

**DÜŞÜK SICAKLIK STRESİNE HASSAS BİR BİTKİDE
(*Phaseolu vulgaris*) BAZI EKSOJEN SOLUNUM
İNHİBİTÖRLERİNİN UYGULANMASIYLA
DİRENÇ ARTIRIMININ ARAŞTIRILMASI**

Bahman PURALİ SHUOTLU

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR
2012
Her hakkı saklıdır.**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DÜŞÜK SICAKLIK STRESİNE HASSAS BİR BİTKİDE
(*Phaseolu vulgaris*) BAZI EKSOJEN SOLUNUM
İNHİBİTÖRLERİNİN UYGULANMASIYLA
DİRENÇ ARTIRIMININ ARAŞTIRILMASI

Bahman PURALİ SHUOTLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2012

Her hakkı saklıdır



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



TEZ ONAY FORMU

**DÜŞÜK SICAKLIK STRESİNE HASSAS BİR BİTKİDE (*Phaseolu vulgaris*) BAZI
EKSOJEN SOLUNUM İNHİBİTÖRLERİNİN UYGULANMASIYLA DİRENÇ
ARTIRIMININ ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR danışmanlığında, Bahman PURALİ SHUOTLU tarafından hazırlanan bu çalışma 14/08/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. M. Sinan TAŞPINAR

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serkan ERDAL

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

**Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü**

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DÜŞÜK SICAKLIK STRESİNE HASSAS BİR BİTKİDE (*Phaseolus vulgaris*) BAZI EKSOJEN SOLUNUM İNHİBİTÖRLERİNİN UYGULANMASIYLA DİRENÇ ARTIRIMININ ARAŞTIRILMASI

Bahman PURALİ SHUOTLU

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Rahmi DÜMLÜPINAR

Bu araştırmada üşüme sıcaklıklarına hassas olduğu bilinen fasulye bitkisine kontrollü şartlarda üşüme sıcaklığıyla birlikte **KCN, CO, ANTİMİSİN A, NaF, NO, ABA, SA CaCl₂** ve **SHAM** uygulamaları yapılmış, çoğunluğu bitkilerdeki alternative solunum yolunu aktive veya inhibe ettiği bilinen bu maddelerin belirtilen stres şartları altında total protein içeriğini, ayrıca bazı antioksidant enzim aktivitelerini (SOD, KAT ve POD) nasıl etkiledikleri ve stresin bitkide ne derece hasara yol açtığına bir indikatörü olarak kabul edilen MDA testi yapmak suretiyle de alternative solunum yolunun aktive veya inhibe edilmesiyle bitkideki stresin etkisini bir nebze de olsa azaltmanın mümkün olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda, üşüme sıcaklığı nedeniyle bitkilerde gerek total protein içeriğinin, gerekse CAT ve POD enzim aktivitelerinin arttığı, SOD aktivitesinin ise azaldığı belirlenmiştir. Oysa söz konusu AOX aktivatörlerinin soğukla birlikte bitkilere uygulanması neticesinde, bu maddelerin genel olarak bazı konsantrasyonlarda CAT, POD ve SOD aktivitelerini düşürdüğü, bazı konsantrasyonlarda ise artırdığı tespit edilmiştir. Öte yandan yapılan MDA içeriği analizleri, düşük sıcaklığın fasülyede MDA içeriğini artırdığı, oysa AOX yolunu aktive ettiği bilinen bu maddelerin bu stress şartlarında uygulanması halinde bitkilerdeki MDA içeriğini hemen hemen tüm konsantrasyonlarda azaltıcı etki gösterdiği belirlenmiştir.

Tüm bu bulgulardan hareketle, AOX aktivatörü (ETS inhibitörü) olarak bilinen bu kimyevi maddelerin düşük sıcaklık stresi altındaki bitkilere uygulanması halinde, bitkilerde düşük sıcaklığın yol açtığı oksidatif hasarların azaltılmasında ve düşük sıcaklığa dayanıklılıkta önemli bir oynayabileceğini ileri sürmekteyiz.

2012, 124 sayfa

Anahtar Kelimeler: Alternatif solunum, reaktif oksijen türleri, antioksidan enzimler, Katalaz, Proksidaz, Süperoksit Dismutaz, lipid peroksidasyonu, Soğuk stresi, fasulye, *Phaseolus vulgaris*, protein

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF ENHANCEMENT OF COLD RESISTANCE WITH SOME EXOGENIC RESPIRATION INHIBITORS ON A COLD SENSITIVE PLANT (*Phaseolus vulgaris*)

Bahman PURALI SHUOTLU

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Rahmi DÜMLÜPINAR

Bean seedlings (14 days old) have been treated with known mitochondrial alternative respiration pathway activators (KCN (potassium cyanate), CO (carbonmonoxide), Antimycin A, ABA (abscisic acid), SA (salicylic acid), NaF (sodium fluorur), and CaCl₂ (calcium chlorate)) under chilling temperatures (10/5 °C, 16/8 h, day/night) for four days. Thereafter, the seedlings were harvested, and their leaves were collected for the analyses of total protein content, and the activity of SOD, CAT, POD and MDA contents. The objective of the study was to determine if the activation of alternative respiration pathways supply any resistance against chilling stress.

We determined that total protein, MDA content and activities of CAT and POD increased; however, activity of SOD decreased in the cold stressed bean seedlings (chilling control group). We determined that in the bean seedlings treated the activators caused to decrement in the MDA content, activities of CAT, POD and SOD with comparison to chilling control group in the generally all of concentrations. The results indicate that tested chemicals known AOX activators, can play an important role in reducing oxidative damage, and can result in plant resistance against chilling stress. In addition, it can be said that alternative respiration pathway is possibly related with chilling resistance.

2012, 124 Pages

Keywords: Alternative respiration, Reactive oxygen species, Antioxidant enzyme, Catalaz, Peroxidase, Superoxide Dismutase, lipid peroxidation, Cold stress, bean (*Phaseolus vulgaris*) proteins

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki fizyolojisi laboratuvarlarında yürütülmüştür. Araştırmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde çok önemli desteklerini gördüğüm başta danışmanım ve değerli hocam Sayın Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR'a, şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya, ilgi, yardım ve desteğini gördüğüm değerli hocalarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan ERDAL ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK'a, deneylerin planlanması ve gerçekleşmesi aşamalarında büyük emekleri olan kıymetli dostum Sayın Mucip GENİŞEL'e ve biyoloji bölümündeki tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Element analizinde yardımını gördüğüm kıymetli arkadaşım Bagher SHEİKHİ'ye her türlü desteğinden dolayı mesai arkadaşım Nilay AKBULUT'a ve Sakine MOHAMADI'ye teşekkürü borç bilirim. Ayrıca çalışmalarımın her aşamasında beni yalnız bırakmayan maddi ve manevi desteğini esirgemeyen eşime, babama, anneme, oğullarım Milad ve Mahdi'ye teşekkürlerimi sunarım.

Bahman PURALİ Shuotlu

Agustos 2012.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	25
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	37
3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	37
3.2. Yaprak Sıcaklığının Belirlenmesi.....	37
3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	38
3.4. Yöntemler	40
3.4.1. Bitkilerin büyütülmesi	40
3.4.2. Çözünabilir protein miktarının tayini	41
3.4.3. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi	42
3.4.3.a. CAT aktivitesinin belirlenmesi.....	43
3.4.3.b. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi	44
3.4.3.c. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi	45
3.4.4. Lipid peroksidasyon aktivitesinin belirlenmesi.....	45
3.4.5. İstatistiksel analiz	46
4. BULGULAR	47
4.1. Toplam Çözünabilir Protein Miktarı Sonuçları.....	47
4.1.1. Düşük sıcaklık + SA, ABA, CaCl_2 , SA+ABA+ CaCl_2 uygulaması	47
4.1.2. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulaması.....	49
4.1.3. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulaması	50
4.1.4. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) ANTYMİSİN A uygulaması.....	52

4.1.5. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulaması.....	53
4.1.6. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulaması	54
4.1.7. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulaması.....	56
4.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi	58
4.2.1. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A.....	58
4.2.2. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN	59
4.2.3. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO	61
4.2.4. SA, ABA, CACl ₂ , SA+ABA+ CACl ₂ uygulaması.....	62
4.2.5. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulaması	63
4.2.6. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulaması.....	65
4.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi.....	67
4.3.1. SA, ABA, CACl ₂ , SA+ABA+ CACl ₂ uygulaması.....	67
4.3.2. Nitrik oksit (NO) uygulaması.....	68
4.3.3. Antimisin A uygulaması.....	70
4.3.4. KCN uygulaması	71
4.3.5. CO uygulaması	73
4.3.6. SHAM uygulaması	74
4.3.7. Sodyum florür (NAF) uygulaması	76
4.4. Peroksidaz (POD) Enzim Aktivitesi.....	77
4.4.1. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulamasıyla, peroksidaz (POD) enzim aktivitesi	77
4.4.2. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulamasıyla, peroksidaz (POD) enzim aktivitesi.....	79
4.4.3. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulamasıyla, peroksidaz (POD) enzim aktivitesi	80
4.4.4. SA, ABA, CACl ₂ , SA+ABA+ CACl ₂ uygulamasıyla, peroksidaz (POD) enzim aktivitesi	82
4.4.5. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulamasıyla, peroksidaz (POD) enzim aktivitesi	83
4.4.6. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulamasıyla, peroksidaz (POD) enzim aktivitesi	85

4.4.7. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulamasıyla, peroksidaz (POD) enzim aktivitesi	86
4.5. Lipid Peroksidasyon Seviyesinin (MDA Miktarı) Sonuçları	88
4.5.1. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulaması	88
4.5.2. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulaması	89
4.5.3. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulaması	91
4.5.4. SA, ABA, CACl ₂ , SA+ABA+CACl ₂ uygulaması.....	92
4.5.5. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20 mM) NO uygulaması.....	94
4.5.6. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20 mM) SHAM uygulaması.....	95
4.5.7. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20 mM) NAF uygulaması	97
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	99
5.1. Total Protein İçeriği.....	99
5.2. Antioksidant Enzim Aktiviteleri	100
KAYNAKLAR	106
ÖZGEÇMİŞ	125

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABA	: Absisik asit
ABS	: Absorbans
APX	: Askorbat peroksidaz
CAT	: Katalaz
Cl	: Klor
CO	: karbon monoksit
CO ₂	: Karbon dioksit
CaCl ₂	: kalsium klorür
Cm	: Santimetre
Dk	: Dakika
DTT	: Dithiothreitol
DTNB	: Dinitroditiyo benzoik asit
EC	: Elektriksel İletkenlik
EDTA	: Etilendiamintetresetik asit
ETS	: Elektron taşıma zinciri
E.Ü.	: Enzim ünitesi
g	: Gravite sabiti
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
kg	: Kilogram
KCN	: Potasyum siyanür
L	: Litre
LPO	: Lipid peroksidasyon
MDA	: Malondialdehid
M	: Molar
m ²	: Metrekare
m	: Metre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre

mmol	: Milimol
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
N	: Normal
NAF	: Sodyum florür
NO	: Nitrik oksit
NBT	: Nitroblue tetrazolium chloride
$^1\text{O}_2$	: Singlet oksijen
O_2^-	: Süperoksit Radikal
OH^-	: Hidroksil Radikal
OSA	: Oksidatif Stres Arttırıcılar
P	: Fosfor
pH	: Asitlik-Baziklik Faktörü
ppm	: Milyonda bir kısım
prt	: Protein
POD	: Peroksidaz
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SA	: Salisilik asit
SE	: Soğuk Etkinliği
SHAM	: Salisilik hidroksamik asit
SOD	: Süperoksit dismutaz
TCA	: Trikloroacetic asit
%	: Yüzde
Mg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
^0C	: Santigrat derece
v/v	: Volume/volume (Hacim/hacim)
w/v	: Weigh/volume (Ağırlık/hacim)
rpm	: Devir/dakika

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Moleküler oksijenden (O ₂) türeyen ROT'ların kendi içlerindeki dönüşümleri.	11
Şekil 1.2. Bitki mitokondri iç zarlarında yerleşmiş elektron taşıma sisteminin düzenlenişi ve ATP sentezi.....	19
Şekil 3.1. Yaprak sıcaklığının ölçülmesi	38
Şekil 3.2. Protein tayini için hazırlanmış olan standart grafik.....	42
Şekil 3.3. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik.	44
Şekil 4.1. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusundaki çözülebilir protein miktarının uygulamalara göre değişimi.....	48
Şekil 4.2. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusundaki çözülebilir protein miktarının Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulamalara göre değişimi	50
Şekil 4.3. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusundaki çözülebilir protein miktarının Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulamalara göre değişimi.	51
Şekil 4.4. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusundaki çözülebilir protein miktarının Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) A Antymisin A uygulamalara göre değişimi.	53
Şekil 4.5. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusundaki çözülebilir protein miktarının (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulamalara göre değişimi...54	
Şekil 4.6. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusundaki çözülebilir protein miktarının (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulamalara göre değişimi.	56
Şekil 4.7. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusundaki çözülebilir protein miktarının (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulamalara göre değişimi.	57
Şekil 4.8. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5 ⁰ C) transfer	

edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen KAT enzim aktivitesi değerleri.....	59
Şekil 4.9. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5 ⁰ C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen KAT enzim aktivitesi değerleri.....	60
Şekil 4.10. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5 ⁰ C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen KAT enzim aktivitesi değerleri.....	62
Şekil 4.11. SA, ABA, CaCl ₂ , SA+ABA+ CaCl ₂ uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5 ⁰ C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen KAT enzim aktivitesi değerleri.....	63
Şekil 4.12. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5 ⁰ C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen KAT enzim aktivitesi değerleri.....	65
Şekil 4.13. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5 ⁰ C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen KAT enzim aktivitesi değerleri.	66
Şekil 4.14. 14 gün 20/25 ⁰ C’de büyütülen fasulye fidelerine, SA, ABA, CaCl ₂ , SA+ABA+CaCl ₂ uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5 ⁰ C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerleri.....	68
Şekil 4.15. 14 gün 20/25 ⁰ C’de büyütülen fasulye fidelerine, farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5 ⁰ C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerleri.	69
Şekil 4.16. 14 gün 20/25 ⁰ C’de büyütülen fasulye fidelerine, farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) Antimisin A uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5 ⁰ C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerleri.	71
Şekil 4.17. 14 gün 20/25 ⁰ C’de büyütülen fasulye fidelerine, farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) KCN uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim	

dolabına (10/5 ⁰ C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerleri.....	72
Şekil 4.18. 14 gün 20/25 ⁰ C’de büyütülen fasulye fidelerine, farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) CO uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5 ⁰ C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerleri.....	74
Şekil 4.19. 14 gün 20/25 ⁰ C’de büyütülen fasulye fidelerine, farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5 ⁰ C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerleri.....	75
Şekil 4.20. 14 gün 20/25 ⁰ C’de büyütülen fasulye fidelerine, farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5 ⁰ C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerleri.....	77
Şekil 4.21. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda peroksidaz (POD) aktivitesinin farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) KCN uygulamalara göre değişimi.	78
Şekil 4.22. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda peroksidaz (POD) aktivitesinin Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulamalara göre değişimi.	80
Şekil 4.23. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda peroksidaz (POD) aktivitesinin Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulamalara göre değişimi.....	81
Şekil 4.24. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda peroksidaz (POD) aktivitesinin SA, ABA, CaCl ₂ , SA+ABA+ CaCl ₂ uygulamalara göre değişimi.	83
Şekil 4.25. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda peroksidaz (POD) aktivitesinin Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulamalara göre değişimi.	84

Şekil 4.26. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda peroksidaz (POD) aktivitesinin Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulamalara göre değişimi.....	86
Şekil 4.28. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g ⁻¹ yaprak).....	89
Şekil 4.29. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g ⁻¹ yaprak).....	90
Şekil 4.30. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g ⁻¹ yaprak).	92
Şekil 4.31. Dört farklı made SA, ABA, CaCl ₂ , SA+ABA+ CaCl ₂ uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g ⁻¹ yaprak).	93
Şekil 4.32. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) NO uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g ⁻¹ yaprak).....	95
Şekil 4.33. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) SHAM uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g ⁻¹ yaprak).....	96
Şekil 4.34. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) NAF uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g ⁻¹ yaprak).....	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bitkiler için başlıca stres kaynakları.....	3
Çizelge 1.2. Dünya ve Türkiye’de taze ve kuru fasulye üretim miktarları ve alanları ...	23
Çizelge 4.1. Dört farklı made SA(0.0005M), ABA(10^{-4} M), CaCl_2 (0.012M), SA+ABA+ CaCl_2 , uygulanan fasulye (<i>Phaseolusvulgaris</i>) bitkisinde yaprak dokusunda çözülebilir proteinin uygulamalara göre değişimi.	48
Çizelge 4.2. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN, uygulanan fasulye (<i>Phaseolusvulgaris</i>) bitkisinde yaprak dokusunda çözülebilir protein uygulamalara göre değişimi.....	49
Çizelge 4.3. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO, uygulanan fasulye (<i>Phaseolusvulgaris</i>) bitkisinde yaprak dokusunda çözülebilir protein uygulamalara göre değişimi.	51
Çizelge 4.4. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A, uygulanan fasulye (<i>Phaseolusvulgaris</i>) bitkisinde yaprak dokusunda çözülebilir protein uygulamalara göre değişimi.	52
Çizelge 4.5. (5, 10, 15, ve 20 mM) NO, uygulanan fasulye (<i>Phaseolusvulgaris</i>) bitkisinde yaprak dokusunda çözülebilir protein uygulamalara göre değişimi.....	54
Çizelge 4.6. (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulanan fasulye (<i>Phaseolusvulgaris</i>) bitkisinde yaprak dokusunda çözülebilir protein uygulamalara göre değişimi.....	55
Çizelge 4.7. (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulanan fasulye (<i>Phaseolusvulgaris</i>) bitkisinde yaprak dokusunda çözülebilir protein uygulamalara göre değişimi.....	57
Çizelge 4.8. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulanan fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen KAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi.	58

Çizelge 4.9. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulanan fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen KAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi.	60
Çizelge 4.10. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulanan fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen KAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi.....	61
Çizelge 4.11. SA, ABA, CaCl_2 , SA+ABA+ CaCl_2 uygulanan fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen KAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi.	63
Çizelge 4.12. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulanan fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen KAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi.	64
Çizelge 4.13. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulanan fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen KAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi.	66
Çizelge 4.14. Dört farklı made SA(0.0005M), ABA(10^{-4} M), CaCl_2 (0.012M), SA+ABA+ CaCl_2 uygulanan fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi.	67
Çizelge 4.15. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulanan, fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi(EU.g^{-1} yaprak).....	69
Çizelge 4.16. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) Antimisin A uygulanan, fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi (EU.g^{-1} yaprak).	70
Çizelge 4.17. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) KCN uygulanan, fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi(EU.g^{-1} yaprak).....	72

Çizelge 4.18. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) CO uygulanan, fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi(EU.g ⁻¹ yaprak).....	73
Çizelge 4.19. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulaması, fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi(EU.g ⁻¹ yaprak).....	75
Çizelge 4.20. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulaması, fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi(EU.g ⁻¹ yaprak).....	76
Çizelge 4.21. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulanan fasulye yapraklarından elde edilen peroksidaz (POD) enzim aktivitesi değerleri (EU.g ⁻¹ yaprak).	78
Çizelge 4.22. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulanan fasulye yapraklarından elde edilen peroksidaz (POD) enzim aktivitesi değerleri (EU.g ⁻¹ yaprak).....	79
Çizelge 4.23. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulanan fasulye yapraklarından elde edilen peroksidaz (POD) enzim aktivitesi değerleri (EU.g ⁻¹ yaprak).	81
Çizelge 4.24. SA, ABA, CaCl ₂ , SA+ABA+ CaCl ₂ uygulanan fasulye yapraklarından elde edilen peroksidaz (POD) enzim aktivitesi değerleri (EU.g ⁻¹ yaprak).....	82
Çizelge 4.25. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulanan fasulye yapraklarından elde edilen peroksidaz (POD) enzim aktivitesi değerleri (EU.g ⁻¹ yaprak).....	84
Çizelge 4.26. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulanan fasulye yapraklarından elde edilen peroksidaz (POD) enzim aktivitesi değerleri (EU.g ⁻¹ yaprak).....	85
Çizelge 4.27. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulanan fasulye yapraklarından elde edilen peroksidaz (POD) enzim aktivitesi değerleri (EU.g ⁻¹ yaprak).....	87

Şekil 4.27. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bitkisinin yaprak dokusunda peroksidaz (POD) aktivitesinin Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulamalara göre değişimi.	87
Çizelge 4.28. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g ⁻¹ yaprak).	88
Çizelge 4.29. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g ⁻¹ yaprak).	90
Çizelge 4.30. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g ⁻¹ yaprak).	91
Çizelge 4.31. Dört farklı made SA, ABA, CaCl ₂ , SA+ABA+CaCl ₂ uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g ⁻¹ yaprak).	93
Çizelge 4.32. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) NO uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g ⁻¹ yaprak).	94
Çizelge 4.33. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) SHAM uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g ⁻¹ yaprak).	96
Çizelge 4.34. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20 mM) NAF uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g ⁻¹ yaprak).	97

1. GİRİŞ

Stres kelimesi Latince bir terim olan *stringere*'den türetilmiştir. Biyolojik Anlamda stresin tanımını yapmadan önce fiziksel stresin ne olduğunun bilinmesi gereklidir. Fiziksel stres, herhangi bir nesneye (örneğin çelik bir çubuğa) uygulanan kuvvettir. Stresle ilgili diğer iki kavram ise stres tepkisi ve biyolojik zorlanmadır. Strain (stres tepkisi) stres sonucu nesnenin boyutlarındaki değişimdir (örneğin, eğilme). Biyolojik zorlanma fonksiyondaki azalma veya değişimdir. Levitt (1972), biyolojik stresin tanımını; “Çevre koşullarında, bitkinin gelişme veya büyümesini azaltan ya da olumsuz yönde etkileyebilen değişimlerdir” şeklinde yapmıştır. Osmond vd 1987, stresi “Bitki büyümesi ve üretimini genotip potansiyelinin altına indiren herhangi bir faktördür” şeklinde tarif etmiştir. Stresin en çok kabul gören tanımı “canlı organizmanın normal yaşam sürecinde optimal şartlardan önemli ölçüde sapma veya organizmanın tüm fonksiyon seviyelerinde tepki ve değişimlerin ortaya çıkması” şeklinde yapılandırılır. Stres sonucu oluşan değişim ya da tepkiler başlangıçta geri dönüşümlü olmasına rağmen, kalıcı da olabilmektedir.

Ülkemizde olduğu gibi dünyanın değişik bölgelerinde bitkisel üretimi en çok sınırlayan çevresel stres faktörlerinin biri aşırı sıcaklıklardır. Abiyotik stress faktörlerinden olan şiddetli sıcaklıklar üzerinde en çok çalışılanı ise düşük sıcaklık stresidir (Bruggemann *et al.* 1995; Willits and Peet 1998; Saltweit 2001). Biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin etkisi altında bitkilerde ortaya çıkan değişimler stres olarak ifade edilmektedir. Başka bir tanımlama ile stres, önemli fizyolojik ve metabolik değişmelere yol açmak suretiyle bitkilerde büyümeyi ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkileyen, üründe nitelik ve niceliğin yitmesine, bitkinin ve bitki organının yaşantısını yitirmesine neden olan değişimlerdir. Bitkilerin normal gelişme seyrini ve fizyolojik olaylarını etkileyen, yavaşlatan veya durduran tüm çevre etmenleri de stres faktörleri olarak adlandırılmaktadır. Stres faktörleri, cansız çevre etmenlerinin bitkide yapmış olduğu stres yani abiyotik stres faktörleri ve canlı çevre etmenlerinin bitkide yapmış olduğu stres yani biyotik stres faktörleri olarak sınıflandırılmıştır (Taiz and Zieger 2008).

Bitkisel üretimde stres, abiyotik (tuzluluk, kuraklık, düşük ve yüksek sıcaklıklar, besin elementlerinin eksiklik veya fazlalıkları, ağır metaller, hava kirliliği, radyasyon gibi) ve biyotik (hastalık oluşturan mantar, bakteri, virüs vb. ve zararlılar) kökenli etkenler nedeniyle bitkinin büyüme ve gelişmesinde olumsuzluklara, bunlara bağlı olarak verim düşüklüğü ile sonuçlanan bir dizi gerilemeye neden olması biçiminde tanımlanabilir (Kuşvuran 2010; Kaya 2011).

