*, 50, 411-416.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490-498.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G. A. D., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., & Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave?. *Trends in plant science*, 16(6), 300-309.
- Mugdha, A., & Usha, M. (2012). Enzymatic treatment of wastewater containing dyestuffs using different delivery systems. *Sci Rev Chem Commun*, 2(1), 31-40.

- Murphy, A. S., Peer, W., & Schulz, B. (Eds.). (2010). The plant plasma membrane (Vol. 19). Springer Science & Business Media.
- Mutlu S., 2005. Tuz stresi ve salisilik asitin buğday yapraklarında apoplastik ve simplastik antioksidan enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Mutlu, S., 2009. Salisilik asidin arpada (*hordeum vulgare* l.) soğuk toleransını sağlama ve apoplastik ile simplastik proteinler üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Mutlu, S., Karadağoglu, Ö., ATICI, Ö., TAŞGIN, E., & Nalbantoğlu, B. (2013). Time-dependent effect of salicylic acid on alleviating cold damage in two barley cultivars differing in cold tolerance. *Turkish Journal of Botany*, 37(2), 343-349.
- Orabi, S. A., Dawood, M. G., & Salman, S. R. (2015). Comparative study between the physiological role of hydrogen peroxide and salicylic acid in alleviating the harmful effect of low temperature on tomato plants grown under sand-ponic culture. *Sci Agric*, 9(1), 49-59.
- Pareek, A., Singla, S. L., & Grover, A. (1998). Proteins alterations associated with salinity, desiccation, high and low temperature stresses and abscisic acid application in seedlings of Pusa 169, a high-yielding rice (*Oryza sativa* L.) cultivar. *Current Science*, 1023-1035.
- Parra-Lobato, M. C., Fernandez-Garcia, N., Olmos, E., Alvarez-Tinaut, M. C., & Gómez-Jiménez, M. C. (2009). Methyl jasmonate-induced antioxidant defence in root apoplast from sunflower seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 66(1), 9-17.
- Pasbani, B., Salimi, A., Aliasgharzad, N., & Hajiboland, R. (2020). Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi mitigates cold stress through improvement of antioxidant defense and accumulation of protecting molecules in eggplants. *Scientia Horticulturae*, 272, 109575.
- Pearce, R. S. (1999). Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant growth regulation*, 29(1), 47-76.
- Pearce, R. S. (2001). Plant freezing and damage. *Annals of botany*, 87(4), 417-424.
- Pearce, R. S., & Ashworth, E. N. (1992). Cell shape and localisation of ice in leaves of overwintering wheat during frost stress in the field. *Planta*, 188, 324-331.
- Pearce, R. S., & Fuller, M. P. (2001). Freezing of barley studied by infrared video thermography. *Plant Physiology*, 125(1), 227-240.
- Polle, A., Otter, T., & Seifert, F. (1994). Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology*, 106(1), 53-60.
- Puhakainen, T. (2004). Physiological and molecular analyses of cold acclimation of plants. University of Helsinki, Finland
- Raman, V., & Ravi, S. (2011). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(3), 1043-1049.
- Raskin, I., Turner, I. M., & Melander, W. R. (1989). Regulation of heat production in the inflorescences of an Arum lily by endogenous salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(7), 2214-2218.
- Raskin, I. (1992a). Role of salicylic acid in plants. *Annual review of plant biology*, 43(1), 439-463.
- Raskin, I. (1992b). Salicylate, a new plant hormone. *Plant physiology*, 99(3), 799.

- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Sanz-Fernández, M., Hu, J., & Sandalio, L. M. (2016). Peroxisomes extend peroxules in a fast response to stress via a reactive oxygen species-mediated induction of the peroxin PEX11a. *Plant Physiology*, 171(3), 1665-1674.
- 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.
- Sakai, A., & Otsuka, K. (1970). Freezing resistance of alpine plants. *Ecology*, 51(4), 665-671.
- Sakhabutdinova , A.R., Fatkhutdinova D.R. and Shakirova F.M., (2004). Effect of salicylic acid on the activity of antioxidant enzymes in wheat under conditions of salination. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40 (5), 501-505.
- Sakurai, N. (1998). Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. *Journal of Plant Research*, 111, 133-148.
- Saleem, M., Fariduddin, Q., & Janda, T. (2021). Multifaceted role of salicylic acid in combating cold stress in plants: a review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(2), 464-485.
- Salguero, J., & Böttger, M. (1995). Secreted catalase activity from roots of developing maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Protoplasma*, 184, 72-78.
- Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*, 101(1), 7.
- Scebba, F., Sebastiani, L., & Vitagliano, C. (1998). Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiologia Plantarum*, 104(4), 747-752.
- Sgherri, C., Quartacci, M. F., & Navari-Izzo, F. (2007). Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess. *Journal of Plant Physiology*, 164(9), 1152-1160.
- Sheteiwy, M. S., An, J., Yin, M., Jia, X., Guan, Y., He, F., & Hu, J. (2019). Cold plasma treatment and exogenous salicylic acid priming enhances salinity tolerance of *Oryza sativa* seedlings. *Protoplasma*, 256, 79-99.
- Shi, Q., & Zhu, Z. (2008). Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environmental and Experimental Botany*, 63(1-3), 317-326.
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., & Mittler, R. (2008). Metabolomics for plant stress response. *Physiologia plantarum*, 132(2), 199-208.
- Sing, B. and Usha K., (2003). Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation*, (39), 137-141.
- Ślesak, 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 Biochimica Polonica*, 54(1), 39-50.
- Sochor, J., Ruttkay-Nedecky, B., Babula, P., Adam, V., Hubalek, J., & Kizek, R. (2012). Automation of methods for determination of lipid peroxidation. *Lipid peroxidation*.
- Soliman, M. H., Alayafi, A. A., El Kelish, A. A., & Abu-Elsaoud, A. M. (2018). Acetylsalicylic acid enhance tolerance of *Phaseolus vulgaris* L. to chilling stress, improving photosynthesis, antioxidants and expression of cold stress responsive genes. *Botanical studies*, 59(1), 1-17.

- Steponkus, P. L. (1984). Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 543-584.
- Szalai, G., Janda, T., Páldi, E., & Dubacq, J. P. (2001). Changes in the fatty acid unsaturation after hardening in wheat chromosome substitution lines with different cold tolerance. *Journal of plant physiology*, 158(5), 663-666.
- Takagi, D., Takumi, S., Hashiguchi, M., Sejima, T., & Miyake, C. (2016). Superoxide and singlet oxygen produced within the thylakoid membranes both cause photosystem I photoinhibition. *Plant Physiology*, 171(3), 1626-1634.
- Taşgın, E., 2004. Düşük sıcaklık ve salisilik asidin kışlık buğday yapraklarındaki donma toleransı, oksidatif enzim aktiviteleri ve apoplastik proteinler üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Taşgın, E., Atıcı Ö. and Nalbantoğlu B., (2003). Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation*, (41), 231-236.
- Taşgın, E., Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B., & Popova, L. P. (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(7), 710-715.
- Taulavuori, E., Hellström, E. K., Taulavuori, K., & Laine, K. (2001). Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. *Journal of Experimental Botany*, 52(365), 2375-2380.
- Tiryaki, D., 2015. Soğuğa dirençli bitkilerin yaprak apoplastından izole edilen bakterilerin fasulyede (*Phaseolus vulgaris* L.) soğuk stresi toleransı üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Triantaphylides, C., Krischke, M., Hoeberichts, F. A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., ... & Mueller, M. J. (2008). Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant physiology*, 148(2), 960-968.
- Triantaphylidès, C., & Havaux, M. (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in plant science*, 14(4), 219-228.
- Turhan, E., Aydoğan, C., Baykul, A., Akoglu, A., Evrenosoğlu, Y., & Ergin, S. (2012). Apoplastic antioxidant enzymes in the leaves of two strawberry cultivars and their relationship to cold-hardiness. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(2), 114-122.
- TUZUN, S., & Somanchi, A. (2006). The possible role of PR proteins in multigenic and induced systemic resistance. *Multigenic and induced systemic resistance in plants*, 112-142.
- Urrutia, M. E., Duman, J. G., & Knight, C. A. (1992). Plant thermal hysteresis proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1121(1-2), 199-206.
- Vágújfalvi, A., Kerepesi, I., Galiba, G., Tischner, T., & Sutka, J. (1999). Frost hardiness depending on carbohydrate changes during cold acclimation in wheat. *Plant Science*, 144(2), 85-92.
- Vanacker, H., Harbinson, J., Ruisch, J., Carver, T. L. W., & Foyer, C. H. (1998a). Antioxidant defences of the apoplast. *Protoplasma*, 205, 129-140.
- Vanacker, H., Carver, T. L., & Foyer, C. H. (1998b). Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology*, 117(3), 1103-1114.