Bitkilerin stres koşullarına dayanıklılığı adaptasyon yetenekleri ile yakından ilgilidir. Genel olarak adaptasyon yeteneği iyi olan bitki tür ve çeşitler, çok çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörüne karşı dirençli olabilmektedir. Çeşitli yollarla oksidatif stres artırıcılar (OSA) oksidatif strese karşı dirençli şekle getirilen bitkilerin daha fazla strese maruz bırakıldığında adapte olamayan bitkilerden daha dirençli olduğu bilinmektedir.

Stres kavramını fiziksel ve biyolojik stres olarak ikiye ayırmak mümkündür. Bir nesnenin birim alanına uygulanan mekanik güç fiziksel strestir. Biyolojik stres ise bir biyolojik sistemin normal fonksiyon göstermesini engelleyen elverişsiz madde ya da durumdur (Jones and Jones 1989).

Bitkilerin çeşitli stres faktörlerine verecekleri tepkiler, maruz kalınan stresin süresine ve şiddetine, strese mazur kalan doku, organ ve bitki çeşidine ve özellikle bitkinin gelişim evresine bağlıdır (Bray *et al.* 2000). Stres, çevresel ve biyolojik faktörlerin ayrı ayrı ya da birlikte bitkilerde ki fizyolojik olaylarda belirgin değişimler meydana getirmesidir (Kadıoğlu 2007). Stres bitkinin veya organlarının büyümesinde ve verimliliğinde azalmaya, hatta ölümüne yol açabilir. ABD’de optimum şartların altındaki iklim ve toprak koşullarının oluşturduğu stres nedeniyle kültür bitkilerinin kalıtsal potansiyellerinin ancak %22’sine ulaşabildiklerini bildirilmiştir (Boyer 1982).

Bir bitkinin uygun olmayan çevre şartlarına maruz kalması durumunda, hayatını devam ettirmesi ve strese tahammül etme yeteneğine tolerans denir. Tolerans daha çok genotiple ilgilidir. Aklimasyon, yeni bir çevreye maruz kalan bitkideki kalıtsal olmayan değişikliklerdir. Aklimasyon, dölden dölle intikal etmeyen bitkideki hızlı değişimlerdir.

Bitkilerdeki zamanla oluşan, kalıtsal olan veya olmayan, bitkiyi strese karşı fiziksel bir bariyer oluşturarak koruyan değişimlere avoidans (korunma) denir (Kocaçalışkan 2008; Genişel 2010). Bir ekosistemde bitkileri etkileyen pek çok stres kaynakları bulunabilir. Bu stres kaynakları fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Çizelge 1.1) (Kadioğlu 2004; Kocaçalışkan 2008; Genişel 2010).

Çizelge 1.1. Bitkiler için başlıca stres kaynakları (Kocaçalışkan 2008)

A.Fiziksel	B. Kimyasal	C. Biyolojik
Kuraklık Sıcaklık Radyasyon Sel, Toprak yapısı Makineler, elektrik Manyetik alan, rüzgâr Işınlr ve Fırtına	Hava kirliliği Allelokimyasallar Besinler Pestisitler, toksinler Tuzlar Toprağın pH' sı	Rekabet Allelopati Simbiyosis İnsan tahribi Hastalık etkenleri Paratizim Böcekler

Soğuk; bitkilerin gelişimini, verimini ve yayılımını kısıtlayan en önemli abiyotik faktörlerden biridir. Bitkiler habitatlarında yaygın olan sıcaklıkları tolere etmek için bir dizi stratejiler geliştirmiş olmalarına rağmen, yeni bir çevrede ya da aşırı sıcaklıklarla karşı karşıya kaldıklarında hasar görürler.

Stres, yeryüzünde tarım alanların neredeyse tamamında bitki büyümesini ve tarımsal üretkenliği kısıtlamaktadır. **ABD**'de tarla şartlarında yetiştirilen bitkiler stresten dolayı genetik verim potansiyellerinin sadece %22'sini ortaya koyabilmektedir. Son yıllarda özellikle biyolojinin birçok dalında stres alanındaki çalışmalar artan bir önem kazanmıştır. Bu alandaki çalışmaların çoğunda ilgili süreçlerin daha iyi anlaşılmasına yönelik yaklaşımlar üzerinde durulmaktadır.

Düşük sıcaklık stresine toleransı yüksek çeşitlerin belirlenmesi ile:

- 1- Birim alandan daha fazla ve daha kaliteli ürün,
- 2- Diğer biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklılık,

- 3- Isıtma giderlerinde azalma,
- 4- Belirlenecek olan genotiplerin, yeni ve üstün nitelikli hibritlerin ortaya çıkmasına katkısı,
- 5- Farklı toleransta toksik O₂ radikallerinin ve antioksidatif savunma sistemlerinin rolünün araştırılması hedeflenmiştir.

Düşük sıcaklık stresine hassas bitkiler birkaç saat süreyle çok düşük (0-10⁰C) sıcaklıklara maruz kaldığında ilk gözlenen semptomlar sap ve yaprakların turgorunu kaybetmesi ve bunu takiben yaprak dokularının ölmesi ve kurumasıdır (Rikin *et al.* 1976). Hassas bitkilerde soğuk stresinin neden olduğu solma ve kurumalar, kök sisteminden yeşil aksama gelen su miktarındaki azalmanın, başka bir deyişle, köklerin hidrolik iletkenliğinin kaybolmasının bir sonucudur. Buna ilave olarak, düşük sıcaklıklarda bitkilerin turgorunu kaybederek stomatal kontrolün bozulması, su kaybını daha da arttırmaktadır. Soğuk uyumu sırasında doymamış membran lipid oranının artması hemen hemen her zaman meydana gelir. Soğuk toleransında membran lipidlerinin doymamış yağ oranlarının artması zar akışkanlığını devam ettirebilmek için çok önemlidir (Warren 2001; Uemura *et al.* 2006).

Antioksidant enzimler birçok türde soğukla teşvik edilir ve böylece oksidatif stres dirençinde (tolerans) bir artış meydana gelir (Hull *et al.* 1997; Prasad 1997). Ayrıca flavonoid, antosiyanin ve ksantofiller gibi antioksidantlar da soğuk uyumu sırasında teşvik edilir ve soğuk toleransını arttırırlar (Leng *et al.* 2000). Bunun yanı sıra, soğuk uyumu sırasında moleküler şaperonların da sentezinin teşvik edildiği bildirilmiştir. Sıcaklık şoku proteinlerinin birçok farklı sınıfı sıcaklık ekstremlerine ve diğer streslere bağlı olarak meydana gelen denatüre olmuş proteinlerin kümeleşmesini ve kümeleşmiş olanların ise denatürasyonunu sağlayan, moleküler şaperonlar olarak da fonksiyon gösterirler (Guy and Li 1998). Soğuk uyumu sırasında yüzlerce gen ifadesinin, arttırılarak ya da azaltılarak uyumun düzenlendiği bildirilmiştir (Seki *et al.* 2001; Fowler and Thomashow 2002). Aynı zamanda, soğukla indüklenen bu genlerin ifadelerinin kuraklık, yüksek tuz konsantrasyonu ya da ABA tarafından da arttırıldığı bilinmektedir. Sinyal algılama metabolik yollarının bir ortak grubu birçok stres cevapları sırasında

görev alır (Shinozaki *et al.* 2003). Soğukla düzenlenen (COR) genlerin tanıtım (promoter) analizleri genlerin stres indüksiyonuna aracılık eden sekansları (dizileri-sıraları) içerdiklerini göstermiştir. Bazı COR genleri ABA'ya cevap vermeye aracılık eden ABA cevap öğeleri içerir. COR genlerinin ifadesi hem ABA-bağımlı hem de ABA bağımsız metabolik yollarla düzenlenir (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000). Düşük sıcaklık sırasında soğukla indüklenebilen gen ifadelerinin analizi ifadeleri farklı zamanlarda meydana gelen en az iki gurubun var olduğunu gösterir. İlk grupta, düşük sıcaklığa cevapta, ifade hızlı ve geçicidir, ve ikincide, soğuk uygulaması sırasında ifade giderek artar. Ayrıca ifadelerin analizleri, soğuk uyumu sırasında çoklu düzenleyici metabolik yolların aktive edildiğini ve soğukla indüklenen genlerin birden fazla soğuk düzenleyicilerinin elemanı olabileceğini gösterir (Fowler and Thomashow 2002).

Sıcaklık, mevsimden mevsime değişen ve günlük dalgalanmalara uğrayan çevresel bir faktördür. Canlılar çevresel sıcaklıkları kontrol edemediklerinden, Şiddetli (ekstrem) sıcaklıklarda hayatta kalmak için iki strateji geliştirirler; ya stresten kaçınırlar ya da stresi tolere ederler. Yerleşimi sabit organizmalar olan bitkiler, sıcaklıktaki mevsimsel değişiklikleri algıladıkları gibi geçici dalgalanmaları da algılama yeteneğinde olmalı ve bir sonraki sıcaklık rejimine hazır olmak için bu değişikliklere kendi biyolojilerini etkin şekilde uyarlayarak karşılık verebilmelidirler (Saltveit and Morris 1990; Browse and Xin 2001). Soğuk stresi ürün verimini, kalitesini, hasat sonrası dayanıklılığını ve türlerin dağılımını (kısıtlayan) sınırlayan çevresel streslerden biridir (Pearce 1999; Chinnusamy *et al.* 2006). Her bitki kendi büyüme ve gelişmesi için optimum olan belirli sıcaklık ihtiyacına sahiptir. Belirli sıcaklık koşulları bir bitki için optimum olurken, diğer bitki için strese neden olabilir (Mahajan and Tuteja 2005). Bir bitkinin doğal üşüme duyarlılığı, bazı türlerin soğuğa karşı uyum yeteneği olsa da, zamanlama etkisi ve yapısal hasarın ortaya çıkmasına göre hafif, orta ya da ekstrem olarak sonuçlanır (Kratsch and Wise 2000).

Bitkiler soğuk stresinden etkilenmelerine göre 3 gruba ayrılırlar;

1- soğuğa hassas olanlar (12°C 'nin altındaki sıcaklıklardan zarar görürler)

- 2- soğuğa dayanıklı fakat dona duyarlı olanlar (12°C 'nin altındaki sıcaklıklara uyum sağlayabilir, fakat donma sıcaklıklarında hayatta kalamazlar)
- 3- dona dayanıklı olanlar (donma sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda hayatta kalabilirler ve bu sıcaklıklara uyum sağlayabilirler).

Soğuk ve donma streslerinin doğası farklıdır. Soğuk stresi hücreler üzerine düşük sıcaklığın doğrudan etkisidir. Donma ise dolaylı olarak rol oynar, hücreleri buz oluşumu ile hasara uğratar (Pearce 1999). 12°C 'nin altındaki sıcaklıklarda meydana gelen üşüme hasarı, bitkinin soğuğa maruz kalmasıyla tetiklenen fiziksel ve fizyolojik değişikliklerdir. Fizyolojik değişiklikler birincil (primer) ve ikincil (sekonder) olarak düşünülür. Primer hasar, bitkide bir fonksiyon bozukluğuna neden olan ilk hızlı tepkidir, fakat bu fonksiyon bozukluğu geri dönüşümlü olup sıcaklığın normal koşullara yükselmesi sonucunda kolayca düzelebilir. Sekonder hasar ise primer hasarın bir sonucu olarak oluşan fonksiyon bozukluklarıdır, geri dönüşümlü olmayabilir. Tipik (Karakteristik) soğuk hasarının görsel belirtileri, ikincil üşüme hasarından kaynaklanır. üşüme hasarının belirtileri, bitkinin maruz kalma süresinin artması ve sıcaklığının azalmasıyla artar (Rab and Saltveit 1996).

Üşüme hasarı belirtileri; sıcaklığa maruz kalma süresine, bitkiye (genotipe), bitkinin gelişim aşamasına, soğuk uygulanan dokuya, rüzgara, suya, besinlere ve ışık gibi diğer çevresel koşullara bağlı olarak değişir (Saltveit and Morris 1990). Genel olarak soğuk hasarı belirtileri bitki büyüme hızının azalması, yaprak genişliğinin azalması, hücresel otolizin ve yaşlanmanın artması, programlanmış hücre ölümleri, ışıktaki fotooksidasyonun sonucu olarak klorofilin kaybı nedeniyle klorozis oluşumu, hücre zar yapılarının bozulması ve bunun sonucunda hücresel bütünlüğün bozulması, protoplazmik akışın en az düzeye inmesi ve nekrozis olarak özetlenebilir (Kratsch and Wise 2000; Mahajan and Tuteja 2005).

Soğukun bitkiye en kötü etkisi hücre membranı hasarına yol açmasıdır. Bu zarar büyük ölçüde dehidrasyon nedeniyle. Hücre zarı lipidleri soğuk hassaslığında (duyarlılığında) ya da dirençinde önemlidir (Mahajan and Tuteja 2005). Birçok farklı

bitkinin hücre membranından izole edilen lipid içerikleri ortak özelliklere sahiptir, fakat bitki organel zarlarıyla (örnek; mitokondri, kloroplast zarları) karşılaştırıldığında hücre zarı lipid içeriği tamamiyle farklıdır. Hücre zarı tipikal (karakteristik) olarak yüksek oranda fosfolipid, serbest ve glikozlanmış sterol ve serebrosidler (monoglikosilseramidler) içerirler. Mitokondri zarı, kloroplast zarları ve tilakoidleri içeren diğer hücre membranları (organel zarları) steroller ve serebrosidler içermezler. Tüm hücre zarları aynı lipid çeşitlerine sahip olsa da fosfolipid, sterol ve serebrosid oranları farklı bitki türleri arasında oldukça değişiktir. Soğukla muamele sırasında hücre zarının lipid içeriğinde bir dizi değişiklik meydana gelir. Öncelikle birçok türde ortak olarak, hücre zarının fosfolipid oranında artış gözlenir. İkinci olarak, artan soğuk stresi uygulamasında soğuk dayanıklılığının maksimum olduğu düzeyde (seviyede) hücre zarındaki serebrosidlerin oranı azalır, fakat azalmanın miktarı bitki türlerine göre çeşitlilik gösterir (Uemura and Steponkus 1999). Türler arasında hücre zarı yağ asidi doymunluğu ve soğuk duyarlılığı birbirleriyle ilişkilidir. Hücre zarı lipidlerinin faz ve akışkanlık özellikleri yağ asidi doymunluk derecesinden etkilenir.

Zar lipidleri iki çeşit yağ asidinden oluşur:

1- Doymamış yağ asidi 2- Doymuş yağ asidi

Doymamış yağ asitleri iki karbon atomu arasında bir ya da daha fazla çift bağ içerirler (-CH=CH-), oysa doymuş yağ asitlerinin karbon atomları tamamıyla H atomlarıyla doyurulmuştur ($\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$). Doymuş yağ asidi içeren yağlar, doymamış yağ asidi içeren yağlardan daha yüksek sıcaklıklarda katılaşır. bundan dolayı, zardaki doymamış yağ asitlerinin bağıl oranı zar akışkanlığını önemli derecede etkiler. Zarın yarı kristalin (sıvı-mozaiik) fazdan jel fazına değiştii sıcaklık, geçiş sıcaklığı olarak bilinir. Soğuğa hassas bitkiler daha yüksek doymuş yağ asidi oranına ve böylece daha yüksek geçiş sıcaklığına sahiptirler. Bu durum soğuk duyarlı bitkilerin zarlarının sıvı mozaiik fazdan katı jel fazına geçme meyilini arttırmakta ve zar sızıntılarına neden olmaktadır. Diğer bir taraftan soğuğa dirençli türler daha yüksek doymamış yağ asidi oranıyla göze çarparlar ve daha hafif ve düşük bir geçiş sıcaklığına sahiptirler (Mahajan

and Tuteja 2005; Bakht *et al.* 2006; Uemura *et al.* 2006; Wang *et al.* 2006). Soğuk stresinde ilk ve en şiddetli etkilenen organel kloroplasttır. Karakteristik (Tipik) olarak soğuk zararının belirtileri kloroplast şişmesi, tilakoidlerin şekil değiştirmesi ve şişmesi, nişasta granüllerinin boyutunda ve sayısında bir azalma ve kloroplast membranından çevresel (periferal) retikulum denilen küçük çıkıntıların oluşumudur (Kratsch and Wise 2000). Kloroplast şişmesi, soğukun hücresel etkileri çalışmalarında hemen hemen evrensel bir işaret olup, stromal osmolitlerdeki artış ile kendini gösterir (Sfakianaki *et al.* 2006). Mitokondri, kloroplastın aksine soğuk stresine daha dayanıklıdır ve sadece soğuğa karşı aşırı hassas bitkilerin mitokondrileri düşük sıcaklıklardan görünür şekilde etkilenir. Aşırı duyarlı türlerde, (örneğin mısır), mitokondri zarının fiziksel durumunun değiştiği ve bu nedenle sitokrom C oksidaz aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (De Virville *et al.* 2002). Soğuk duyarlı fidelerin, 10⁰C'nin altında donma derecesinde olmayan sıcaklıklara maruz bırakılması kök iletiminin ve su alımının azalmasına, kök ucunun düşmesine ve kök büyümesinin azalmasına neden olur (Rab and Saltveit 1996; Aroca *et al.* 2001).

Kökler, rizomlar ve soğanlar soğuğa, toprak üstü organlarından daha duyarlıdır, fakat toprağın soğuğu hafifletme kapasitesi nedeniyle tarladaki bu dokular sürgünlerin maruz kaldığı soğuğa maruz kalmazlar. Bununla birlikte, deneyler saksıda yapıldığında bu hafifletici etkinin ortadan kalktığı gösterilmiştir (Fennell and Markhart 1998).

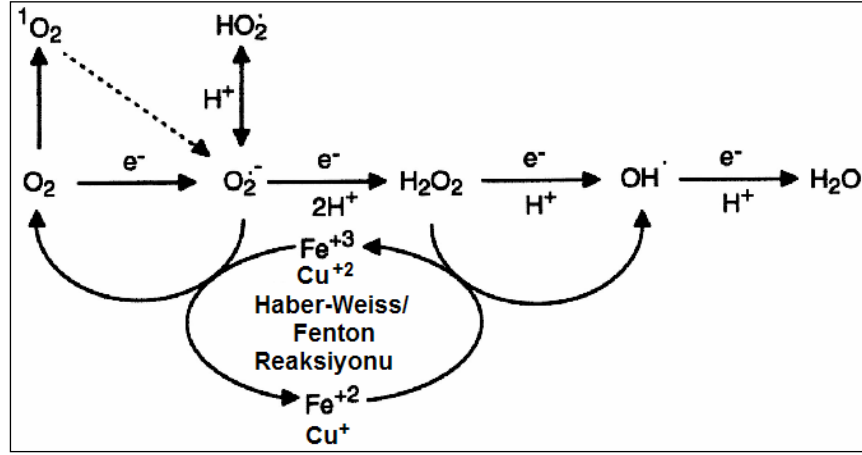
Fotooksidatif zararlanma, bitkisel üretimi sınırlayan düşük veya yüksek sıcaklık, tuzluluk, kuraklık gibi çevresel stres etmenlerinin neden olduğu hücre tahribatı, daha çok toksik O₂ türevleri tarafından katalize edilmektedir (Inze and Van Montagu 1995; Foyer *et al.* 1997). Toksik O₂ türevleri kimyasal olarak çoğunlukla radikal formundadır ve bitkilerde yoğun olarak kloroplastlarda fotosentez sırasında ortaya çıkmaktadır. Fotosentez sırasında açığa çıkan elektronlar ve pigmentlerce absorbe edilen ışık enerjisi, düşük sıcaklık stresinde olduğu gibi herhangi bir çevresel stres faktörüyle fotosentetik CO₂ indirgenmesinde (asimilasyonda) kullanılamamakta ve birikime maruz kalmaktadır.

Bu toplanan elektron ve enerji, CO₂ yerine alternatif olarak O₂'ne transfer olmakta ve O₂, toksik etkinliği çok yüksek olan metabolitlere (O₂ türevlerine) dönüşmektedir (süperoksit radikal, hidrojen peroksit, singlet oksijen ve hidroksil radikal) (Cakmak 2000; Asada 2000; Gökmen 2006). Toksik O₂ türevleri hücrede özellikle zar lipid ve proteinler, klorofil ve DNA gibi önemli hücre bileşenleri (komponentlerinin) oksidatif olarak parçalanmasını doğrudan katalize etmektedir. Bitkiler, toksik O₂ türevlerine karşı enzimatik antioksidatif savunma mekanizmalarına sahiptir (Gressel and Galun 1994; Cakmak 1994; Foyer *et al.* 2005; Turan 2007). Bu mekanizmalardan süperoksit dismutaz (SOD), O₂'nin, askorbat peroksidaz (APaz), katalaz (KATaz) ve glutatyon redüktaz (GRaz) ise H₂O₂'nin detoksifikasyonunda rol oynamaktadır. Ayrıca, askorbik asit, vitamin E, glutatyon, β-karotin ve zeaxanthin karotenoidi gibi antioksidant bileşikler, toksik O₂ türevlerine karşı hücreleri korumaktadır. Bu mekanizmaların etkinliği bitki tür ve genotiplerinde değişiklik göstermekte ve dolayısıyla oksidatif stres faktörlerinden farklı şekilde etkilenmektedir. Bitkiler, diğer fotosentetik organizmalar gibi, atmosferik oksijenin varlığında gelişirler. Oksijenin büyük enerji potansiyelini kullanabilmek ve aynı zamanda bu oksidantın ve reaktif oksijen türleri olarak bilinen O₂'den türemiş aktif moleküllerin yıkıcı (zararlı) etkilerini sınırlayabilmek için metabolik yollar geliştirmişlerdir (Navrot *et al.* 2007).

Reaktif oksijen türleri (ROT) [süperoksit molekülü (O₂^{•-}), singlet oksijen (¹O₂), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikalleri (OH[•])] normal hücre metabolizması ürünleridir ve savunma mekanizmaları tarafından ortamdan uzaklaştırılırlar (Scandalios 2001). Normal koşullar altında ya da çeşitli streslere (soğuk ve donma, kuraklık, kuruma, sel, herbisit uygulamaları, patojen saldırılar ve radyasyon) maruz kalma sırasında hem kloroplast hem de mitokondri ROT üretir. Elektron taşıma zincirindeki aksaklıklara bağlı olarak CO₂ fiksasyonundaki kısıtlamalar kloroplastlarda ROT oluşumunun esas nedenidir. Mitokondride ise benzer olarak stres koşulları altında elektron taşıma zincirinde (ETS) meydana gelen aksaklıklar ROT üretiminin başlıca mekanizmasıdır (Davidson and Schiestl 2001; Suzuki and Mittler 2006). ROT zar lipidlerinin peroksidasyonuna, DNA zincirlerinin kırılmasına ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olur (Cheng and Song 2006; Turan 2007). Stres koşulları sonucu oluşan ROT

uzaklaştırma mekanizmalarının yetersiz kalması yüzünden bitkide oksidatif stres meydana getirir. Oksidatif stres protein karbonilasyonuna, disülfid ve ditrozin köprülerinin oluşmasına, hidrofobik etkileşimlerden dolayı protein yığılmalarına neden olur (Tambussi *et al.* 2004). Düşük sıcaklıklarda ROT oluşum oranı artar, çünkü absorblanan enerjinin gönderileceği havuzlar azalır (Hull *et al.* 1997; Scebba *et al.* 1998).

Genellikle kloroplastlar fotooksidasyon nedeniyle reaktif oksijen türlerinin (ROT) ana kaynağıdır, fakat fotosentetik olmayan dokulardaki, diğer elektron taşıma sistemleride (ETS), reaktif oksijen türlerinin oluşumuna katkıda bulunabilirler. Örneğin; mitokondri, düşük sıcaklıklarda soğuk hassas bitki dokularındaki süperoksitin ($O_2^{\bullet-}$) ana kaynağıdır, ve antioksidant sistemlerdeki azalma sonucu organellerde hidrojen peroksit (H_2O_2) birikimine neden olur (Purvis *et al.* 1995; Zykova *et al.* 2002). Oksijenin tek elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan ilk oksiradikal ürün, süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hücrede meydana gelen reaksiyonlar nedeniyle diğer reaktif oksijen türlerini (ROT), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) ve singlet oksijen ($^1O_2$) gibi, oluşturabilir (Şekil 1.1) (Alscher *et al.* 1997).

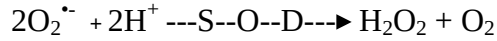


Sekil 1.1. Moleküler oksijenden (O_2) türeyen ROT'ların kendi içlerindeki dönüşümleri. $*O_2$ aşırı enerjiyle çiftleşmemiş elektronlardan birinin ters dönmesi sağlanarak aktive edilebilir ve singlet oksijen oluşur ($^1O_2$). Alternatif olarak, bir elektronun indirgenmesi süper oksit ($O_2^{\bullet -}$) radikalının oluşumuna neden olur. $O_2^{\bullet -}$ konjuge asidi olan hidroperoksil radikali ($HO_2^{\bullet}$) denkleminde yer alır. Sonraki indirgenme basamaklarında ise hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) ve su (H_2O) oluşur. Hücrelerde yükseltgenmiş formda bulunan metal iyonları (Fe^{+3}, Cu^{+2}) $O_2^{\bullet -}$ varlığında indirgenirler ve dolayısıyla, Fenton ya da Haber-Weiss reaksiyonları aracılığıyla H_2O_2 'nin $OH^{\bullet}$ 'a dönüşümü katalizlenebilir (Vranová *et al.* 2002; Turan 2007).

Süperoksit negatif yüklü bir moleküldür ve bu nedenle biyolojik zarlardan geçemez. Bu radikal kloroplastlarda meydana gelen Mehler reaksiyonu ve/veya mitokondrideki elektron sızıntıları sonucunda oluşur. Orta dereceli reaktivite gösterir fakat devamında oluşturduğu hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri ($OH^{\bullet}$) hasarın oluşmasında etkindir. İki molekül süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$) süperoksit dismutaz (SOD) antioksidan enzimi ile ortamdaki uzaklaştırılır.

Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (Fridovich 1986; Güler 2008; Genişel 2010). Süperoksit dismutaz, ilk kez Mann ve Keilis (1938) tarafından izole edilmiş ve başlangıçta bir bakır depo proteini olduğu düşünülmüştür. Bu enzimin katalitik fonksiyonu keşf edilene kadar eritrokuprein, indofenol oksidaz ve tetrazolium oksidaz gibi isimlerle adlandırılmıştır. Canlı organizmalar SOD ile süperoksiti uzaklaştırır ve Haber-Weiss reaksiyonu ile hidroksil radikalının ($OH^{\bullet}$) oluşum riskini azaltır.

Süperoksit dismutaz, süperoksit anyonlarını ($O_2^{\bullet-}$) uzaklaştırmasına rağmen toksik bir oksijen türevini ($O_2^{\bullet-}$)'yi H_2O_2 'ye dönüştürür (Mehlhorn 1996). Bu reaksiyon sonucunda oluşan H_2O_2 , fotosentezin güçlü bir inhibitörüdür ve kloroplast fonksiyonu için risk oluşturur. Bu toksik ürün peroksidazlar tarafından temizlenebilir.



Süperoksit dismutaz (SOD) bütün aerobik organizmalarda ve aktifleşmiş oksijen üreten bütün hücre alt yapılarında bulunduğu için oksidatif strese karşı savunmada merkezi bir rolünün olduğu düşünülmektedir (Bowler *et al.* 1992). Stres şartları altında artırılmış antioksidan kapasitesi, oksidatif hasarın etkisini azaltmak için her zaman yeterli olmayabilir. Bu yüzden stres toleransını sağlayan sinyal moleküllerle yapılan çalışmalar, bitkilerin olumsuz çevrelere nasıl uyum sağladıklarını anlamamıza büyük destek sağlayacaktır.

İki molekül süperoksit radikalinden ($O_2^{\bullet-}$) meydana gelen hidrojen peroksit (H_2O_2) DNA kırılmalarına, protein denatürasyonlarına ve aynı zamanda kloroplast stromasının thiorredoksin enzimleri gibi tiol içeren enzimlerin inaktivasyonuna neden olur ve bitki hücreleri için çok toksiktir (Hagar *et al.* 1996). Yüksüz bir moleküldür ve difüzyonla yer değiştirebilir. H_2O_2 , kloroplast ve mitokondride fotokimyasal ve solunum olayları sonucu oluşur. Ayrıca peroksizomlarda fotosolunum sırasında glikolat glioksilik aside yükseltgendiğinde de üretilir (Mittler *et al.* 2004; Mutlu 2005; Turan 2007).

Hidrojen peroksitin (H_2O_2) ortamdan uzaklaştırılmasını katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve peroksidaz (POD) enzimleri sağlar. Düşük sıcaklıklarda, artan süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) ve azalan antioksidant enzim aktiviteleri nedeniyle hücrede hidrojen peroksit (H_2O_2) birikimini indükler (O'Kane *et al.* 1996). Hidrojen peroksit (H_2O_2) Fenton reaksiyonu ile hidroksil ($OH^{\bullet}$) ya da süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) dönüştürülür (Bolwell and Wojtaszek 1997). Hücre zar ve organelleri reaktif oksijen

türlerinin (ROT) hasar verici etkisinden korumak için bitkilerde antioksidan sistemleri oldukça önemlidir (Lee and Lee 2000). Soğuk stresi gibi çevresel stresler metabolik fonksiyon bozukluklarına ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretiminin artmasına neden olurlar. Zararlı ROT detoksifikasyonu için gereken yüksek verimli antioksidan savunma sistemleri tüm bitki hücrelerinde bulunur (Seppänen and Fagerstedt 2000). Bu antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve enzimatik olmayan olarak sınıflandırılır (Hernández-Nistal *et al.* 2002).

Enzimatik savunma sistemleri süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), peroksidaz (POD), glutatyon redüktaz (GR) ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) enzimlerinden oluşurken, enzimatik olmayan savunma sistemlerini askorbat (ASA), glutatyon, karotenoid, a-tokoferol, antosiyanin ve flavonoidler oluşturur (Choi *et al.* 2002; Turan 2007). Antioksidan savunma sistemlerinin stres koşullarına verecekleri cevaplar tamamıyla bitki türüne, stres çeşidine ve stresin uygulanma zamanına bağlıdır. Sıcaklıktaki düşüşün enzimler üzerine etkisi, substrat doymunluğunda maximum katalitik aktivitedeki değişim olarak ifade edilir. Bu nedenle, düşük sıcaklıklar reaktif oksijen türlerini (ROT) uzaklaştıran enzim sistemleri ve antioksidan metabolitler yoluyla sağlanan korumayı azaltır (Hull *et al.* 1997).

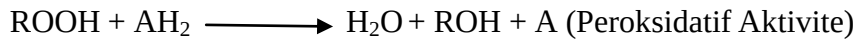
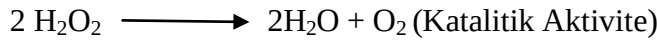
ROT' lar direkt hasara neden olabildikleri gibi birbirlerini etkileyerek, en reaktif radikal olan hidroksil radikalini ($\cdot\text{OH}$) oluşturmakta ve doymamış yağ asitlerine etki etmektedirler (Wood and Smith 1991). Otooksidasyon sonucu veya daha farklı yollardan oluşan serbest radikallerin oranı, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranda olursa, organizmadaki biyomoleküller bu durumdan olumsuz olarak etkilenmektedirler. Bu etkiye en hassas olan moleküller lipidlerdir. zarlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır ve bu reaksiyon kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile oluşan zar hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkuş 1995). Lipid peroksidasyonu zarın bütünlüğünün yok olmasına, hücrenin elektrolitlere

geçirgenliğinin artmasına neden olur (Halliwell 1984). Birçok hücrel hasardan sonra meydana gelen dokuların dejenerasyonu, serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu sonucu oluşur (Şimşek 1999). Biyolojik sistemlerde Lipid peroksidasyonu başlatan serbest radikalın, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ile özellikle de hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidinin radikal özelliği kazanmasına neden olmaktadır. Böylece oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir. Molekül içi konjuge edilen bağlarının farklı duruşlara (Position) gelmesi ile değişikliğe uğrayabilen kararsız lipid radikalının moleküler oksijenle tepkimesi sonucu lipid peroksit radikali meydana gelir (Spiteller 2001; Kuru 2007; Genişel 2010). Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak reaktif olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehid (MDA) meydana gelir (Yılmaz ve Ozan 2003). MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik (özel) ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonunun derecesi ile iyi bir bağlılık (correlation) gösterir. Bu mantikle organizma da oluşan lipid peroksidasyon (LPO) seviyesini ölçmek için MDA düzeylerinin ölçümü, çoğunlukla kullanılan bir yöntemdir (Yılmaz ve Ozan 2003; Kuru 2007).

Zararlı bir forma dönüşmeksizin ROT'ları temizleyebilen bileşikler antioksidan olarak adlandırılır. Bitkiler, hücrelerini oksidatif hasardan koruyan antioksidan sistemler ile birlikte ROT' un seviyesini kontrol eden ve bunların normal formlarına dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimlere de sahiptir (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003; Mutlu 2005). Bu enzimler; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), peroksidaz (POD) enzimleridir. Antioksidan enzimler koordineli bir şekilde ROT' ları temizlerler veya onları daha az toksik olan bileşiklere metabolize ederler.

Tabiatı çok yaygın dağılım gösteren katalaz (CAT) aerobik organizmaların hepsinde omurgalılarda, omurgasızlarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunmaktadır (Bergmeyer

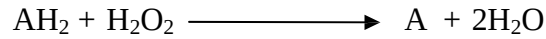
and Grabl 1983). Katalaz (CAT) yüksek miktardaki H_2O_2 'nin iki elektronunu kullanarak suya (H_2O) ve oksijene (O_2) indirgenmesini katalizleyen demir porfirin içeren tetramerik ve yüksek molekül ağırlığına sahip bir enzimdir (McClung 1997; Chaudiere and Ferrari 1999). Aynı zamanda katalaz (CAT), düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite gösterebilir (Chaudiere and Ferrari 1999). CAT'ın görev aldığı reaksiyonlar aşağıdaki gibidir.



Pek çok bitki hücresinde enzimlerin büyük bir kısmı, H_2O_2 'nin yüksek olduğu peroksizomlarda bulunur. Katalaz (CAT) çok az konsantrasyon mitokondri matriksinde de bulunur. Katalazın bitki dokusunda H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Patykowski and Urbanek 2003). Solunum zincirinde, oksijenin eksik indirgenmesinden oluşan H_2O_2 'yi O_2 'ye indirger (Chaudiere and Ferrari 1999). Katalaz'ın temel fonksiyonu, moleküler O_2 mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, radikal karakterli H_2O_2 'nin radikalliğini gidererek özellikle zarlarda oluşabilecek geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir (Scandalios 1993; Chaudiere and Ferrari 1999; Mutlu 2005). Bu özelliğine karşın katalaz (CAT), kararlı bir enzim değildir. Yüksek ışık yoğunluğu ve stresli bitki hücrelerinde oluşan H_2O_2 'nin yüksek miktarlarıyla engelliyor (Feierabend *et al.* 1992; Streb *et al.* 1993; Güler 2008).

Peroksidaz (POD) enziminin çok sayıda fizyolojik olayda rol oynadığı ve birçok metabolik olayın gerçekleşmesine yardımcı olduğu açıktır. Stres altındaki bitkilerde POD aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Gaspar *et al.* 1991). Düşük sıcaklık, SO_2 , tuzluluk, parazit enfeksiyonu, patojenler, UV-ışık tesirleri gibi çeşitli stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenen POD aktivitesi, bu enzimin stres enzimi

olarak hatırlamasına (anılmasına) sebep olmuştur (Kerby and Somerville 1992; Bakardjieva and Christov 1996; Lee and Lin 1996 a, b; Chanda and Singh 1997; Kim *et al.* 2000; Taşgın *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2009; Genişel 2010). Peroksidaz (POD), hidrojen (H^+) vericisi olarak birçok organik ve inorganik substratı kullanarak H_2O_2 'yi temizlerler ve hidrojen vericisi olarak kullandıkları substrata göre isimlendirilirler. POD aktivitesi, dış kaynaklı sinyallere ve zor çevre koşullarına cevap olarak hızlı bir şekilde değişebilir. Çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahip olan Peroksidaz (POD), bitkilerde büyük seviyede bulunur. POD elverişsiz çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve bitki hücresinin en önemli koruyucu enzimlerinden birisidir (Bakardjieva and Christov 1996). POD' lar aşağıdaki reaksiyonu katalizlerler.



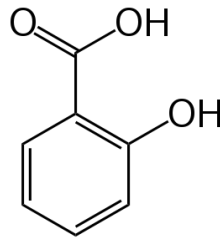
Bitkilerde reaksiyon sonucu;

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

2. Hücre duvarına bağlı fenollerin oksidatif polimerizasyonu ile çapraz bağlanmalar olur ve hücre duvarı sertleşir. Sonuç olarak peroksidazlar H_2O_2 'yi kontrol altında tutarak hücre duvarının yapısına katılmasını sağlarlar. Peroksidazların spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum PH gibi biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimleri bulunur. POD' lar organizmaya bağlı olmakla birlikte 3 sınıfa ayrılabilirler (Banci 1997).

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

Salisilik asit (SA) veya diğ er adıyla ortohidroksi benzoik asit, bitki fenolikleri grubundan bir bileşiktir. Son  alışmalar, SA'nın çevresel streslere karşı, bitki savunma cevabı oluşmasında kullanılan, hormon benzeri doğal bir sinyal molekül olduğunu göstermektedir. Bunun yanında, bazı araştırıcılar SA'nın doğal bir bitki hormonu olduğunu da kabul etmektedirler.       SA bitki dokularında çok düşük konsantrasyonlarda sentezlenir ve bitkinin diğ er dokularına taşınarak fizyolojik cevapların oluşumunu sağlar (Raskin 1992a, b; Kocaçalışkan 2004). Serbest SA, 157-159 C'de eriyen toz kristali şeklindeyir. Suda az çözünürken, polar organik çözücülerde iyi   z n r. Sulu   zeltilerinin pH'sı 2.4 tür. SA bitkide aktif bir şekilde taşınabilir ve metabolizmaya katılır. Hem de dışsal uygulama noktasından bitkinin farklı dokularına kolaylıkla yayılabilir (Raskin 1992 a, b). Bitki kaynaklı salisilatlar antik çağdan beri tıpta kullanılmaktadır. 1828'de Münih'te ilk kez salisilin, s ğ tten izole edilmiş ve sonra söğüt ağacının Latince ismi olan *Salix*'ten dolayı salisilik asit olarak isimlendirilmiştir (wikipedia; Mutlu 2005).



Salisilik asit

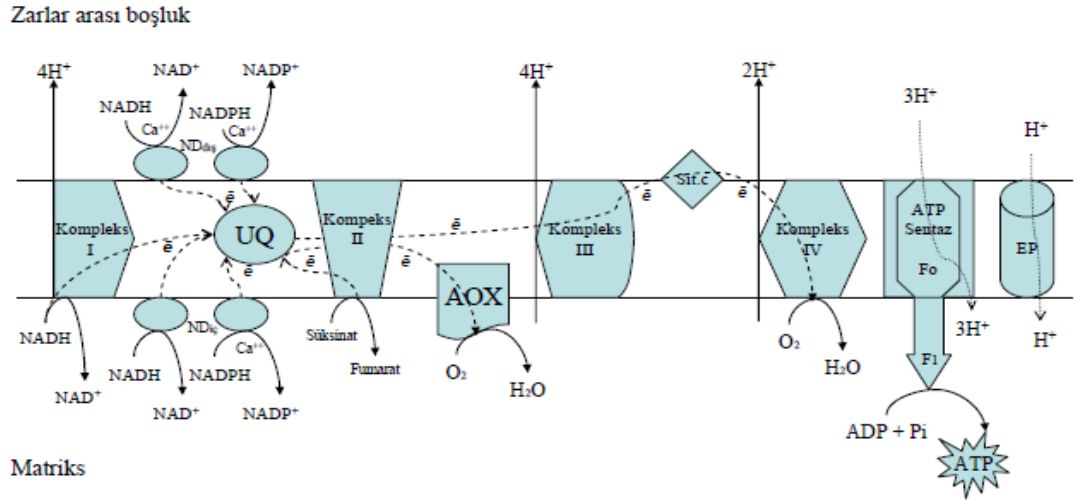
Modern analitik teknikler kullanılarak, pek çok önemli bitki türünün salisilatları sentezledikleri bulunmuştur. Salisilik asitin (SA'nın) en yüksek seviyesi patojen istilasına(iřđalina) uğramış(maruz) bitki doku ve nekrozlarında belirlenmiştir (Raskin 1992a,b; Durner *et al.* 1997; Mauch-Mani and Metraux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

salgılanan bitkinin çevresinde büyüyen birçok bitkinin büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur (Schettel and Balke 1983).

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

Alternatif Oksidazın Redoks Yanıtları

Aerobik organizmalarda glikoliz, trikarboksilik asit döngüsü (TCA), ve mitokondriyal elektron taşıma sistemi (miETS) biyoenerjetik ve karbon metabolizmasının esasını oluşturur. Solunum tüm bitkilerde büyüme, hayatın devamı ve karbon muvazenesi için en temel ögedir. Solunum enzimlerinin büyük çoğunluğu bütün organizmalarda aynı olsa da bitki solunum sistemi, başka çoğu organizmalarda bulunmayan metabolik bir iplik ile kuşatılmıştır. Bitkiler sitosolik glikolizis, TCA döngüsü ve miETS de farklı alternatif enzimlere sahiptirler. Bitkilerde solunum metabolizmasının değişken doğası ATP üretiminin yanı sıra çok değişik ve önemli biyosentetik role de sahip olduğunu gösterir.Bitkiler, hayvanlar ve çoğu mantar ve tek hücrelilerde solunum zinciri esas olarak dört büyük enzim kompleksi içerir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Bitki mitokondri iç zarlarında yerleşmiş elektron taşıma sisteminin düzenlenişi ve ATP sentezi.

*Kompleks I-IV, ATP sentaz ve eşleşmeyi engelleyen proteinler (EP) genel olarak yüksek yapılı ökaryotlarda bulunurlar. Mitokondri iç zarlarındaki üç enzim kompleksi tarafından protonların matriksten zarlar arası boşluğa pompalanmasıyla ATP sentazın kullandığı bir proton gradiente oluşur. Bitkiler, bunlara ilave olarak Alternatif Oksidaz (AOX) ve NAD(P)H'ların oksidasyonunu sağlayan dört ayrı, proton pompalamayan ve rotenon duyarlı NAD(P)H dehidrogenaz enzim sistemleri (ND) içerir. Ca^{++} bazı enzim aktiviteleri için gereklidir. Ubikinon (UQ) havuzu solunum zincirinin indirgenen (UQ) ve yükseltgenen (UQH₂) formlarını barındırır.

Kompleks I, matriksdeki NADH'ları okside eder ve elektronları Ubikinon (UQ) havuzuna transfer ederek UQ'u Ubikinol'a (UQH₂) indirger. Kompleks II (Süksinat dehidrogenaz), süksinatın oksidasyonu ile UQ'u indirgeyen bir membran-bağlı sitrik asit yolu enzimidir. Elektronlar, kompleks III (Sitokrom bc₁ kompleksi), sitokrom c ve kompleks IV (sitokrom c oksidaz) den oluşan sitokrom yolunu takip eder. O₂'in H₂O'ya indirgenmesini sağlayan kompleks IV, elektron taşımada son basamağı oluşturur. Kompleks I, III ve IV mitokondri iç zarı üzerinden protonların translokasyonu için gerçekleştirilen elektron transportu ile oluşan elektrokimyasal proton gradiyentinden kaynaklanan enerjiyi kullanır. Zarlar arası boşluğa pompalanan protonların ATP sentaz üzerinden matrikse gelmesiyle beraber ATP üretimi gerçekleşir (Browse *et al.* 2006). Bütün bunların yanında mitokondriyal iç zarlarda yerleşmiş fakat solunum zincirine yerel olmayan “eşleşmeyi önleyen proteinler” olarak isimlenmiş özel bir protein grubu da vardır. Bu proteinler ATP üretimi olmaksızın protonların zarlar arası boşluktan matrikse geçişine izin verir (Veresi 2001; Fernie *et al.* 2004).

Bitkilerde özel bir alternatif solunum yollarının olması, proton pompalamayan tip II NAD(P)H dehidrogenazlar, elektronları direkt ubikinon havuzundan alan alternatif oksidazlar (AOX), atlatma (bypass) proteinleri ve eşleşmeyi önleyen proteinlere sahip olan bitki mitokondrilerinin en seçici özelliğidir (Rasmusson *et al.* 2004; Vanlerberghe and McIntosh 1997; Vercesi 2001). Bu alternatif yollar proton pompalamaz ve elektron taşınma sisteminin (ETS) fazlasıyla indirgenmesini engelleyen ATP üretimiyle gelen elektronların eşleşmemesini sağlar.

Hayvanların tersine bitki, mantar ve bazı protistler, son elektron alıcısı olan O_2 'e NADH ve NADPH'dan gelen elektronların taşımak (transport) için ilave enzimler içerirler (Vanlerberge and McIntosh, 1997; Rasmusson *et al.* 2004). Bunlar, küçük, her biri bir tip polipeptidten oluşan ve proton pompalamayan enzimlerdir. Bununla birlikte proton pompalamayan ve iç mitokondri zarının iç ve dış yüzeylerine yerleşmiş NAD(P)H dehidrogenazlar içerirler (Şekil 1.1). Böylece bitki mitokondrileri, bu dehidrogenazlar sayesinde matriks ve sitosölden gelen NADH ve NADPH'ları direkt olarak okside edebilme kabiliyetine sahiptirler (Rasmusson *et al.* 2004). Bitki solunum zinciri ayrıca UQH_2 'i okside eden ve O_2 'i indirgeyen ve yine proton pompalamayan alternatif oksidaz (AOX) içerir. Alternatif oksidaz üzerinden elektron taşınımı ile elektronlar, proton pompalanan üç bölgenin ikisinden (Kompleks III ve IV) geçmez ve alternatif yolda UQ ve oksijen arasında enerji elde etme yeri bulunmadığından bu yol ile elektronların taşınmasından (transportundan) kaynaklanan enerji ısı olarak yayılır (Vanlerberghe and McIntosh 1997; Millenaar and Lambers 2003).

Termojenik bitkilerde belirlenmiş ısı üretiminin aşırı durumları çoğalan O_2 tüketimi ile ilgilidir. Örneğin, ortam sıcaklığı $5^{\circ}C$ iken *Philodendrum selloum* çiçekleri sıcaklıklarını yaklaşık $40^{\circ}C$ civarında tutabilir (Nagy *et al.* 1972). Bir nilüfer türünde (*Nelumbo nucifera*), termogenezis süresince O_2 'e elektron taşınımı çoğunlukla AOX üzerinden gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Watling *et al.* 2006). Bu yolla ısı üretiminin anterlerde aromatik bileşikleri buharlaştırmak yoluyla tozlaştırıcıları (pollinatörleri) cezbetmek için kullanıldığı da ileri sürülmüştür (Meeuse 1975). öteyanan çiçeklerde termoregülasyonun (Thermoregulation), tozlaşmanı (pollination) sağlayan böcekler için

termal bir ödöl olduğunu bildiren deliller de vardır (Seymour *et al.* 2003). Bütün bunlarla birlikte termojenik olmayan dokularda Alternatif oksidaz (AOX) aktivitesi organ sıcaklığı üzerine hemen hiç etki göstermez (Watling *et al.* 2006). Sitokrom yolunun tersine Alternatif oksidaz, Antimisin A ve siyanide dirençlidir. Siyanid ve Antimisin A- dayanıklı O₂ tüketimi bütün angiospermelerde, çoğu mantar ve protistlerde yaygındır (Vanlerberghe and McIntosh 1997).