- Wang, C. Y., & Baker, J. E. (1979). Effects of two free radical scavengers and intermittent warming on chilling injury and polar lipid composition of cucumber and sweet pepper fruits. *Plant and Cell Physiology*, 20(1), 243-251.
- Wang, L. J., & Li, S. H. (2006). Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca^{2+} homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. *Plant Science*, 170(4), 685-694.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*, 9(5), 244-252.
- Wang, W., Wang, X., Lv, Z., Khanzada, A., Huang, M., Cai, J., ... & Jiang, D. (2022). Effects of cold and salicylic acid priming on free proline and sucrose accumulation in winter wheat under freezing stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(6), 2171-2184.
- Wang, Y.X., Stass A. and Horst W.J., (2004). Apoplastic binding of aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize. *Plant Physiology*, 136 (3), 3762-3770.
- Wang, Z., Ma, L., Zhang, X., Xu, L., Cao, J., & Jiang, W. (2015). The effect of exogenous salicylic acid on antioxidant activity, bioactive compounds and antioxidant system in apricot fruit. *Scientia Horticulturae*, 181, 113-120.
- White, R. F. (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*, 99(2), 410-412.
- Wisniewski, M., & Fuller, M. (1999). Ice nucleation and deep supercooling in plants: new insights using infrared thermography. *Cold-adapted organisms: ecology, physiology, enzymology and molecular biology*, 105-118.
- Wisniewski, M., Lindow, S. E., & Ashworth, E. N. (1997). Observations of ice nucleation and propagation in plants using infrared video thermography. *Plant Physiology*, 113(2), 327-334.
- Ye, X. Y., & Ng, T. B. (2002). Isolation of a novel peroxidase from French bean legumes and first demonstration of antifungal activity of a non-milk peroxidase. *Life Sciences*, 71(14), 1667-1680.
- Yılmaz, S., & Ozan, S. T. (2003). Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişki. *Türk Biyokimya Dergisi*, 28(4), 252-256.
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews*, 111(10), 5944-5972.
- Yordanova, R., & Popova, L. (2007). Effect of exogenous treatment with salicylic acid on photosynthetic activity and antioxidant capacity of chilled wheat plants. *Gen. Appl. Plant Physiol*, 33(3-4), 155-170.
- Zámocký, M., & Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in biophysics and molecular biology*, 72(1), 19-66.
- Zhang, L., Tian, L. H., Zhao, J. F., Song, Y., Zhang, C. J., & Guo, Y. (2009). Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiology*, 149(2), 916-928.
- Zhang, Y., Zhang, M., & Yang, H. (2015). Postharvest chitosan-g-salicylic acid application alleviates chilling injury and preserves cucumber fruit quality during cold storage. *Food chemistry*, 174, 558-563.

- Zhao, S. (1998). Induction of freezing tolerance in Jack pine seedlings: changes in lipids, oxidation-reduction and antioxidant enzymes during cold acclimation (Doctoral dissertation).
- Zhou, J., Wang, J., Shi, K., Xia, X. J., Zhou, Y. H., & Yu, J. Q. (2012). Hydrogen peroxide is involved in the cold acclimation-induced chilling tolerance of tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 141-149.
- Zhou, Y., Liu, S., Yang, Z., Yang, Y., Jiang, L., & Hu, L. (2017). CsCAT3, a catalase gene from *Cucumis sativus*, confers resistance to a variety of stresses to *Escherichia coli*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(5), 886-896.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Ömer KARADAĞOĞLU
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Erzurum Mehmet Akif Ersoy Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi K.K.E.F. Kimya Öğretmenliği
Yüksek lisans:	-
Doktora:	Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Yayınlar	
- Mutlu, S., Karadağoglu, Ö., ATICI, Ö., TAŞĞIN, E., & Nalbantoğlu, B. (2013). Time-dependent effect of salicylic acid on alleviating cold damage in two barley cultivars differing in cold tolerance. <i>Turkish Journal of Botany</i>, 37(2), 343-349. - Esim, N., Tiryaki, D., Karadagoglu, O., & Atici, O. (2013). Toxic effects of boron on growth and antioxidant system parameters of maize (Zea mays L.) roots. <i>Toxicology and industrial health</i>, 29(9), 800-805. - Mutlu, S., Karadağoglu, Ö., Atici, Ö., & Nalbantoğlu, B. (2013). Protective role of salicylic acid applied before cold stress on antioxidative system and protein patterns in barley apoplast. <i>Biologia Plantarum</i>, 57, 507-513.	