Bitkilerde okside edilen solunum substratlarının büyüme, depolama veya ATP sentezi için gereksinim duyulandan daha çok olması durumunda, alternatif yolun bu substratların okside edildiği, diğer bir deyişle “enerji fazlalığı” yolu olarak işlev gördüğü öne sürülmüştür (Lambers 1982). Bu görüşe göre, sadece elektronların temel bir solunum yolu aktivitesinin doyumluğa ulaşmasından sonra alternatif yolu kullandıkları belirtilmiştir. Fakat unutulmaması gereken mühim bir nokta, *in vivo* da eğer solunum hızı hücrenin ATP ihtiyacını karşılasa ancak o zaman doyumluk ortaya çıkabilir. Bununla birlikte sitokrom yolunun doyumluğa ulaşmasından önce de alternatif oksidazın aktif olabileceği gösterilmiştir (Fiorani *et al.* 2005; Çakmak 2010). Dolayısıyla alternatif oksidaz, mitokondriye biyosentetik reaksiyonlarda kullanılan karbon iskeletinin sentez ve ATP’nin nispi üretim hızlarını ayarlama imkanını sağlar. Alternatif yolun başka bir işlevinin, mitokondride solunumu önleyen çeşitli streslere (fosfat eksikliği, soğuk, kuraklık, osmotik stres v.s.) karşı bitkilerin oluşturduğu bir cevap olabileceği belirtilmiştir (Wagner and Krab 1995). Elektron transfer zincirinden elektronların boşalmasıyla alternatif yol ubikinon havuzunun aşırı indirgenme potansiyelini inhibe eder. Eğer bu yapılmazsa, söz konusu elektronlar süperoksit anyonları (O₂^{•-}) ve hidroksil radikalleri (OH⁻) gibi zararlı reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumuna yol açabilir. Bu şekilde alternatif yol, solunum üzerindeki stresin hasarlı etkilerini azaltabilir (Wagner and Krab 1995; Moller 2001).

Esasta tüm organizmalar oksidasyon-redüksiyon (redoks) sistemleridir. Bu sıfatla, organizmalar hücrel enzim seviyelerini belli bir düzeyde tutmak ve indirgeyici havuzlarının (NAD, NADP, FAD gibi) diğer hücrel gereksinimlere göre devamlı oksidasyon durumunda kalması gibi bir durumla karşı karşıya kalırlar (Foyer and

Noctor 2003; akmak 2010). Hücresel indirgeyicilere olan daimi gereksinim ve bu gereksinimi karşılamak için yenilerinin üretilmesi durumları göz önünde bulundurulunca indirgeyiciler, gelişimsel ve çevresel şartlara yanıtta hücresel redoks homeostazisini sürdürmek için gerekli olan dinamik ve son derece hassas mekanizmalara bağılı olarak çok değişkenlik gösterirler. Redoks dengesizliğinden kaynaklanacak olan reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı üretimi, oksidatif stres, hücre döngüsünün engele maruzkalması – durması ve apoptotik veya nekrotik (nekroz) hücre ölümleri gibi sonuçları göz önünde bulundurulunca redoks düzenleme mekanizmaları hücresel (ve organizmal) canlılığın sürdürülebilmesi için hayati öneme sahiptir.

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Leguminosae (650 cins, 18000 tür) familyasının dünyada çok geniş bir yayılım alanına sahip bir üyesidir (Doğan 2006). Anavatanı Güney Amerika'dır ve ülkemize yaklaşık 250 yıl önce geldiği tahmin edilmektedir. Yurdumuzun hemen her yerinde ekilen ve çok fazla üretimi yapılan fasulyenin en fazla yetiştirildiği bölge karadeniz'dir. Anadolu'da da bölge koşullarına uyan kurağa dayanıklı türleri bulunmakta ve 1000 m'den daha yükseklerde kolaylıkla yetişmektedir (Acar 1999; Uluocak 1984; Doğan 2006).

Ülkemizin hemen her yerinde yetiştirilen bitkinin çok yaygın olarak üretimi yapılmaktadır. Son zamanlarda çeşitli hastalıklara olan etkileri de keşfedilmiştir. Tedavi amaçlı olarak şeker hastalığında, romatizmada, eklem şişmesinde kullanıldığı gibi böbrek iltihaplanmasından dolayı oluşan şişliklerde idrar söktürücü olarak kullanılmaktadır. Fasulyenin kökenini bazı araştırmacılar Hindistan, bazı araştırmacılar ise avustralya ve Afrika olarak bildirmiştir. Ancak en son olarak fasulyelerin kökeninin amerika olduğu ileri sürülmüş ve kabul edilmiştir. Kültür fasulyesinin yabani formunun tam olarak bilinmemekle birlikte Meksika ve Orta Amerika'daki tek veya çok yıllık sarılıcı formların olduğu tahmin edilmektedir. Bodur formlarda yabani fasulye bulunmamakta olup, mutasyon sonucu ortaya çıktığı belirtilmektedir. Meksika'da çok eski yıllardan beri fasulye tarımının yapıldığı saptanmıştır. Fasulye amerika'nın keşfinden sonra İspanyollar tarafından Avrupa'ya getirilmiş buradan da asya'ya geçirilmiştir. Ülkemizde fasulye tarımının diğer yemeklik baklagillerden sonra başladığı

ve yaklaşık 200 yıldan beri kültürünün yapıldığı tahmin edilmektedir (Anlarsal 2005; Kaya 2011). Orta Amerika kökenli bir sebze türü olan fasulye dünyada çok geniş yayılma alanı bulmuştur (Madakbaş vd 2006). Fasulye insan gıdası olarak dünyada yetiştiriciliği yapılan en önemli *fabaceae* türüdür. Kültürü yapılan diğer fasulye türleri arasında %90 ağırlıkla *Phaseolus vulgaris* L. yetiştiriciliği yapılmaktadır (Graham ve Ranalli 1997). Dünyada toplam fasulye üretim alanı 26 milyon hektar civarında olup, üretim miktarı ise 19.7 milyon ton kuru fasulye ve 6.8 milyon ton taze fasulye olarak toplam 26.5 milyon ton dolaylarındadır (FAO 2009). Türkiye’de toplam fasulye yaklaşık 169 bin hektar alanda yetiştirilmekte ve bu alanda yaklaşık 181 bin tonu kuru fasulye, 603 bin tonu ise yeşil fasulye olmak üzere toplam yaklaşık 785 bin ton dolaylarında üretim gerçekleştirilmektedir (Çizelge 1.2)

Çizelge 1.2. Dünya ve Türkiye’de taze ve kuru fasulye üretim miktarları ve alanları

	Üretim Alanı (ha)		Üretim Miktarı (ton)	
	Taze Fasulye	Kuru Fasulye	Taze Fasulye	Kuru Fasulye
Türkiye	72,000	97,451	603,653	181,205
Dünya	960,272	25,211,468	6,814,403	19,723,330

Dünya taze fasulye üretim alanı ve üretim miktarı bakımından Çin 243 bin hektar alanda yaklaşık 2.7 milyon ton üretim ile ilk sırayı almaktadır. Çin’den sonra 142 bin hektar alanda yaklaşık 880 bin ton üretim ile Endonezya gelmektedir. Türkiye dünya üretimi ve ekiliş alanı bakımından bu iki ülkeden sonra üçüncü sırada yer almaktadır (FAO 2009). Diğer türlerle kıyaslandığında, baklağiller tuzluluğa en hassas grup içinde yer almakta ve fasulye’nin tuza en hassas türlerden olduğu bilinmektedir (Ashraf, 1994). Bir tür içerisindeki genetik çeşitlilik, tuzluluğa dayanıklılık çalışmaları için çok değerli bir olanak sunmaktadır. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*, L.), tüm dünyada yetiştiriciliği yaygın olarak yapılan önemli ürünlerden birisidir ve tuzluluğa karşı oldukça duyarlıdır (Marchner 1995). Birincil anavatanı olmamakla birlikte ülkemiz fasulye ve börülcedeki genetik zenginlik bakımından önemli ülkelerden biridir (Daşğın vd 2006).

Fabaceae (*Leguminosae*) familyasında yer alan fasulye genellikle dikildiği yerdeki bir desteğe sarılarak büyüyen, tek veya çok yıllık türleri olan, otsu bitkidir

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Literatür de düşük sıcaklığın bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerini gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Soğuk stresi (0 ila 15⁰C), Bitkilerde çok sıcak (tropical) ve yarı tropikal bölgelerde doku bozulmasına (lezyonuna) neden olur, ve bitkilerin biyokimyasal ve fizyolojik proseslerini değiştiriyor. Soğuk stresi bitkilerde zarın yapısına ve lipidlerin, dolayısıyla hücre metabolizması, fonksiyonelerinde (özellikle Tarla Bitkileri) değişim oluşturdur (Allen *et al.* 2001). Bitkiler optimum büyüme için belli bir sıcaklık aralığına ihtiyaç ve bu aralık bir stres olarak kabul edilebilir. Rapor edilmiştir ki bitkiler 0 ila 15⁰C arasındaki sıcaklığa maruz kaldıkları zaman, fizyolojik değişikliklere oluşacak (Seppanen 2000). Son yıllardaki çalışmalarla birçok bitkinin donma stresine karşı korunmak için özel mekanizmalar geliştirdikleri ortaya konmuştur (Griffith 1997; Ewart 1999; Yu and Griffith 2001). Çalışmamızın bu açıdan literatürdeki önemli bir boşluğu dolduracağını düşünüyoruz.

Bu güne kadar yapılan birçok çalışmada, soğuğa dirençli bitkilerin soğuk stresine karşı tolerans sağlamak için özel mekanizmalar geliştirdikleri çok sayıda araştırmacı tarafından öne sürülmüştür (Griffith 1997; Ewart 1999; Yu and Griffith 2001; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşğın *et al.* 2006; Mutlu 2009; Esim 2011). Kışlık bitkilerde soğuk toleransının artması, düşük sıcaklığa önemli bir uyum (aklimasyon) periyodundan sonra gelişir. Bu peryod, birçok farklı mekanizmanın yanında, düşük sıcaklıkta sentezi artan proteinlerin toplamını da sağlar. Bu proteinlerin bazıları, donmadan koruyucu kriyoproteinler, kinaz düzenleyicileri (regülatörleri), dehidrin içerenler ve intraselüler olanlardır (Jarillo 1994; Close 1997; Wisniewski 1999; Mutlu 2009; Esim 2011). Ayrıca, soğuğa karşı dayanıklılığın kazanılmasında artan antioksidan savunma sistemlerinin de bu mekanizma içerisinde belirgin role sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Yang *et al.* 2001; Posmyk *et al.* 2005; Taşğın *et al.* 2006; Morsy *et al.* 2007; Mutlu 2009; Esim 2011).

Soğuk şartlara maruz kalan bitkilerde meydana gelen donma zararı üzerine birçok çalışma mevcuttur. Soğuğa dirençli ve duyarlı dört farklı mandalina çeşidine ait

meyveler, soğukta depolanmış ve bunların donma hasarına bakılmıştır. Mandalinanın *Clementine* ve *Clemenules* çeşitlerinde donma hasarı çok düşükken, *Fortuna* ve *Nova* çeşitlerinde donma hasarının oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (Sala 1998). Yine *mandalina* ile yapılan bir araştırmada, meyveleri yüksek sıcaklık şartlarına maruz bırakılmış ve bitkide donma hasarına bakılmıştır. Kontrol şartlarındaki bitkilerde donma hasarı düşükken, sıcaklık muamelelerine maruz kalan bitkilerde ise donma hasarının arttığı tespit edilmiştir (Sala *et al.* 2000). Düşük sıcaklığın depolanmış 4 çeşit mandalina türünde donma hasarının tolerant türlere nispeten hassas türlerde daha fazla olduğunu tanımlanmıştır. Chang *et al.* (2001) *Mung bean* bitkisinin soğuk şartlarda (4°C) bekletilmesi halinde, bekleme süresi uzadıkça donma hasarının arttığını gözlemlemiştir.

Kışlık çavdar, karalahana ve kışlık buğday ile yapılan araştırmalarda, bitkiler bir aklimasyon periyodu boyunca düşük sıcaklıklarda yetiştirilmiş ve düşük sıcaklıklara aklime olan bitkilerde, aklimasyon yapılmayan kontrol bitkilerine göre, donma hasarının azaldığı tespit edilmiştir (Marentez *et al.* 1993; Atıcı and Nalbantoğlu 1999a; Taşgın *et al.* 2003; Mutlu 2009; Esim 2011). Özellikle, kışlık buğday yapraklarındaki hasarda %50 azalmanın olduğu belirlenmiştir. Donma hasarındaki bu düşüşte apoplastik bölgenin rolünü belirlemek için, apoplastik bölge sıvısı yapraklardan uzaklaştırıldıktan sonra, yapraklarda donma hasarının %10 arttığı belirlenmiştir (Atıcı and Nalbantoğlu 1999a).

SA'nın sıcak ve soğuk stresindeki bitkilerde donma hasarına etkisini belirlemek için yapılan çalışmalarda, 10 µmol SA konsantrasyonunun uygun olduğu belirlenmiştir (Dat *et al.* 1998, Taşgın *et al.* 2003). SA ve metil-SA (MeSA) muamelesi mısır yapraklarında (Janda *et al.* 1999) domatestede (Ding *et al.* 2002) ve muz tohumlarında (Kang *et al.* 2003) donma hasarına karşı direnci artırmıştır. Ayrıca salatalık, fasulye ve pirinç bitkileri SA ile muamele edilmiş ve bu bitkilerin de soğuğa karşı direnç kazandığı belirlenmiştir (Kang *et al.* 2002; Bishop 2002).

Domates ve fasulye bitkileri asetil-SA ile muamele edilmiş ve bitkilerin soğuğa karşı tolerans kazandığı tespit edilmiştir (Senaratna *et al.* 2000). Pirinç fidelerinde SA'nın

hücre zarlarındaki elektrolit sızıntısını engelleyerek donma toleransını sağladığı bulunmuştur (Kang and Saltveit 2002). Eksojen SA uygulamasıyla hem kontrol hem de düşük sıcaklık şartlarında yetiştirilen buğday yapraklarında donma hasarının düşmesine neden olduğu belirlenmiştir (Taşğın *et al.* 2003). Bu literatür bilgileri, SA'nın apoplastik bölgedeki protein sentezinde direk veya dolaylı olarak önemli bir rol üstlendiğini düşündürmektedir.

Tohumlarına **SA** emdirilmiş hibrit mısırla (*Zea mays*) yapılan bir çalışmada SA'nın membran geçişlerini azaltarak donma hasarını engellediği bulunmuştur (Farooq *et al.* 2008). Su içinde çözünebilen maddelerin (mineraller, şekerler, proteinler) suyun donma noktasını (buz kristallerinin oluşma sıcaklığı) düşürmesi olarak kabul edilen buz nükleasyon aktivitesi üzerine birçok çalışma vardır. Kışlık ve yazlık çavdar ile buğday, kışlık arpa, karalahana, kışlık bezelye yapraklarının apoplastik bölgelerinde soğuk uyumu sonrasında bazı özel proteinlerin sentezlenmiş olduğu tespit edilmiştir. (Griffith *et al.* 1992, Marente *et al.* 1993; Hon *et al.* 1994; Antikainen and Griffith 1997, Taşğın *et al.* 2003). Bu bitkilerden, kışlık çavdar, kışlık buğday ve karalahana yapraklarından ekstrakte edilen apoplastik sıvıdaki proteinlerin buz nükleasyon aktivitesini artırdıkları belirlenmiştir (Marente *et al.* 1993, Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b, Taşğın *et al.* 2003). Özellikle kışlık buğdayda aktivitenin önemli derecede artırıldığı tespit edilmiştir (Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b,).

Lipid peroksidasyonu, hücre membran lipidlerinin serbest radikallerle (süperoksid anyonu, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali) etkileşmesi sonucu ortaya çıkar ve sonuçta hücresel zarların bozulmasına yol açar. Bu peroksidasyonun derecesi, hücresel düzeyde stresin sebep olduğu hasarın hem ölçütü hem de yansıması olduğu kabul edilmektedir (de Azevedo Neto *et al.* 2006). Stres şartlarında, doymamış yağ asitlerinin peroksidasyon ürünü olarak ortaya çıkan **malondialdehit (MDA)** miktarındaki artış, hücre zarlarının yapısal bütünlüğünün bozulduğunu gösteren iyi bir indikatördür (Posmyk *et al.* 2005). Yüksek sıcaklığa maruz bırakılmış arpa yapraklarının zar lipid peroksidasyonu düzeyinde artış belirlenmiştir (Kappen 1981).

Bazı ağır metallerin toksik dozlarının bitkilerde lipid peroksidasyonu uyardığı tespit edilmiştir (De Vos *et al.* 1989, 1991; Çakmak *et al.* 1991; Çınar 2005).

Tuzluluğa dirençli farklı iki fasulye çeşidiyle yapılan bir araştırmada, tuz uygulamasıyla hassas varyetede daha fazla olmak üzere iki çeşitte de MDA seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Yaşar *et al.* 2008). Bazı asma (*Vitis vinifera*) çeşitlerine uygulanan kuraklık stresinin lipid peroksidasyonda önemli derecede artışa sebep olmuştur (Yağmur 2008). Kuraklık stresıyla ilgili diğer bir araştırmada iki kahve türü (*Coffea arabica* ve *C. liberica*) orta derecedeki kuraklık şiddetinde lipid peroksidasyonu görülmezken, aşırı kuraklık stresinde, özellikle kuraklığa daha hassas olan *C. arabica* türünde, MDA birikiminin daha fazla olduğu gözlenmiştir (Cai *et al.* 2005).

Su stresi altında büyütülen buğday fidelerinde lipid peroksidasyonunda büyük bir artışın olduğu belirlenmiştir (Tatar and Gevrek 2008; Mutlu 2009). Düşük sıcaklık stresinden kaynaklanan oksidatif stresin hücre zarlarında lipid peroksidasyonuna sebep olduğu ile ilgili birçok araştırma mevcuttur. Soğuk stresine maruz bırakılmış kışlık çavdar, tütün, *Arabidopsis thaliana*, ve patatesten lipid peroksidasyon ürünü olan MDA içeriğinin arttığı kaydedilmiştir (Lynch and Steponkus 1987; Moon *et al.* 1995; Uemura *et al.* 1995; Lin *et al.* 2006). Nohutla yapılan bir araştırmada da soğuğa maruz kalan fidelede MDA miktarının, buna bağlı olarak da lipid peroksidasyon aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Turan 2007). Mercimek bitkisine soğuk stresi uygulandığında, kök ve gövde dokusunda MDA içeriğinde önemli bir artış kaydedilmiştir (Öktem *et al.* 2008; Mutlu 2009).

Salisilik asidin (SA) lipid peroksidasyonu üzerine etkileri ile ilgili literatür bilgisi sınırlıdır. *Taxus chinensis* bitkisi patojenle muamele edilmiş ve MDA seviyesinin arttığı kaydedilmiş, patojenle birlikte SA uygulandığında ise MDA seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir (Yu *et al.* 2001). Bir yıllık üzüm fideleriyle yapılan bir çalışmada yapraklara püskürtülen SA'nın MDA seviyesini düşürdüğü kaydedilmiştir (Wang *et al.* 2003). Su stresi altındaki iki buğday çeşidiyle yapılan bir araştırmada yapraklara püskürtülen SA'nın LPO aktivitesini düşürdüğü bulunmuştur (Agarwal *et al.* 2005; Mutlu 2009).

Fasulye ile yapılan çalışmada tek başına verilen SA lipid peroksidasyonunu etkilemezken, tuz verilmesiyle artan LPO miktarını SA uygulamasının belirgin derecede düşürdüğü saptanmıştır (Palma *et al.* 2009).

Bitkilerde antioksidan enzim sisteminin önemli bir elamanı olan katalaz (CAT) enziminin aktivitesine etki eden faktörler (tuz, patojen, soğuk, sıcaklık, kuraklık ve su stresi) ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Üç farklı yulaf çeşidine bir fungal patojeni muamele edildikten 24 saat sonra, birinde CAT aktivitesi yükselirken, 2. örnekte aktivitenin azaldığı belirlenmiştir (Vanacher *et al.* 1998a). Tuz stresi altında büyütülen buğday, pirinç ve salatalık ile yapılan araştırmalarda, her üç bitkide de CAT aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir (Keleş and Öncel 2002; Shim *et al.* 2003). Ancak, tuz stresi altında yapılan başka bir çalışmada, Sinameki (*Cassia angustifolia*) ve soya fasulyesi bitkilerinde CAT aktivitesi önemli derecede yüksek olduğu gözlenmiştir (Agarwal and Pandey 2004; Ghorbanli *et al.* 2004).

Tuz stresine toleransları farklı iki çeşit dut bitkisiyle yapılan bir çalışmada ise, CAT aktivitesinin tuza dirençli varyetede daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Sudhakar *et al.* 2001). Kuraklık, yüksek sıcaklık ve su stresine maruz bırakılmış buğday bitkisinde CAT aktivitesinde çok büyük bir düşüş belirlenmiştir (Keleş *et al.* 2002). Kuraklık stresi uygulanan mercimek bitkisinde kök dokusunda CAT aktivitesinde artış gözlenmiştir (Öktem *et al.* 2008). Buğday, arpa, çavdar ve yulaf bitkileri soğuk şartlarda büyütüldüğünde ise CAT aktivitesinin önemli derecede düştüğü belirlenmiştir (Janda *et al.* 2002, 2003). Buğdayla yapılan bir diğer çalışmada soğuk muamelesiyle CAT aktivitesinde önemli bir artış belirlenmiştir (Keleş *et al.* 2002). Soğuğa dirençli ve duyarlı dört farklı mandalina kültürü soğukta depolanmış, bu mandalinaların kabuklarında ve meyvelerinde CAT aktivitesine bakılmış ve duyarlı türlerde depolama süresince CAT aktivitesi düşerken toleranslı türlerde aktivitenin yükseldiği belirlenmiştir (Sala 1998; Sala *et al.* 2000). Soğuk şartlarda yetiştirilen salatalık ve pirinç filizlerinde CAT aktivitesindeki artışın donma toleransı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Saruyama *et al.* 1995; Kang *et al.* 2001, 2002). Ayrıca soğuk stresi pek çok bitkide, özellikle soğuğa hassas genotiplerde, CAT aktivitesinde önemli bir düşüşe

delil olmaktadır (Lukatkin, 2002). CAT aktivitesindeki değişimler alp çiminde aylık olarak takip edilmiş ve havaların soğuduğu sonbahar mevsiminde aktivitenin arttığı belirlenmiştir (Zhou and Zhao 2004). Tropikal bir bitki olan soya fasulyesi (*Glycine max*) kademeli olarak düşük sıcaklıklara maruz bırakıldığında bitkinin kök ve gövdesinde CAT aktivitesinin arttığı saptanmıştır (Yadeghari *et al.* 2008).

Salisilik asidin (SA) uygulanmış bezelye, tütün ve mantarda SA'nın katalaz (CAT) aktivitesini inhibe ettiği saptanmıştır (Aebi 1974; Willekens *et al.* 1997; Martina *et al.* 1995; Srivastava *et al.* 2001). Yine, mısır fidelerine 1 mM SA uygulandığında, yapraklarda katalaz aktivitesinin inhibe edildiği bulunmuştur (Padu 1999; Horvath *et al.* 2002). Sadece Salisilik asidin (SA'nın) değil aynı zamanda onun türevi olan asetil-SA'nın da mısır bitkisinde CAT aktivitesinde düşüseye sebep olduğu gözlenmiştir (Westhuizen *et al.* 1998). Muz bitkisinde 0.5mM ve 1mM SA uygulaması, katalaz (CAT) aktivitesinin ilk günlerde düşüşüne, ilerleyen günlerde tekrar yükselmesine neden olmuştur (Srivastava *et al.* 2000). Arpa ile yapılan araştırmada ise SA'nın CAT aktivitesini normale göre yükselttiği bulunmuştur (Souza *et al.* 2001). SA'nın birkaç bitki türünde katalaz aktivitesinin temel bir bölgesini bloklamak suretiyle H₂O₂'nun birikimine sebep olduğu ve bu delille enzimi inhibe ettiği kabul edilmektedir (Raskin, 1992a,b). Soğuk şartlarda (2.5⁰C) Salisilik asidin uygulanmış salatalık ve mısır bitkisinde yaprak, kök ve kotiledonlarda CAT aktivitesinin kontrol değerleri ile aynı olduğu görölmüştür (Kang *et al.* 2002).

Muz bitkisi soğukta yetiştirilip SA uygulandığında, soğuk ve SA kontrole göre CAT aktivitesini düşürürken, SA soğukta CAT aktivitesini artırmıştır (Kang *et al.* 2003). Kışlık buğday yapraklarına eksojen SA uygulaması CAT aktivitesinde hem kontrol hem de düşük sıcaklık şartlarında düşüseye neden olmuştur (Tasğın *et al.* 2006). CAT bitki yapraklarının apoplastında da bulunmuştur (Edwards *et al.* 1991; Wingsle *et al.* 1991; Vanacker *et al.* 1998b; Tasğın *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2009). Örneğın, kışlık arpa yapraklarında apoplastik CAT aktivitesi hücredeki oranına göre %18 olduğu saptanmıştır (Baet *et al.* 2000). İki domates çeşidi patojenle muamele edildiğinde, apoplastik CAT aktivitesinin yükseldiği saptanmıştır (Vanacher *et al.* 1998a;

Patykowski *et al.* 2003). Salisilik asidin (SA) uygulaması kışlık buğdayda apoplastik CAT aktivitesini hem kontrol hem de düşük sıcaklık şartlarında düşürmüştür (Taşğın *et al.* 2006). Son olarak tuz toleransları farklı iki buğday çeşidinde apoplastik CAT aktivitesi her iki varyetede tuz uygulamaları ile artarken, tuz+SA uygulamaları ile düşmüştür (Mutlu *et al.* 2009). Bu çalışmalara göre SA oksidatif stresler sırasında üretilmesi ve oksidatif strese girmiş bitkilerde katalaz (CAT) aktivitesini genelde düşürmesi mümkün görülmektedir.

Literatürde bu anlamda çok araştırmacılar antioksidan enzimlerden birisi de peroksidazdır (POD). Ladin ağacı yapraklarının apoplastında POD aktivitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Otter *et al.* 1997), ancak kuraklık stresi ve ozon muamelesi uygulandığında, hücrel ve apoplastik peroksidaz (POD) aktivitesinin düştüğü kaydedilmiştir (Kronfuss *et al.* 1996). Kışlık arpa yapraklarında ise apoplastik POD aktivitesinin hücrel aktiviteye göre seviyesinin %394 gibi yüksek bir değerde olduğu ileri sürülmüştür (Baet *et al.* 2000). Buna mukabil, yüksek ve düşük nitrat uygulamalarında, genç ve olgun buğday bitkilerinin hücrel ve apoplastik POD aktivitesi karşılaştırıldığında, her iki durumda da, hücrel POD aktivitesinin apoplastik POD aktivitesinden yüksek olduğu belirlenmiştir (Padu 1999). Yapılan bir araştırmayla soğuk şartlarda POD'un serbest radikalleri tutma özelliğine sahip olduğu ortaya konmuştur (Burris 1960).

Papaya bitkisiyle yapılan bir çalışmada 15⁰C'de depolanan bitkilerde POD aktivitesi düşükken, 5⁰C'de aktivitenin arttığı saptanmıştır (Setha *et al.* 2000). *Picea ladies* bitkilerinde aylara göre POD aktivitesi takip edilmiş ve sıcaklığın düştüğü kış ayında hem apoplastta hem de simplastta aktivitenin yükseldiği kaydedilmiştir (Polle *et al.* 1994).

Soğukta ve kontrol şartlarda depolanan elmalarda depolama sonunda POD aktivitesinin düştüğü bulunmuştur (Leja *et al.* 2003). Buğday, arpa, çavdar ve yulaf bitkileri soğukta büyütüldüklerinde POD aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Janda *et al.* 2003). Soğuğa dirençli ve duyarlı dört farklı mandalina kültürü soğukta depolanmış, bu mandalinaların kabuklarında ve meyvelerinde POD aktivitesine bakılmış ve hassas türlerde depolama

süresince POD aktivitesi düşerken, toleranslı türlerde aktivitenin yükseldiği bulunmuştur (Sala 1998).

Soğuk şartlarda yetiştirilen salatalık ve pirinç filizlerinde POD aktivitesindeki artışın donma toleransı ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Saruyama *et al.* 1995; Kang *et al.* 2002). *Picea ladies* -10⁰C'ye 45 gün maruz bırakıldığında POD aktivitesinde de önemli derecede bir düşüş gözlenmiştir (Kaminska- Rozek and Pukacki 2005). Kışlık buğdayla yapılan bir çalışmada soğuk uygulaması apoplastik POD aktivitesini artırmıştır (Taşgın *et al.* 2006). Soya fasulyesi (*Glycine max*) ile yapılan bir çalışmada kademeli olarak düşük sıcaklıklara maruz bırakıldığında bitkinin kök ve gövdesinde POD aktivitesinin arttığı bulunmuştur (Yadeghari *et al.* 2008).

Mercimek bitkisine soğuk stresi uygulandığında kök dokusunda POD aktivitesinde önemli bir artış belirlenmiştir (Öktem *et al.* 2008). Düşük sıcaklığa dirençleri farklı olan iki tür arpa da düşük sıcaklık muamelesiyle her iki çeşitte de POD aktivitesinin bitkinin yaşına göre artış veya düşüş olduğu bulunmuştur (Mutlu 2009; Esim 2011). Yabani hardal süspansiyon kültürünün düşük sıcaklığa maruz bırakılmasıyla POD aktivitesinin arttığı tesbit edilmiştir (Liu *et al.* 2010; Esim 2011).

Bitkilerde antioksidan enzim sistemi içerisinde önemli bir görevi olan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aktivitesine etki eden faktörlerle (tuz, patojen, soğuk, sıcaklık, kuraklık, ozon, besin ve su stresi) ilgili de birçok çalışma bulunmaktadır. Kışlık çavdarla yapılan bir çalışmada 5 haftalık soğuğa uyum süresi sonunda yapraklardaki süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin kontrollere göre %408.4 seviyede arttığı belirlenmiştir (Streb *et al.* 1999). Mutant pamuk bitkisiyle yapılan bir araştırmada süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin, düşük sıcaklık uygulaması sonucu kontrole göre yaklaşık 3 kat arttığını bulunmuştur (Kornyeyev *et al.* 2001). Oksidatif stres altındaki buğday genotiplerinde süperoksit dismutaz aktivitesinde bir değişiklik gözlenmezken (Sairam and Srivastava 2000), yüksek sıcaklık stresi veya tuz stresi altındaki buğday genotiplerinde önemli seviyede artırdığı kaydedilmiştir (Sairam *et al.* 2000; Eyidoğan *et al.* 2003; Sakhabutdinova *et al.* 2004).

Soğuk etkisiyle süperoksit dismutaz (SOD) enziminin aktivitesi üzerine yapılmış araştırmalarda mevcuttur. *Alp* çiminde aylık olarak SOD aktivitesindeki değişimler takip edilmiş ve havaların soğuduğu sonbahar mevsiminde aktivitenin arttığı kaydedilmiştir (Zhou and Zhao 2004). *Norveç ladin* ağacı -10°C gibi çok düşük sıcaklıklara 45 gün gibi uzunca bir süre maruz bakıldığında ROT miktarındaki artışa paralel olarak süperoksit dismutaz aktivitesinde de önemli derecede bir artış belirlenmiştir (Kaminska-Rozek and Pukacki 2005). Soğuğa hassas olduğu bilinen salatalık ve pirinç bitkilerinde de uygulanan düşük sıcaklığın yapraklardaki toplam SOD aktivitesini arttırdığı kaydedilmiştir (Lee and Lee 2000; Guo *et al.* 2006). Sibiryada doğal ortamında takip edilen çamlarda (*Pinus sylvestris*) rizosfer sıcaklığının düşmesine paralel olarak diğer antioksidan enzimlerle birlikte süperoksit dismutaz (SOD) enzim kapasitesinin düştüğü ve buna mukabil dokuda oksidatif stres belirtilerinin görülmeye başladığı bulunmuştur (Milyutina *et al.* 2008; Mutlu *et al.* 2009). Su taskını stresine maruz kalan arpa bitkilerinde ise kloroplastik SOD aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir (Yordanova *et al.* 2004).

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

Literatürde apoplastik süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine soğuk ve Salisilik asit (SA)'nın birlikte etkilerini açıklayan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, tuz stresine toleransları farklı iki çeşit bezelye (Hernandez *et al.* 2001) ve iki çeşit dutta (Sudhakar *et al.* 2001) apoplastik SOD aktivitesinin, tuza dirençli varyetelerde daha yüksek olduğu bulunmuştur. Son olarak, tuz toleransları farklı iki buğday varyetesiyle yapılan bir araştırmada SA, dirençli varyetede SOD aktivitesini düşürürken, hassasta önemli bir düzen sergilememiştir (Mutlu *et al.* 2009). Son yıllardaki çalışmalarla birçok bitkinin donma stresine karşı korunmak için özel mekanizmalar geliştirdikleri ortaya konmuştur (Griffith 1997; Hoshino 1999; Ewart 1999; Yu and Griffith 2001).

Reaktif oksijen türleri (ROT) bitkisel hücrelerde özellikle mitokondri, kloroplast ve peroksizomlarda üretilir (Apel and Hirt 2004). Normalde Reaktif oksijen türleri (ROT) bitki biyolojisinde büyüme, hücre döngüsü, programlanmış hücre ölümü, hormon sinyali ve gelişme gibi önemli biyolojik proseslerde anahtar düzenleyiciler olarak rol oynarlar (Mittler 2002). Ancak, aşırı Reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi stres altındaki bitkilerde nükleik asitlere ve proteinlere zarar verebilir ve bu proses de lipid peroksidaz ve hücrel metabolizmanın bazı özelliklerinde artışla ilişkili olarak devam eder (Asada 1994; Mittler 2002; Halliwell 2006; Hansen *et al.* 2006; Çakmak 2010). Stres şartları altında ROT üretimi bitkilerde üretkenlikte azalmalar, yaralanma ve ölüm gibi sonuçlara yol açabilir (Greene 2002). Bununla birlikte, aşırı Reaktif oksijen türleri üretimi ile birlikte çok sayıda ROT-detoksifikasyon mekanizmaları da çoğu bitkide devreye girer. Bu mekanizmalar SOD, KAT, POD, AP, GR gibi antioksidant enzimler ve glutatyon ve askorbik asit gibi antioksidanları da içerir. Antioksidatif cevabın hızlı gelişmesi değişik stres şartlarına maruz kalan bitkiler için önemlidir (Sharma and Dietz, 2008; Çakmak 2010), ancak farklı bitki türleri arasında sürekli olarak farklı antioksidatif cevabın verildiği de bir gerçektir (Tamas *et al.* 2008; Çakmak 2010).

Sessil yaşam şekillerinden dolayı bitkiler sürekli olarak biyotik ve abiyotik stres faktörleriyle yüzleşmek zorundadırlar. Solunum metabolizması bitkilerin yaralanma, düşük sıcaklık, hipoksia, besin kıtlığı, tuzluluk ve patojen enfeksiyonu gibi değişik stres şartlarına biyokimyasal düzeyde aklimasyonlarında önemli roller oynadıkları çeşitli

araştırmacılar tarafından önemli bulgularla birlikte rapor edilmiştir (Givan 1999; Siedow and Umbach 2000; Moller 2001; Tiwari *et al.* 2002; Millenaar and Lambers, 2003; Vance *et al.* 2003; McDonald and Vanlerberghe 2005; Ribas-Carbo *et al.* 2005; Plaxton 2005).

Glikoliz ve TCA döngüsünün çoğu enzim ve ara ürünü stres aklimasyonunu kolaylaştırmak için değişikliğe gider. Örneğin P_i veya Fe^{2+} eksikliği, veya Al^{3+} toksisitesi durumlarında çoğu bitkide önemli miktarda sitrik asit ve malik asitin köklerden dışarı salındığı rapor edilmiştir (Neumann and Rumheld 1999; Lopez- Millan *et al.* 2000; Ma *et al.* 2001; Massonneau *et al.* 2001; Ryan *et al.* 2001; Tesfaye *et al.* 2001; Schulze *et al.* 2002; Vance *et al.* 2003; Shane *et al.* 2004; Cramer *et al.* 2005; Çakmak 2010).

Bitkilerin yeşil kısımlarında fotosentetik elektron transport zinciri (ETS) bitkilerde Reaktif oksijen türleri (ROT) üretiminin ana kaynağı konumunda iken miETS de yeşil olmayan dokularda ve karanlıkta fotosentetik dokularda ROT üretiminin en fazla gerçekleştiği bölgelerdir (Moller 2001; McDonald and Vanlerberghe 2006). Bununla birlikte bu genel görüşe aykırı sonuçlar da rapor edilmiştir. Örneğin buğday yaprak mitokondrilerinin kloroplast ve peroksizomlarından çok daha fazla ROT-modifiye proteinler içerdiği rapor edilmiştir (Bartoli *et al.* 2004). Çünkü zararlı Reaktif oksijen türleri üretimi aerobik solunumun kaçınılmaz sonucudur. Değişik biyotik ve abiyotik stres şartları altında Mitokondriyal ETS tarafından artan *in vivo* ROT üretiminin arttığı gösterilmiştir (Moller 2001; McDonald and Vanlerberghe 2005; Çakmak 2010). Örneğin kronik oksidatif strese maruz bırakılan *Arabidopsis* hücrelerinin miETS akış hızında ve O_2 alımında artışla birlikte ROT üretiminde artma, ATP üretiminde azalma ve programlı hücre ölümleri rapor edilmiştir (Tiwari *et al.* 2002).

Süperoksit ve peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin üretimi aerobik metabolizmanın kaçınılmaz sonuçlarıdır. Yeşil olmayan bitki hücrelerinde miETS ROT üretiminin en önemli kaynağıdır. Bitkilerde reaktif oksijen türleri özellikle kloroplastlarda (Foyer *et al.* 1994), mitokondrilerde (Chance *et al.* 1979) ve azot fikse eden nodüllerde (Becana *et*

al. 2000) istenmeyen ürünler olarak oluşurlar. Reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi özellikle peroksizomlarda gerçekleşen değişik metabolik yollarda da gerçekleşir ve bu reaksiyonlarla üretilen ROT patojen işgali gibi değişik stres faktörlerine karşı bir silah olarak kullanılır. Reaktif oksijen türleri proteinlere, lipidlere ve DNA'ya hasar verebileceği için ROT üretimi ve etkisiz hale getirilmesi mekanizmaları tam bir balans halinde işlemelidir. Bu yüzden bütün hücre kompartmanları ROT sebebiyle kaynaklanan hasarların yenilemesinde ve aşırı ROT üretiminin önlenmesinde rol oynamalıdır.

Memelilerin mitokondrilerinde toplam oksijen tüketiminin %1-5'inin (*Chance et al.* 1979) bitki mitokondrilerde ise yaklaşık %1'inin ROT üretimi ile sonuçlandığı gösterilmiştir (*Puntarulo et al.* 1988). Öteyannan bitki mitokondrilerinde solunumla ROT üretiminin artan AOX aktivasyonu ile azaldığı belirlenmiştir (*Purvis* 1997; *Braidot et al.* 1999). AOX aktivasyonu ile ROT üretiminin düşüşü durumunun, artan AOX aktivasyonu ile birlikte ubikinonun aşırı indirgenmesinin azalması mekanizmaları ortaya atılmıştır (*Lambers* 1982; *Hoefnagel et al.* 1995; *Rasmusson et al.* 2009; *Çakmak* 2010). AOX kapasitesinin, protein miktarının ve AOX kodlayan mRNA transkript miktarının çeşitli biyotik ve abiyotik stres şartları altında arttığı birçok araştırmayla rapor edilmiştir (*Simons et al.* 1999, *Djajanegara et al.* 2002; *Sieger et al.* 2005; *Rasmusson et al.* 2009; *Çakmak* 2010). Mitokondriler, özellikle kompleks I ve III bulunduğu kısımlardaki salınımın büyük katkısıyla Reaktif oksijen türleri (ROT) üretiminin bitkilerde kloroplastlardan sonra en yaygın olduğu bitki organelidir (*Noctor et al.* 2007; *Çakmak* 2010). Stres şartları altında AOX gen ekspresyonunun artması durumu AOX'un ubikinon indirgenme düzeyini azaltmak ve böylece ROT üretiminin azalması şeklinde rapor edilmiştir (*Moller* 2001, *Purvis and Shewfelt* 1993, *Rhoads and Subbaiah* 2007). Bununla birlikte AOX aktivitesinin ortamdaki moleküler oksijen miktarının azalmasına katkıda bulunarak ROT üretiminin engellenmesine yardımcı olabileceği de gösterilmiştir (*Gupta et al.* 2009; *Çakmak* 2010).

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

İklim dolabı	: Sanyo, Japonya ve Jeno Tech, Kore
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini-1240
pH metre	: WTW unilab pH metre
Hassas terazi	: Shimadzu AY220
Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-30 ⁰ C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80 ⁰ C)	: Harris, İngiltere
Karıştırıcı	: Fisons Whirlmixer
Otomatik pipetler	: Nichipet EX ve Socorex
Çalkalayıcı	: Gallenkamp
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1
Vakum pompası	: Edwards, İngiltere
Elektroforez	: Owl Separation Systems P10DS

3.2. Yaprak Sıcaklığının Belirlenmesi

Yaprak sıcaklıkları bir infrared termometre yardımı ile bitkilerin alttan 3. veya 4. yapraklarından ⁰C cinsinden belirlenip kaydedilmiştir. Ölçümler Optris minisight marka termometre aleti ile denemenin sonlandırılmasından bir gün önce bitkilerde kuraklık ve tuz stresleri devam ederken yapılmıştır. Kontrol bitkilerinin ölçümleri de deneme sonlandırılmadan bir gün önce yapılmıştır. Bu ölçümün sonucunda bitkinin

bünyesindeki suyu kullanarak fazla ısıyı dışarıya atabilme durumuna bakılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Yaprak sıcaklığının ölçülmesi

3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Çalışma süresince kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir. Araştırmalarımızda kullanılan kimyasal maddeler Sigma, Fluka, Merck ve Fischer firmalarından temin edilmiştir.

1- Coomassie reaktifi (protein içeriği) : 20 mg Coomassie Blue G-250, 10 ml etanolde çözülür, üzerine 20 ml %85'lik fosforik asit ilave edilir ve hacim saf suyla 200 ml'ye tamamlanmıştır.

2- 0.1 M KH_2PO_4 (pH: 6.75), %1 PVP, 1mM EDTA (antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu): 2.722 g KH_2PO_4 150 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH 6.75'ye ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlanmış ve üzerine 0.6 g PVP ve 0.058 g EDTA ilave edilmiştir.

3- 0.1 M Na_2HPO_4 , pH: 5.5 (POD aktivitesinin ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 2.838g Na_2HPO_4 alınarak 150 ml saf suda çözölmüş ve pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır.

4- POD aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi(5mM guaikol + 5mM H_2O_2): 54 μL quaikol ve 15 μL H_2O_2 'dan ($d=1.13 \text{ g/mol}$) 5 mM olacak şekilde 100 ml 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözölerek hazırlanmıştır.

5- 40 mM H_2O_2 çözeltisi (CAT aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 692 μL %35'lik H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 200 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

6- 5 mM H_2O_2 çözeltisi (CAT aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan): 86 μL %35'lik H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 200 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

7- 103.5 mM KH_2PO_4 , pH: 7.5 (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 1.4 g KH_2PO_4 , 80 mL saf suda çözölmüş, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

8- %5 lik TCA (trikloroasetik asit) (Lipid peroksidasyon aktivitesi homojenat çözeltisi): 100mL saf su içersine 5 g TCA ilave edilir. TCA tam olarak çözünene kadar karıştırılarak hazırlanır.

9- %0.5 lik TBA(tiobarbutirik asit) (Lipid peroksidasyon aktivitesi reaksiyon çözeltisi): 100 mLsaf su içine 20 gram TCA çözölür ve içersine %0.5 g TBA ilave edilir ve iyice karıştırılarak hazırlanır.

10- 50 mM K_2HPO_4 (pH: 7.8) (Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 2.9g K_2HPO_4 200 mL saf suda çözölmüş ve son hacmi 250 mL'ye tamamlanmıştır.

11- 13 mM metionin çözeltisi: 0.485 g metionin, 250 mL, 50 mM K₂HPO₄ (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

12- 75 mM NBT (Nitroblue Tetrazolium Klorür): 0.015 g NBT, 250 mL, 50 mM K₂HPO₄ (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

13- 0.1 mM EDTA (Etilen Daimin Tetra Asetik asit): 0.075 g EDTA, 250 mL, 50 mM K₂HPO₄ (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

14- 2 mM riboflavin: 0.038 g riboflavin, 1 L saf suda çözülmüş, bu çözeltiden 2 mM oluşturmak için, bundan 60 mL alınmış ve 3 mL'lik reaksiyon karışımına pipetlenmiştir.

15-10⁻⁴ M ABA çözeltisi : 0.00265 g ABA tartılıp 5ml alkolde çözülmüş, hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

16- 0.4 mM Antimysin A çözeltisi : 0.044 g Antimysin A tartılıp 5ml alkolde çözülmüş, hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır.

17- 0.5 mM SA(Salisilik asit) çözeltisi : 0.0069 g SA (Salisilik asit) tartılıp 5ml alkolde çözülmüş, hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

18- 0.012M CaCl₂ A çözeltisi : 0.133 g CaCl₂ tartılıp 5ml saf suda çözülmüş, hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Bitkilerin büyütülmesi

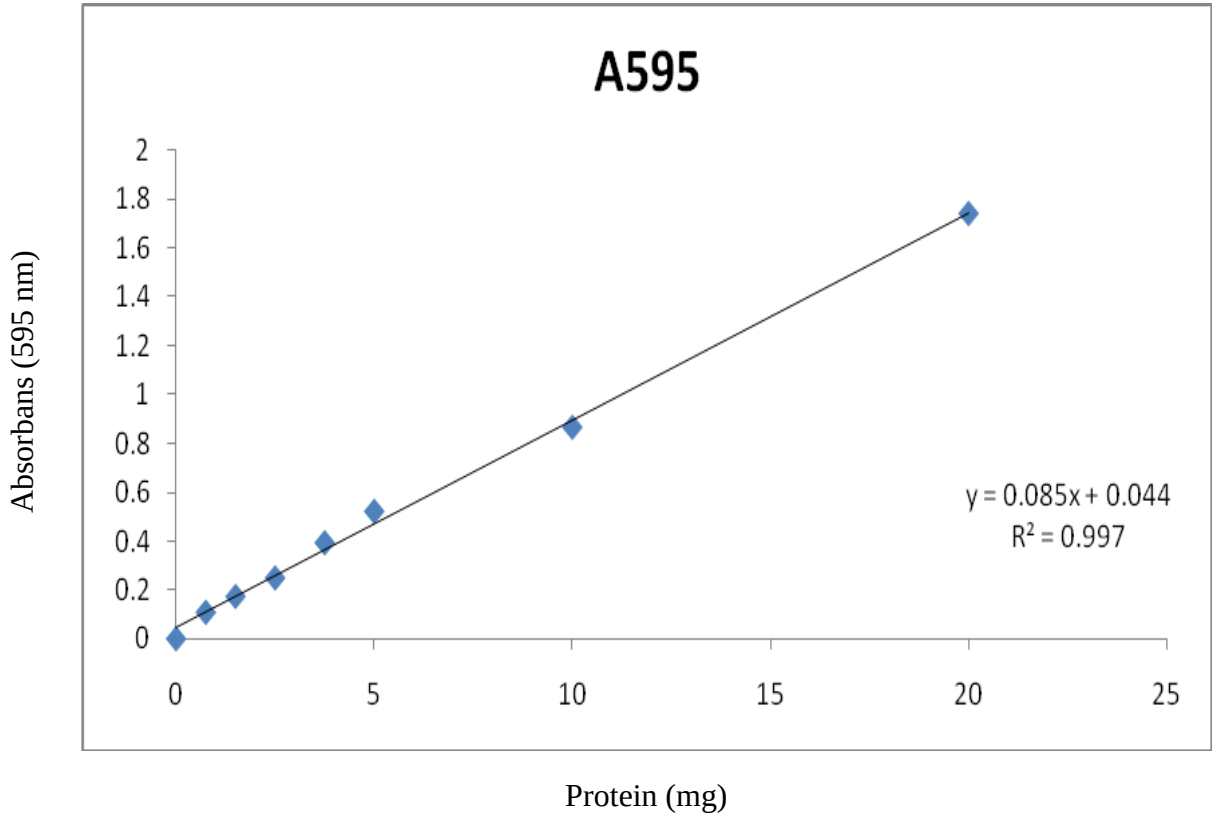
Araştırmamızda bölgemizde de ekimi yapılan, soğuk stresine hassas olan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisi kullanılmıştır. Tohumlar ekilmeden önce %96'lık alkol ile

kısa süreli hızlıca yıkanmış ve %5'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dk yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra 3 kez saf su ile yıkanarak, oda şartlarında saf su içerisinde yaklaşık 6 saat şişmeye bırakılmıştır. Bitkiler araştırma süresince %50 kum ve %50 çiçek toprağında hemojen olarak yetiştirilmiştir. Bunun için her bir saksıya eşit miktarda olacak şekilde hazırlanmış hemojen topraktan konulmuştur. Her saksıya saf su ile şişirilmiş tohumlar eşit miktarda ekilmiştir. Bitkiler dolapta kontrol şartlarında (25/20°C sıcaklık ve 16/8 saat ışık-karanlık periyodunda 16000 lüks) 14 gün süreyle büyütülmüştür. Her saksı, kesileceği güne kadar, günlük eşit miktarda çeşme su ile sulanmıştır. 14 günlük bitkiler her bir grupta 4 tekrar olacak şekilde 6 gruba ayrılıp aşağıdaki uygulamalar yapılmıştır. Bitkiler uygulama yapıldıktan 2 saat sonra iklim dolabında kontrol şartlarında (10/5°C sıcaklık ve 16/8 saat ışık-karanlık periyodunda 16000 lüks,%70 nem)) 3 gün süreyle büyütülmüştür.

3.4.2. Çözünebilir protein miktarının tayini

Bitkilerin dokularından 0.5g'lık örnek alınarak Bradford (1976) metoduna göre protein tayini yapıldı. Sonuçlar "mg protein/g taze doku cinsinden hesap edilir. Her bir muameleye ait bitkilerin, küçük parçalara ayrılmış yaprak dokusundan 0.5g alınarak 10 misli hacimdeki 0.05 M fosfat tamponunda (pH:6.5) havanda ezilerek homojenizasyon edildi. Homojenat santrifüj tüplerine alınıp,15.000 rpm' de 20 dk. boyunca santrifüj yapıldı. Protein tayini için tüplerin üst kısmındaki sıvı faz (süpernatant) kullanıldı. Protein miktarı spektrofotometrik yolla tayin edildi. Metot için gerekli standart grafik şu şekilde hazırlandı; 1ml' sinde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden 0, 0.75, 1.5, 2.5, 3.75, 5, 10, 20µg protein içeren hacimler tüplere aktarılıp, saf su ile bütün tüplerin hacimleri 0.2ml'ye tamamlandı. Bu tüplere 3'er ml'de Coomassie Blue G ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. Kör numune olarak 50 µM aynı tampondan ve 3 ml Coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, 595 nm'deki absorbans değerlerine karşılık gelen protein değerlerinden yararlanarak standart grafik elde edildi. Standart grafik hazırlama çalışmasında olduğu gibi, bitki organlarından elde edilen özütlerden 50 µM alınıp, 3 ml Coomassie reaktifiyle karıştırıldı ve 595 nm'de absorbansları ölçülerek, standart grafikten

yararlanılıp, 50 µM özütteki protein miktarları belirlendi. Daha sonra, gerekli hesaplamalar yapılarak protein miktarları mg protein/g doku olarak tayin edildi.



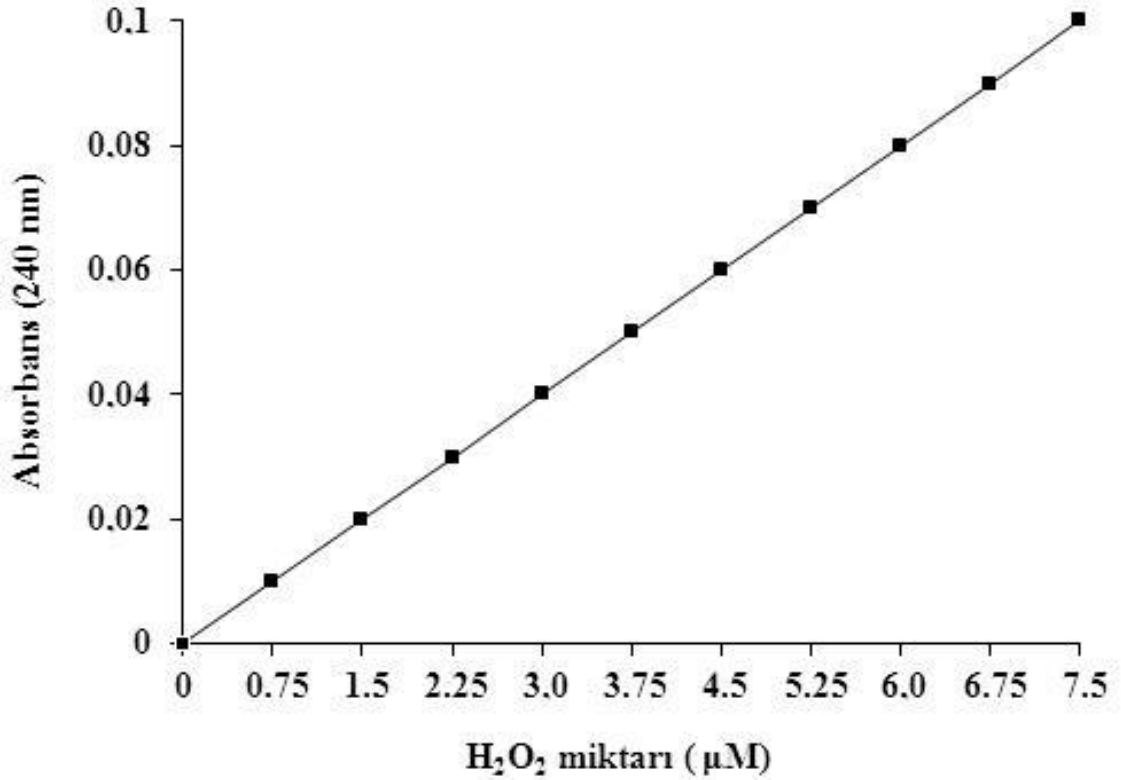
Şekil 3.2. Protein tayini için hazırlanmış olan standart grafik

3.4.3. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Fasulye bitkisi yaprak dokusundan 0.5'er gram alınarak 5 ml 0.1 M fosfat tamponunda homojenize edilerek 15000 rpm'de 20 dk santrifüj yapıldı. Üst kısmı alınarak enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kontrol, soğuk ve KCN, CO, Antymisin A, SHAM, NAF, NO, ABA, SA, NaCl_2 muameleli bitki yapraklarından elde edilen apoplastik proteinler içindeki antioksidan enzimlerin (SOD, KAT ve POD) aktiviteleri ölçülerek, apoplastik ve hüresel antioksidan enzimlerin ve KCN, CO, ANTYMİSİN A, SHAM, NAF, NO, ABA, SA, NaCl_2 reaktif oksijen türlerini (ROT) uzaklaştırmadaki rolü belirlenecektir. Ayrıca yukarıda belirtildiği gibi elde edilen apoplastik proteinler fosfat tamponunda çözülerek spektrofotometrik yöntemlerle enzimlerin aktiviteleri belirlenecektir.

3.4.3.a. CAT aktivitesinin belirlenmesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için Gong *et al.* (2001) uyguladığı metot kullanılır. Bu metot, katalazın ortamdaki H_2O_2 'nin oksijen ve suya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans değişiminin 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır. Önce reaksiyonda azalan H_2O_2 miktarını belirlemek için standart grafik hazırlanır. Standart grafik hazırlamak için, 5 mM H_2O_2 çözeltisinden 3 mL'lik spektrofotometre tüplerine sırasıyla; 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 mL konulmuş, tüplerin hacimleri saf su ile 1.5 mL'ye tamamlanmış ve her tüpe 1.47 mL 103.5 mM KH_2PO_4 ve 30 μ L su ilave edilmiştir. Spektrofotometrede 240 nm'de absorbans köre karşı okunmuş ve absorbans değerlerine karşılık gelen μ M H_2O_2 değerleri kullanarak standart grafik elde edilmiştir. Aktivite ölçümü için 3 mL'lik spektrofotometre küvetine, 103 mM KH_2PO_4 tamponundan 1.475 mL ve 40 mM'lık H_2O_2 substrat çözeltisinden 1.5 mL konulduktan sonra, 25 μ L enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Spektrofotometrede 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okunmuş ve absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanmıştır. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla μ mol cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürülmüştür. 25°C'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 μ mol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulmuştur (Gong *et al.* 2001; Mutlu 2005; Genişel 2011).



Şekil 3.3. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik.

3.4.3.b. Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanır. Reaksiyon karışımı (3 mL); 50 mM KH₂PO₄ (pH: 6.75), 13 mM metiyonin, 63 μM NBT, 13 μM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 3 mL spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2,90 mL alınmış ve üzerine 100 μL enzim ekstraktı pipetlenmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 13 μM'lık riboflavin çözeltisinden 50 μL pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatılmıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk. tutulmuş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. 15 dk içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okunmuştur. Kör; aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de

gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak Kabul edilmiş ve değerler EU/g yaprak olarak sunulmuştur (Agarwal and Pandey 2004).

3.4.3.c. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POD) aktivite tayini, guaikol ve H₂O₂'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır. Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 100 mL 0.1 M, NaH₂PO₄ (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol ve 5mM H₂O₂ içeren substrat çözeltisinden 3 mL konulduktan sonra, üzerine 30 µL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. 470 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedilmiş ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanmıştır. 25⁰C'de 1 dakikada, absorbansı 0.01 abs artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulmuştur (Yee *et al.* 2002).

3.4.4. Lipid peroksidasyon aktivitesinin belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu için 0.5 g yaprak alınarak 5 mL %5 lik TCA içinde homojenize edildikten sonra elde edilen homojenat 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Tüpün süpernatant kısmından 4 mL alınarak üzerine 1 mL %0.5 lik TBA çözeltisi ilave edilir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika inkübe edilir ve reaksiyon tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durdurulur. Örnekler tekrar 15.000 rpm 'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısmı alınarak absorbansı 532 nm de okunur ve daha sonra 600 nm deki nonspesifik absorbsiyon için absorbans değeri belirlenir.

Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm'de belirlenen değeri çıkarılır ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/g): [(A₅₃₂-A₆₀₀)/155000] x 10⁶ formülüyle hesaplanır. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde verilir (Ananieva *et al.* 2002).

3.4.5. İstatistiksel analiz

Tez içerisinde sunulan sonuçlar, her bir uygulamadan dört örnek (3 paralel) yapıldıktan sonra elde edilen 3 değerin ortalamasıdır. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 15.0 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış $P < 0.05$ önem seviyesinde Dunyan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Araştırmamızda soğuğa hassas bir bitki olan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) kullanılmıştır. Bitkiler normal ortamda kontrol şartlarında (25/20⁰C) sıcaklık ve 16/8 saat ışık-karanlık periyodunda 14 gün süreyle büyütülmüştür. KCN, CO, ANTİMİSİN A, SHAM, NAF, NO, ABA, SA ve NaCl₂ uygulamaları yapıp 3-4 saat inkübasyondan sonra 3 gün boyunca 10/5⁰C derecede ve 16/8 saat ışık-karanlık periyodunda (16.000 lüks, %70 nem) iklim dolabında aktarıldı. Kontrol, düşük sıcaklık ve düşük sıcaklık + KCN, CO, ANTİMİSİN A, SHAM, NAF, NO, ABA, SA ve NaCl₂ uygulamalarına ait bitki yaprakları kesilerek, total protein içeriği LPO seviyesini ve antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi spektrofotometrik yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Bulgular çizelgelerde ayrıntılı olarak gösterilmiş ve farklılıkların daha iyi anlaşılabilmesi için grafiklerle de desteklenmiştir. Öncelikle düşük sıcaklığın kontrol grubuna göre daha sonra ise düşük sıcaklık + KCN, CO, ANTİMİSİN A, SHAM, NAF, NO, ABA, SA ve NaCl₂ uygulamalarının düşük sıcaklığa göre yaptığı değişimler ayrıntılı olarak karşılaştırılmıştır. Böylelikle hem düşük sıcaklığın hem de düşük sıcaklık öncesi uygulanan düşük sıcaklık + KCN, CO, ANTİMİSİN A, SHAM, NAF, NO, ABA, SA ve NaCl₂’ların strese karşı rolü açık bir şekilde istatistiksel olarak ortaya konulmuştur.

4.1. Toplam Çözülebilir Protein Miktarı Sonuçları

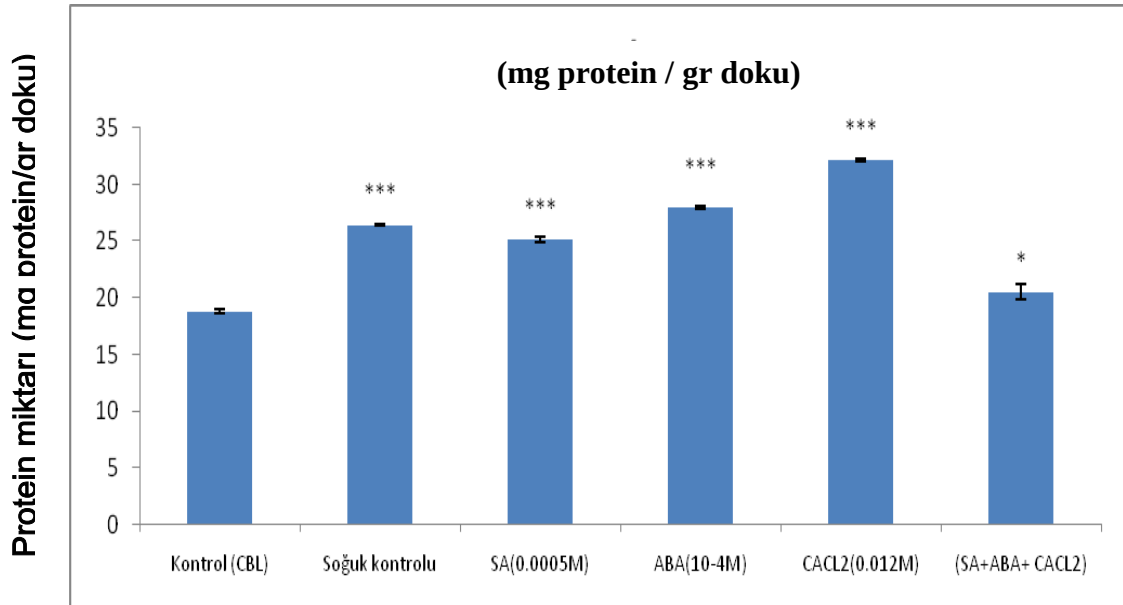
4.1.1. Düşük sıcaklık + SA, ABA, CaCl₂, SA+ABA+ CaCl₂ uygulaması

Toplam çözülebilir protein miktarı 14 günlük fasulye bitkisi yapraklarında düşük sıcaklık + SA, ABA, CaCl₂, SA+ABA+ CaCl₂ uygulamaları, yaprak dokusunun çözülebilir protein içeriğinde kontrol grubuna göre önemli derecede artışa neden olmuştur (P<0.05). Sadece ABA ve CaCl₂ uygulamaları soğuk kontrole nazaran daha fazla oranda protein içeriği artışına yol açmıştır.

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki protein miktarı 18.809 (mg protein/gr doku) iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %41'lik bir artışla 26.448 (mg protein/gr doku) olarak belirlenmiştir. CaCl_2 (0.012M) uygulaması yalnız düşük sıcaklık uygulamasına göre protein içeriğinde %21 oranlarında artışa neden olmuştur. SA+ABA+ CaCl_2 uygulaması yalnız düşük sıcaklık uygulamasına göre protein içeriğinde %29 oranlarında azalışa neden olmuştur(Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. Dört farklı made SA(0.0005M), ABA(10^{-4} M), CaCl_2 (0.012M), SA+ABA+ CaCl_2 , uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinde yaprak dokusunda çözülebilir proteinin uygulamalara göre değişimi.

Uygulamalar	Mg protein/gr doku	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	18.809	0.226094671	1
Soğuk kontrolü	26.448	0.07188354	6.1885E-07
SA(0.0005M)	25.162	0.25917979	5.6899E-06
ABA(10^{-4} M)	27.969	0.13100622	4.4055E-07
CaCl_2 (0.012M)	32.118	0.143767081	1.0938E-07
SA+ABA+ CaCl_2	20.511	0.663846399	0.01365731



Şekil 4.1. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusundaki çözülebilir protein miktarının uygulamalara göre değişimi.

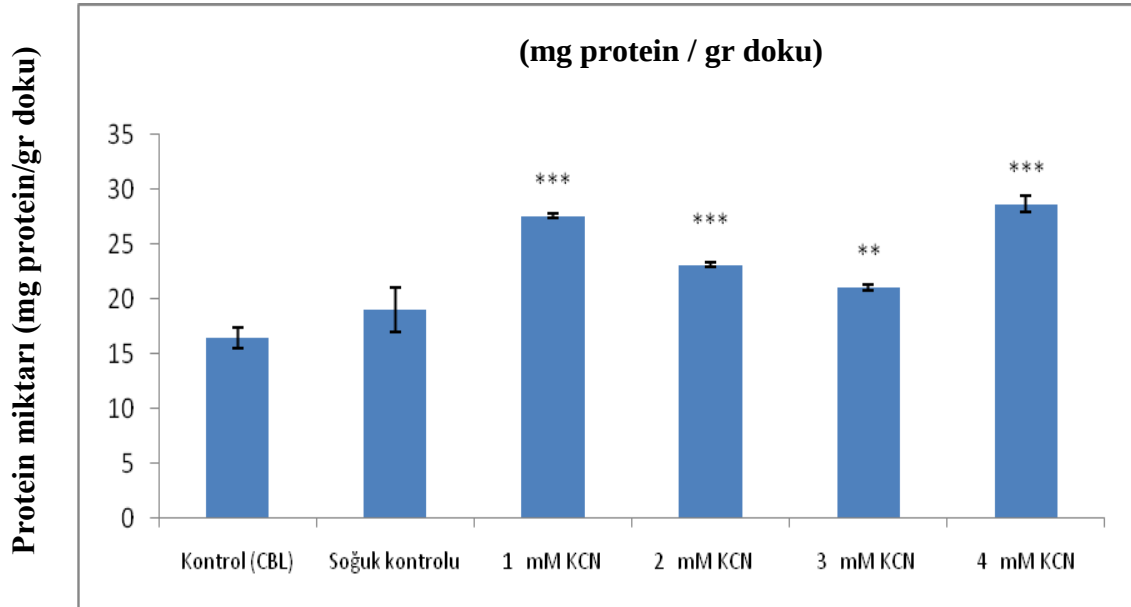
4.1.2. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulaması

Toplam çözülebilir protein miktarı 14 günlük fasulye bitkisi yapraklarında düşük sıcaklık + (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulaması, yaprak dokusunun çözülebilir protein içeriğinde kontrol grubuna göre önemli derecede artışa neden olmuştur ($P<0.05$).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki protein miktarı 16.471 (mg protein/gr doku) iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %15'lik bir artışla 19.005 (mg protein/gr doku) olarak belirlenmiştir. 4mM KCN uygulaması yalnız düşük sıcaklık uygulamasına göre protein içeriğinde %51 oranlarında artışa neden olmuştur. 4mM KCN uygulaması kontrol grubuna göre protein içeriğinde %74 oranlarında artışa neden olmuştur(Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN, uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinde yaprak dokusunda çözülebilir protein uygulamalara göre değişimi.

Uygulamalar	mg protein/gr doku	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	16.471	0.971663	1
Soğuk kontrolü	19.005	1.97913	0.11743
1 mM KCN	27.569	0.235294	4.31E-05
2 mM KCN	23.169	0.235294	0.000315
3 mM KCN	21.052	0.235294	0.001365
4 mM KCN	28.667	0.698524	6.05E-05



Şekil 4.2. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusundaki çözülebilir protein miktarının Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulamalara göre değişimi

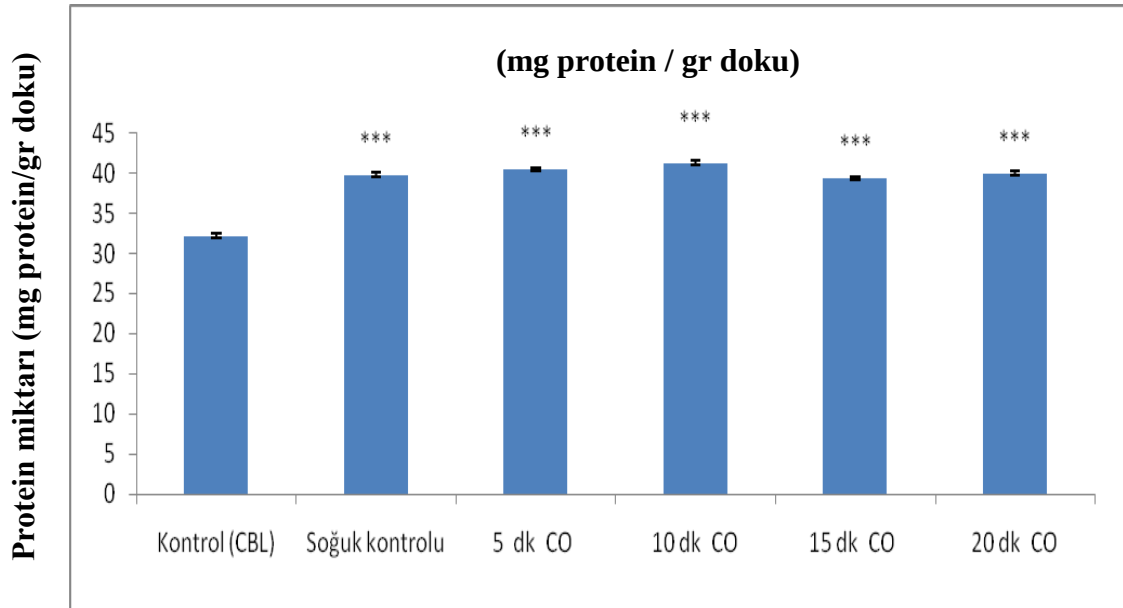
4.1.3. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulaması

Toplam çözülebilir protein miktarı 14 günlük fasulye bitkisi yapraklarında düşük sıcaklık + (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulaması, yaprak dokusunun çözülebilir protein içeriğinde kontrol grubuna göre önemli derecede artışa neden olmuştur ($P < 0.05$). Soğuk kontrol ile mukayese edildiğinde ise CO uygulamalarının total protein içeriğini soğuk kontrole kıyasla istatistiki olarak önemli olmakla birlikte düşük oranlarda artırdığı belirlenmiştir.

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki protein miktarı 32.228 (mg protein/gr doku) iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %23.4'lik bir artışla 39.781 (mg protein/gr doku) olarak belirlenmiştir. 10 dk CO uygulaması yalnız düşük sıcaklık uygulamasına göre protein içeriğinde %3.7 oranlarında artışa neden olmuştur. 10 dk CO uygulaması kontrol grubuna göre protein içeriğinde %28 oranlarında artışa neden olmuştur (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3).

Çizelge 4.3. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO, uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinde yaprak dokusunda çözülebilir protein uygulamalara göre değişimi.

Uygulamalar	mg protein/gr doku	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	32.228	0.23529412	1
Soğuk kontrolu	39.781	0.23529412	2.50079E-06
5 dk CO	40.487	0.23529412	1.75055E-06
10 dk CO	41.263	0.27135441	1.65872E-06
15 dk CO	39.381	0.23529412	3.10734E-06
20 dk CO	39.993	0.23529412	2.23946E-06



Şekil 4.3. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusundaki çözülebilir protein miktarının Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulamalara göre değişimi.

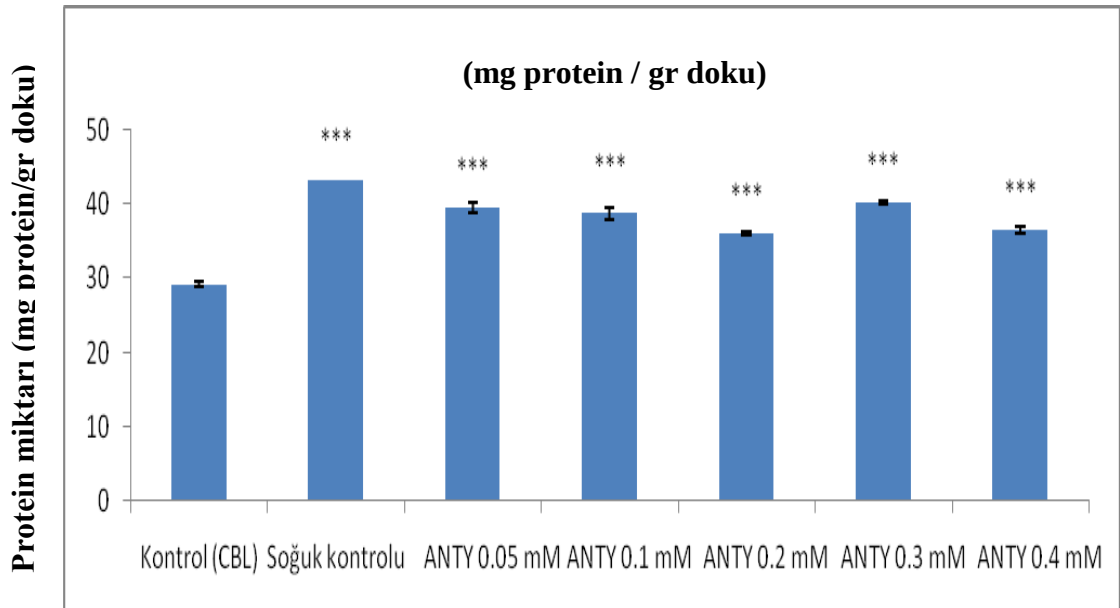
4.1.4. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) ANTYMİSİN A uygulaması

Toplam çözülebilir protein miktarı 14 günlük fasulye bitkisi yapraklarında düşük sıcaklık + (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulaması, yaprak dokusunun çözülebilir protein içeriğinde kontrol grubuna göre önemli derecede artışa neden olmuştur ($P<0.05$). Ancak söz konusu artışlar soğuk kontrol uygulamasından nisbeten daha düşük değerlerde olmuştur.

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki protein miktarı 29.232 (mg protein/gr doku) iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %48'lik bir artışla 43.397 (mg protein/gr doku) olarak belirlenmiştir. 0.2 mM Antymisin A uygulaması yalnız düşük sıcaklık uygulamasına göre protein içeriğinde %20.4 oranlarında azalışa neden olmuştur. 0.2 mM Antymisin A uygulaması kontrol grubuna göre protein içeriğinde %23 oranlarında artışa neden olmuştur(Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4).

Çizelge 4.4. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A, uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinde yaprak dokusunda çözülebilir protein uygulamalara göre değişimi.

Uygulamalar	mg protein/gr doku	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	29.232	0.270673473	1
Soğuk kontrolu	43.397	0.059214388	9.75209E-08
Antymisin A 0.05 mM	39.483	0.625339585	1.2889E-05
Antymisin A 0.1 mM	38.785	0.80184332	4.03564E-05
Antymisin A 0.2 mM	36.04	0.13100622	2.52688E-06
Antymisin A 0.3 mM	40.189	0.160161395	4.51752E-07
Antymisin A 0.4 mM	36.565	0.411820724	1.34608E-05



Şekil 4.4. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusundaki çözülebilir protein miktarının Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) A Antymisin A uygulamalara göre değişimi.

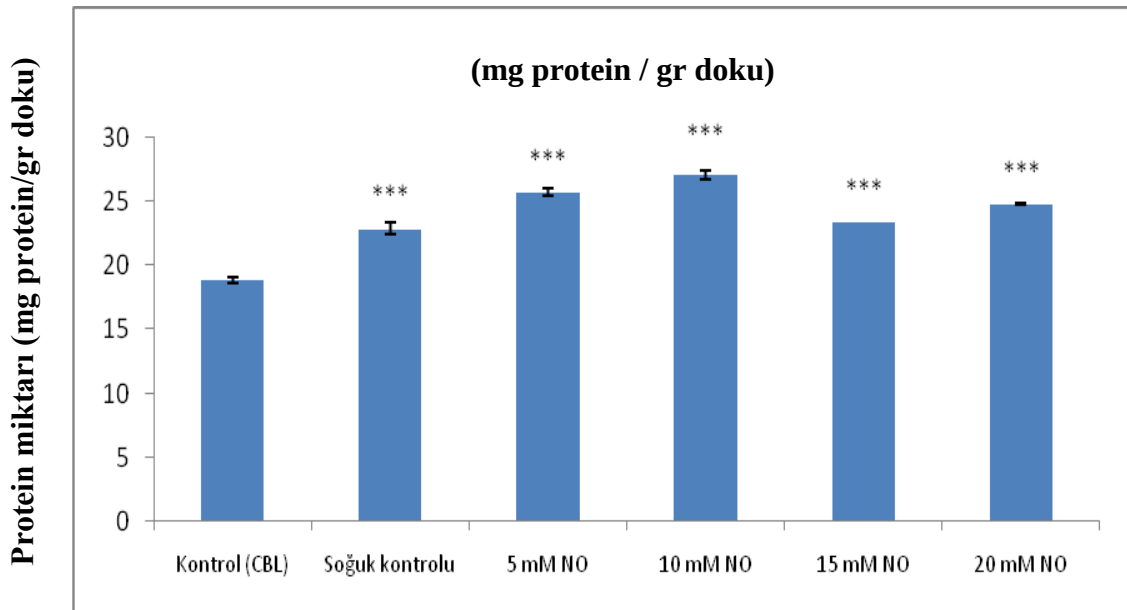
4.1.5. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulaması

Toplam çözülebilir protein miktarı 14 günlük fasulye bitkisi yapraklarında düşük sıcaklık + (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulaması, yaprak dokusunun çözülebilir protein içeriğinde kontrol grubuna göre önemli derecede artışa neden olmuştur. NO uygulamalarında gözlenen protein içeriği soğuk kontrolden de daha yüksek çıkmış, en yüksek protein içeriği değerinin 10 mM NO uygulamasında ortaya çıktığı belirlenmiştir.

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki protein miktarı 18.84 (mg protein/gr doku) iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %21'lik bir artışla 22.863 (mg protein/gr doku) olarak belirlenmiştir. 10 mM NO, uygulaması yalnız düşük sıcaklık uygulamasına göre protein içeriğinde %18 oranlarında artışa neden olmuştur. 10 mM NO, uygulaması kontrol grubuna göre protein içeriğinde %44 oranlarında artışa neden olmuştur(Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5).

Çizelge 4.5. (5, 10, 15, ve 20 mM) NO, uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinde yaprak dokusunda çözülebilir protein uygulamalara göre değişimi.

Uygulamalar	mg protein/gr doku	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	18.84	0.224456	1
Soğuk kontrolü	22.863	0.459276	0.000168
5 mM NO	25.726	0.27574	4.71E-06
10 mM NO	27.067	0.400922	6.44E-06
15 mM NO	23.373	0.027169	4.1E-06
20 mM NO	24.816	0.084837	1.73E-06



Şekil 4.5. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusundaki çözülebilir protein miktarının (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulamalara göre değişimi.

4.1.6. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulaması

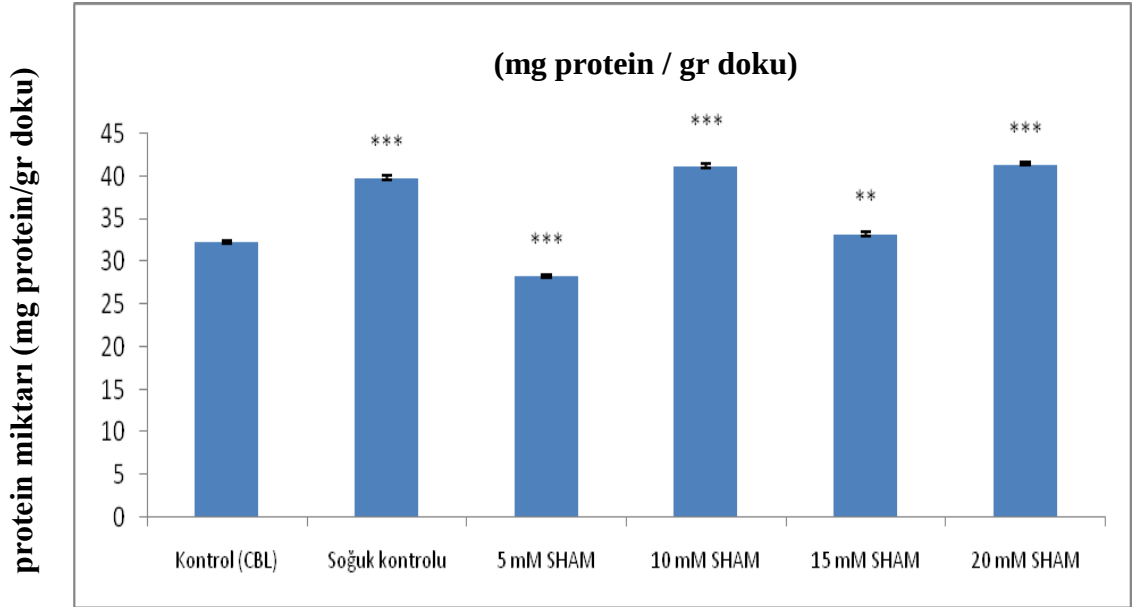
Toplam çözülebilir protein miktarı 14 günlük fasulye bitkisi yapraklarında düşük sıcaklık + (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulamaları ve soğuk kontrolde, yaprak dokusunun çözülebilir protein içeriğinde kontrol grubuna göre önemli derecede artışa

neden olmuştur. 10 ve 20 mM SHAM uygulamalarında belirlenen protein içeriği soğuk kontrolden de yüksek çıkmıştır.

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki protein miktarı 32.244 (mg protein/gr doku) iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %24'lük bir artışla 39.844 (mg protein/gr doku) olarak belirlenmiştir. 10 mM SHAM uygulaması yalnız düşük sıcaklık uygulamasına göre protein içeriğinde %3.6 oranlarında artışa neden olmuştur. 10 mM SHAM uygulaması kontrol grubuna göre protein içeriğinde %28 oranlarında artışa neden olmuştur(Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6).

Çizelge 4.6. (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinde yaprak dokusunda çözülebilir protein uygulamalara göre değişimi.

Uygulamalar	mg protein/gr doku	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	32.244	0.23685755	1
Soğuk kontrolü	39.844	0.25917979	3.022E-06
5 mM SHAM	28.283	0.23568595	3.324E-05
10 mM SHAM	41.264	0.27135441	1.689E-06
15 mM SHAM	33.264	0.23529412	0.00613
20 mM SHAM	41.405	0.169673	6.806E-07



Şekil 4.6. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusundaki çözülebilir protein miktarının (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulamalara göre değişimi.

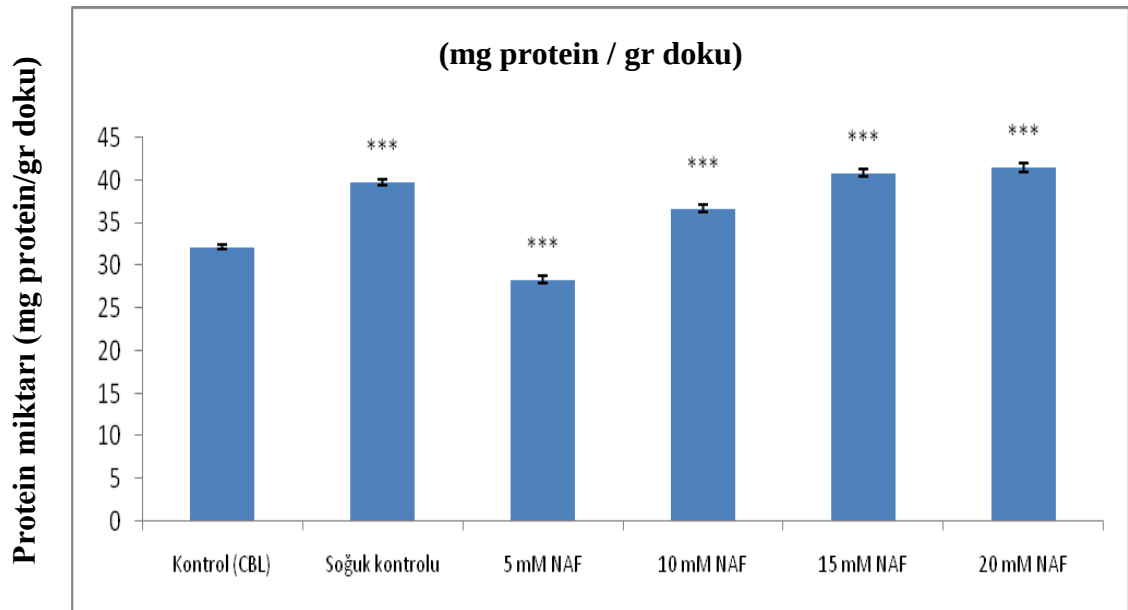
4.1.7. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulaması

Toplam çözülebilir protein miktarı 14 günlük fasulye bitkisi yapraklarında düşük sıcaklık + (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF ve soğuk kontrol uygulamaları, yaprak dokusunun çözülebilir protein içeriğinde kontrol grubuna göre önemli derecede artışa neden olmuştur. 15 ve 20 mM NAF uygulamalarının, soğuk kontrole nazaran protein içeriğini çok daha fazla artırdığı belirlenmiştir.

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki protein miktarı 32.228 (mg protein/gr doku) iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %23'lük bir artışla 39.726 (mg protein/gr doku) olarak belirlenmiştir. 10 mM NAF, uygulaması yalnız düşük sıcaklık uygulamasına göre protein içeriğinde %8.2 oranlarında azalışa neden olmuştur. 10 mM NAF uygulaması kontrol grubuna göre protein içeriğinde %14 oranlarında artışa neden olmuştur. 20 mM NAF uygulaması yalnız düşük sıcaklık uygulamasına göre protein içeriğinde %4.5 oranlarında artışa neden olmuştur. 20 mM NAF uygulaması kontrol grubuna göre protein içeriğinde %29 oranlarında artışa neden olmuştur (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7).

Çizelge 4.7. (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulanan fasulye (*Phaseolusvulgaris*) bitkisinde yaprak dokusunda çözülebilir protein uygulamalara göre değişimi.

Uygulamalar	mg protein/gr doku	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	32.228	0.23529412	1
Soğuk kontrolu	39.726	0.39113593	9.0811E-06
5 mM NAF	28.346	0.47058824	0.00021597
10 mM NAF	36.691	0.38037194	6.5785E-05
15 mM NAF	40.863	0.47058824	9.1119E-06
20 mM NAF	41.530	0.49709653	8.0836E-06



Şekil 4.7. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusundaki çözülebilir protein miktarının (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulamalara göre değişimi.

4.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi

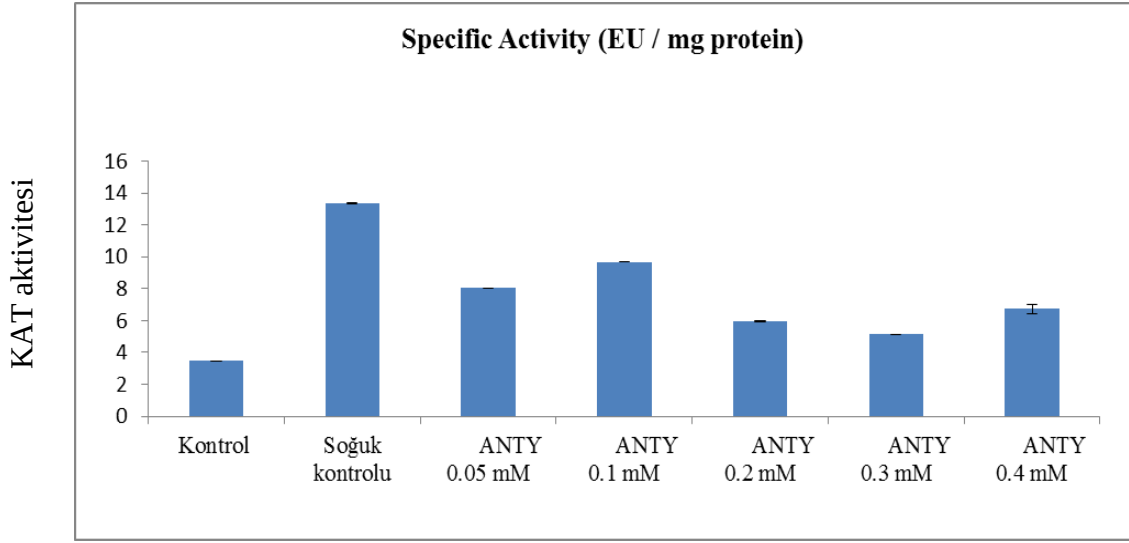
4.2.1. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A

Düşük sıcaklık kontrole göre CAT aktivitesinde artışa neden olmuştur. Ancak değişik konsantrasyonlarda uygulanan Antimycin A, CAT aktivitesini soğuk kontrole nispeten daha az yükseltmiş, yani Antimycin A uygulamalarında belirlenen CAT aktiviteleri, kontrole göre yüksek, ancak soğuk kontrole göre ise nispeten düşük çıkmıştır. Soğuk+Antimycin A uygulamaları içinde en düşük CAT aktivitesi 0.05mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir.

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki CAT aktivitesi 3.46 EU.g⁻¹ iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %286'lık bir artışla 13.36 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. 0.1 mM Antimycin A uygulamaları düşük sıcaklık ile azalan CAT aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile CAT aktivitesi 13.36 iken bu değer 0.1 mM Antimycin A için %38'lik önemli bir azalışla 9.67 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8).

Çizelge 4.8. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen KAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi.

Uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	3.46	0.005773503	1
Soğuk kontrolü	13.36	0.02	1.30495E-11
Antymisin A 0.05 mM	8.04	0.01	2.70136E-11
Antymisin A 0.1 mM	9.67	0.01	7.98637E-12
Antymisin A 0.2 mM	5.96	0.01527	1.20706E-09
Antymisin A 0.3 mM	5.13	0.01	1.53584E-09
Antymisin A 0.4 mM	6.72	0.294	-0.072



Şekil 4.8. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5⁰C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen KAT enzim aktivitesi değerleri.

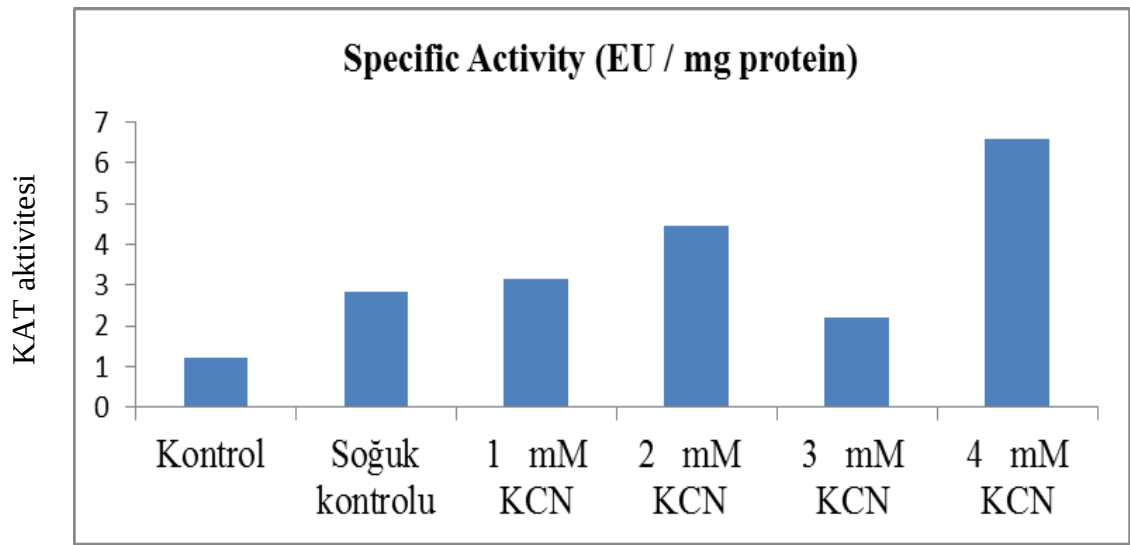
4.2.2. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN

14 günlük bitki yapraklarında soğuk kontrol ve soğuk +KCN uygulamaları, kontrole göre CAT aktivitesinde artışa neden olmuştur. Ancak yapılan soğuk + KCN uygulamalarından 1 ve 3 mM KCN, soğuk kontrole nazaran CAT aktivitesinde önemli düşüslere, 2 ve 4 mM Antimycin uygulamaları ise artışa yol açmıştır (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.9).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki CAT aktivitesi 1.21 EU.g⁻¹ iken, düşük sıcaklık ile bu değer %135'lik bir artışla 2.85 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki CAT aktivitesi 1.21 EU.g⁻¹ iken, 2mM KCN uygulamasıyla bu değer %268'lik bir artışla 4.46 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile CAT aktivitesi 2.85 EU.g⁻¹ iken bu değer 3mM KCN için %29'lük azalışla 2.20 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.9).

Çizelge 4.9. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen KAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi.

uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	1.21	0.015275	1
Soğuk kontrolu	2.85	0.005774	6.45E-09
1 mM KCN	3.16	0.01	5.09E-09
2 mM KCN	4.46	0.01	6.61E-10
3 mM KCN	2.20	0.01	7.6E-08
4 mM KCN	6.60	0.006083	5.75E-11



Şekil 4.9. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5°C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen KAT enzim aktivitesi değerleri.

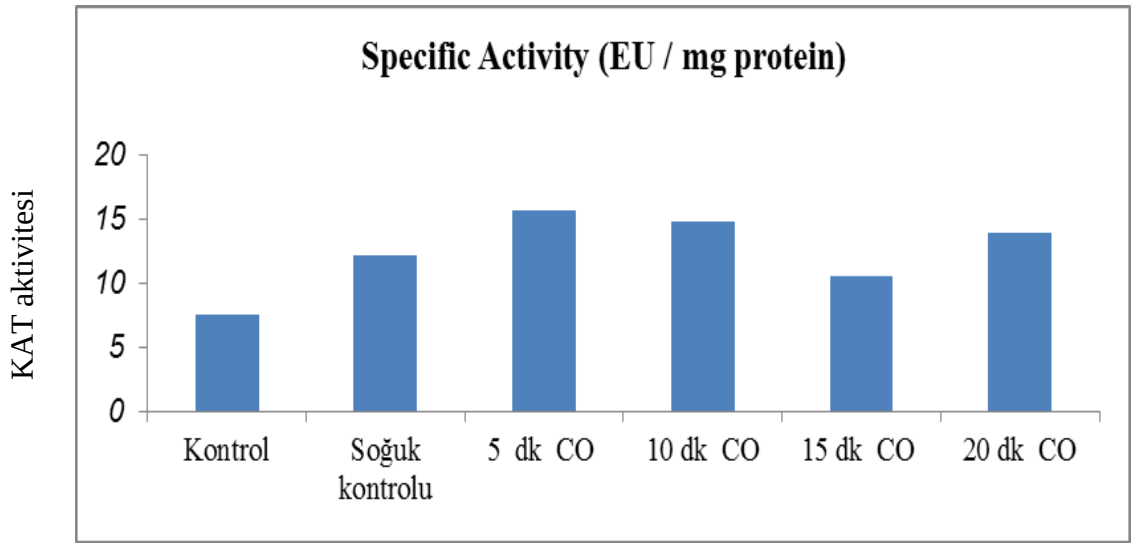
4.2.3. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO

Düşük sıcaklık kontrole göre CAT aktivitesinde artışa neden olmuştur. Değişik sürelerde uygulanan CO ise soğuk kontrolde gözlenen CAT aktivitesi artışının bir miktar daha yükselmesine yol açmış (15 dk CO hariç), en yüksek CAT aktivitesi değerlerine 5, 10 ve 20 dk CO uygulamalarında rastlanmıştır (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.10).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki CAT aktivitesi 7.55 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %61'lik bir artışla 12.16 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık uygulamasıyla CAT aktivitesi 12.16 EU.g^{-1} iken, 5 dk CO ile bu değer %29'lük bir artışla 15.69 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.10).

Çizelge 4.10. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen KAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi.

Uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	7.55	0.015275	1
Soğuk kontrolü	12.16	0.015275	3.21E-10
5 dk CO	15.69	0.02	6.08E-11
10 dk CO	14.82	0.02	1.12E-10
15 dk CO	10.54	0.015275	1.82E-09
20 dk CO	13.86	0.020817	1.87E-10



Şekil 4.10. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5°C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen KAT enzim aktivitesi değerleri.

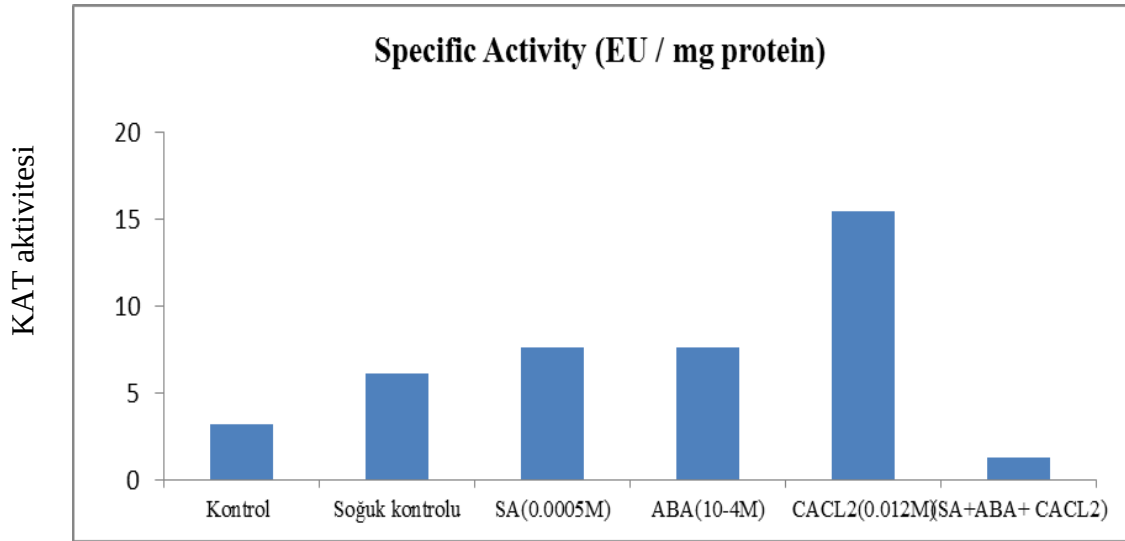
4.2.4. SA, ABA, CaCl_2 , SA+ABA+ CaCl_2 uygulaması

CAT aktivitesi 14 günlük fasulye bitkisi yapraklarında hem soğuk hem de soğuk + SA, ABA, CaCl_2 , SA+ABA+ CaCl_2 uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir. Düşük sıcaklık kontrole göre CAT aktivitesinde artışa neden olmuş, yapılan soğuk + SA, ABA, CaCl_2 uygulamaları CAT aktivitesinin daha da artmasına yol açmış, sadece soğuk+SA+ABA+ CaCl_2 uygulamasında diğer tüm uygulamalar içinde en düşük CAT aktivitesi belirlenmiştir (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.11).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki CAT aktivitesi 3.24 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %90'lık bir artışla 6.15 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki CAT aktivitesi 3.24 EU.g^{-1} iken, SA+ABA+ CaCl_2 uygulamasıyla bu değer %140'lık bir azalışla 1.35 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile CAT aktivitesi 6.15 EU.g^{-1} iken bu değer SA+ABA+ CaCl_2 için %355'lik önemli bir azalışla 1.35 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.11).

Çizelge 4.11. SA, ABA, CaCl_2 , SA+ABA+ CaCl_2 uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen KAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi.

Uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	3.24	0.00577	1
Soğuk kontrolu	6.15	0.00577	4.13E-11
SA(0.0005M)	7.62	0.01	3.21E-11
ABA(10^{-4} M)	7.68	0.01	3.04E-11
CaCl_2 (0.012M)	15.47	0.01	5.29E-13
SA+ABA+ CaCl_2	1.35	0.01	9.35E-10



Şekil 4.11. SA, ABA, CaCl_2 , SA+ABA+ CaCl_2 uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına ($10/5^{\circ}\text{C}$) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen KAT enzim aktivitesi değerleri.

4.2.5. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulaması

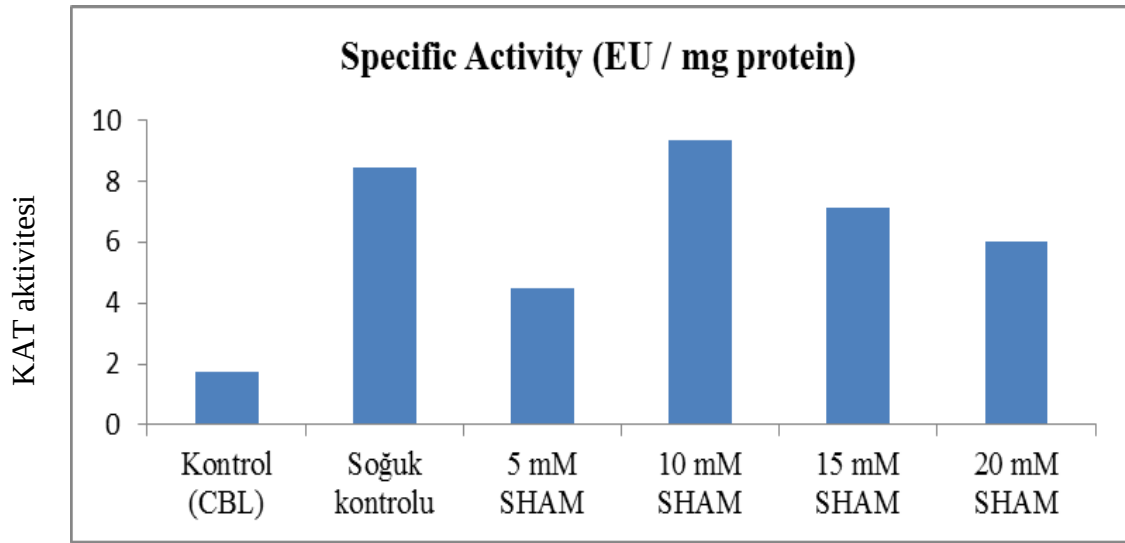
Soğuk kontrol grubu bitki yapraklarındaki CAT aktivitesi, kontrole nazaran yükselmiş iken, soğuk+10 ve 15 mM SHAM uygulananlarda nispeten daha yüksek değerler, oysa

soğuk+5 ve 20 mM SHAM uygulananlarda soğuk kontrole oranla daha düşük değerler belirlenmiştir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.12).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki CAT aktivitesi 1.73 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %388'lik bir artışla 8.45 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki CAT aktivitesi 1.73 EU.g^{-1} iken, 10 mM SHAM uygulamasıyla bu değer %440'lık bir artışla 9.35 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. 20 mM **SHAM** uygulamaları düşük sıcaklık ile azalan CAT aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile CAT aktivitesi 8.45 EU.g^{-1} iken bu değer 20 mM **SHAM** için %40'lık önemli bir azalışla 6.03 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.12).

Çizelge 4.12. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen KAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi.

Uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	1.73	0.01	1
Soğuk kontrolü	8.45	0.01	1.31E-11
5 mM SHAM	4.47	0.01	4.73E-10
10 mM SHAM	9.35	0.01	7.91E-12
15 mM SHAM	7.12	0.01	3.16E-11
20 mM SHAM	6.03	0.072342	5.56E-08



Şekil 4.12. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5⁰C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen KAT enzim aktivitesi değerleri.

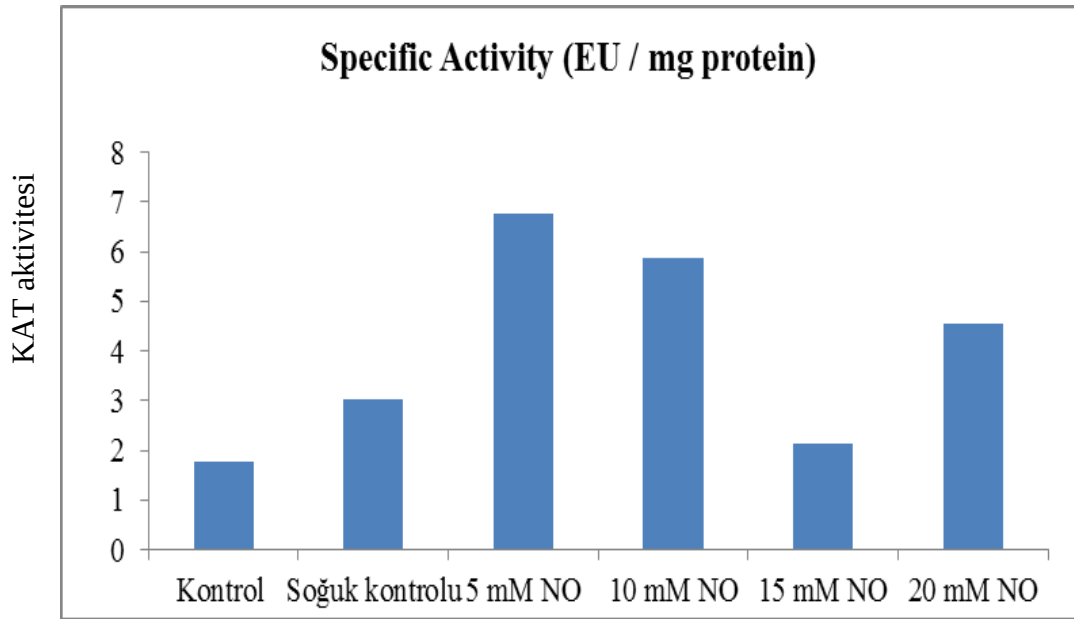
4.2.6. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulaması

Soğuk kontrol grubu bitki yapraklarındaki CAT aktivitesi, kontrole nazaran yükselme göstermiş, ancak yapılan NO uygulamalarının genelinde (soğuk+15mM NO hariç) CAT aktivitelerinin daha da yükselme gösterdiği kaydedilmiştir (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.13).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki CAT aktivitesi 1.78 EU.g⁻¹ iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %71'lik bir artışla 3.03 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki CAT aktivitesi 1.78 EU.g⁻¹ iken, 5 mM NO uygulamasıyla bu değer %279'lük bir artışla 6.75 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık uygulamasıyla bitkinin yapraklarındaki CAT aktivitesi 3.03 EU.g⁻¹ iken, 5 mM NO uygulamasıyla bu değer %123'lük bir artışla 6.75 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık uygulamasıyla bitkinin yapraklarındaki CAT aktivitesi 3.03 EU.g⁻¹ iken, 15 mM NO uygulamasıyla bu değer %29'lük bir azalışla 2.14 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.13).

Çizelge 4.13. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen KAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi.

Uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	1.78	0.01	1
Soğuk kontrolü	3.03	0.01	1.09E-08
5 mM NO	6.75	0.01	9.55E-12
10 mM NO	5.86	0.01	1.95E-11
15 mM NO	2.14	0.01	1.58E-06
20 mM NO	4.55	0.01	4.53E-10



Şekil 4.13. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5°C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen KAT enzim aktivitesi değerleri.

4.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi

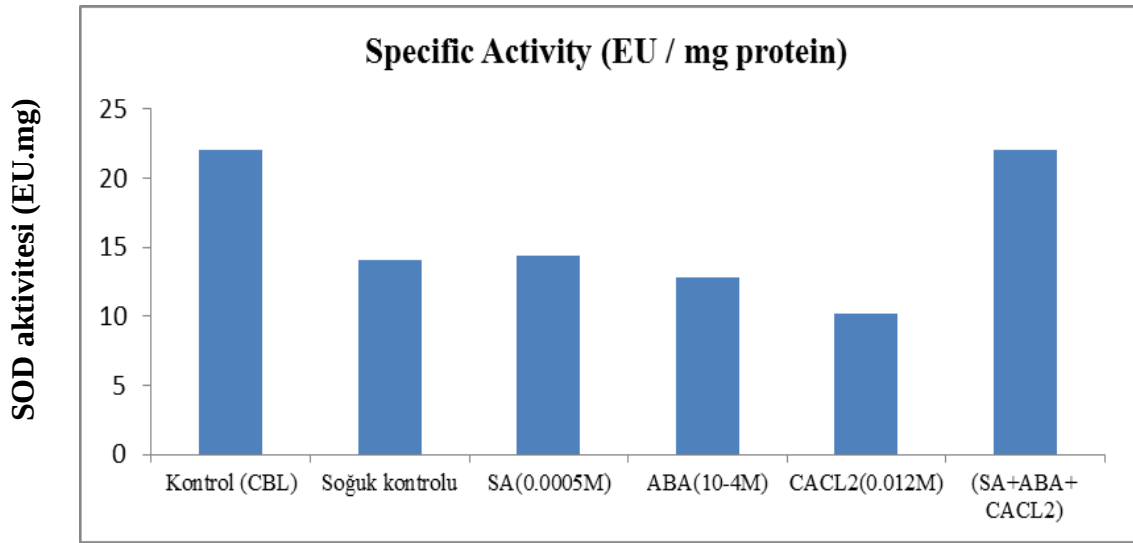
4.3.1. SA, ABA, CaCl_2 , SA+ABA+ CaCl_2 uygulaması

Uygulanan düşük sıcaklık kontrole göre SOD enzim aktivitesinde önemli derecede düşüşe neden olmuştur. ABA ve CaCl_2 uygulamaları SOD aktivitesini daha da azaltırken, SA+ABA+ CaCl_2 uygulamasında ise kontrolde ki kadar yüksek SOD değerleri kaydedilmiştir (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.14).

kontrol bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 22.015 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklığa göre bu değer %36'lık bir azalışla 14.078 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. SA+ABA+ CaCl_2 uyguladığımız bitkinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 22.044 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %36'lık bir azalışla 14.079 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 22.016 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %36'lık bir azalışla 14.079 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. CaCl_2 ile SOD aktivitesi 10.206 EU.g^{-1} iken bu değer düşük sıcaklık için %38'lik artışla 14.079 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.14).

Çizelge 4.14. Dört farklı made SA(0.0005M), ABA(10^{-4}M), CaCl_2 (0.012M), SA+ABA+ CaCl_2 uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi.

Uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	22.015	0.653	1
Soğukkontrolu	14.078	0.372	5.25E-05
SA(0.0005M)	14.345	0.321	5.28E-05
ABA(10^{-4}M)	12.769	0.304	2.42E-05
CaCl_2 (0.012M)	10.206	0.314	9.36E-06
SA+ABA+ CaCl_2	22.044	0.670	0.960079



Şekil 4.14. 14 gün 20/25⁰C’de büyütülen fasulye fidelerine, SA, ABA, CACL₂, SA+ABA+CACL₂ uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5⁰C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerleri.

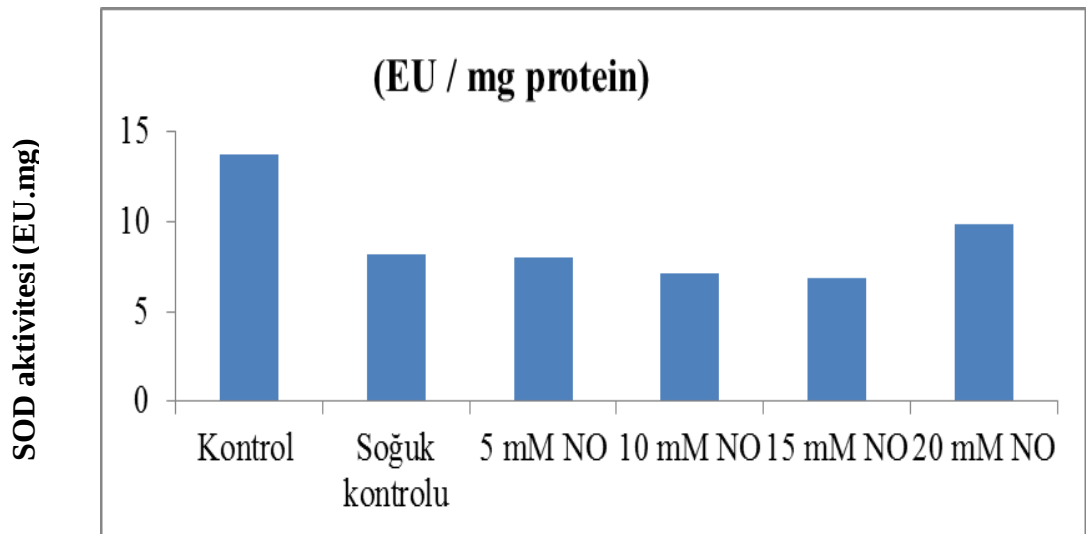
4.3.2. Nitrik oksit (NO) uygulaması

Yapılan soğuk uygulaması kontrole nazaran SOD aktivitelerinde azalmaya neden olmuş, soğuk + 5, 10, 15 mM NO uygulamalarında bu değerler daha da düşük çıkmış, oysa 20 mM NO uygulamasında ise kontrole oranla daha yüksek SOD aktivitesi belirlenmiştir (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.15).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 13.753 EU.g⁻¹ iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %40’lık bir azalışla 8.203 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 13.753 EU.g⁻¹ iken, 15 mM NO uygulamasıyla bu değer %50’lık bir azalışla 6.873EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.15).

Çizelge 4.15. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulanan, fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi (EU.g⁻¹ yaprak).

Uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	13.753	0.588584	1
Soğukkontrolu	8.203	0.365547	0.000156
5 mM NO	7.981	0.337725	0.000124
10 mM NO	7.101	0.336067	7.02E-05
15 mM NO	6.873	0.307199	5.66E-05
20 mM NO	9.887	0.445792	0.000819



Şekil 4.15. 14 gün 20/25⁰C’de büyütülen fasulye fidelerine, farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5⁰C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerleri.

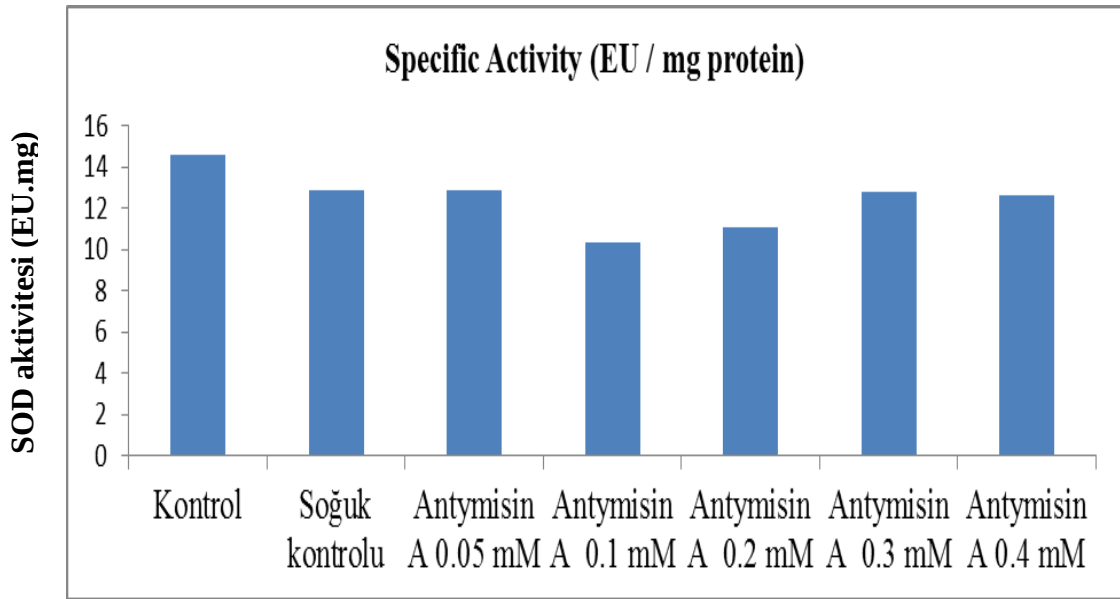
4.3.3. Antimisin A uygulaması

Kontrole nazaran soğuk uygulanan bitkilerde (soğuk kontrol) SOD aktivitesinde önemli düşüşün gerçekleştiği, soğuk kontrole nispetle 0.05 mM Antimycin A uygulaması hariç diğerlerinde SOD aktivitesinin daha da düşmüş olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.16, Şekil 4.16).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 14.611 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %15'lik bir azalışla 12.860 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 14.611 EU.g^{-1} iken, 0.1 mM Antimycin A uygulamasıyla bu değer %41'lik bir azalışla 10.329 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.16).

Çizelge 4.16. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) Antimisin A uygulanan, fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi (EU.g^{-1} yaprak).

Uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	14.611	0.639455	1
Soğuk kontrolu	12.860	0.167562	0.010129
Antymisin A 0.05 mM	12.843	0.444696	0.017088
Antymisin A 0.1 mM	10.329	0.955819	0.002975
Antymisin A 0.2 mM	11.045	0.94603	0.005659
Antymisin A 0.3 mM	12.769	0.555636	0.019705
Antymisin A 0.4 mM	12.591	0.675714	0.540374



Şekil 4.16. 14 gün 20/25⁰C’de büyütülen fasulye fidelerine, farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) Antimisin A uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5⁰C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerleri.

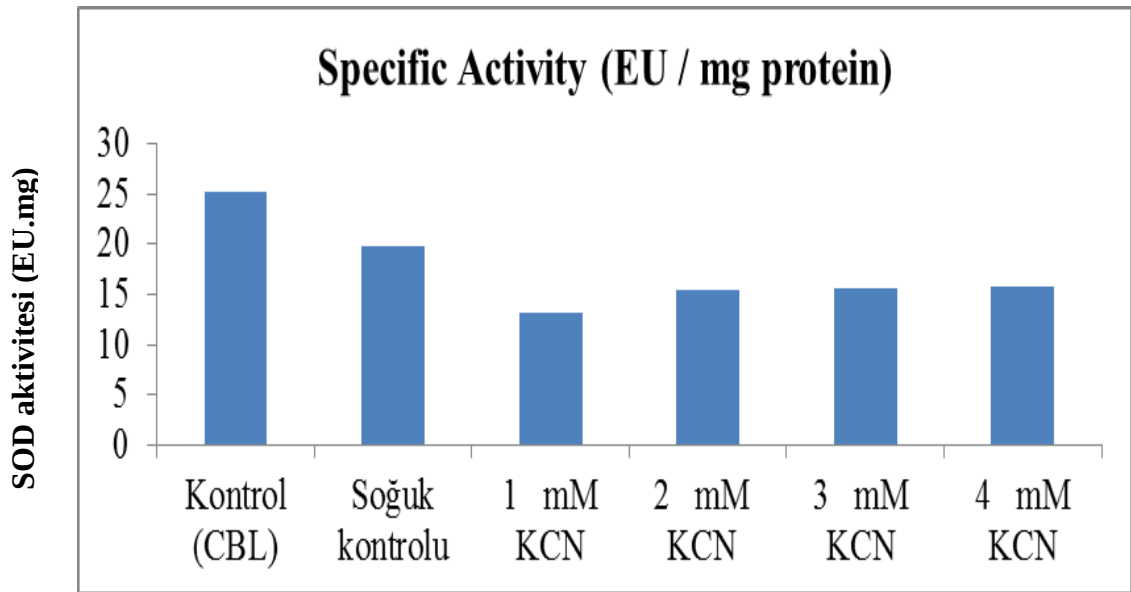
4.3.4. KCN uygulaması

Yapılan soğuk uygulaması kontrole nazaran SOD aktivitelerinde azalmaya neden olmuş, soğuk + 5, 10, 15 ve 20 mM KCN uygulamalarında bu değerler daha da düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.17, Şekil 4.17).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 25.213 EU.g⁻¹ iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %28’lik bir azalışla 19.718 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 25.213 EU.g⁻¹ iken, 1 mM KCN uygulamasıyla bu değer %93’lük bir azalışla 13.094 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.17 ve Şekil 4.17).

Çizelge 4.17. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) KCN uygulanan, fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi (EU.g⁻¹ yaprak).

Uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	25.213	2.047191	1
Soğuk kontrolü	19.718	1.897071	0.027025
1 mM KCN	13.094	0.455407	0.00056
2 mM KCN	15.418	0.565501	0.001332
3 mM KCN	15.568	0.276027	0.00127
4 mM KCN	15.774	0.715246	0.001658



Şekil 4.17. 14 gün 20/25°C'de büyütülen fasulye fidelerine, farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) KCN uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5°C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerleri.

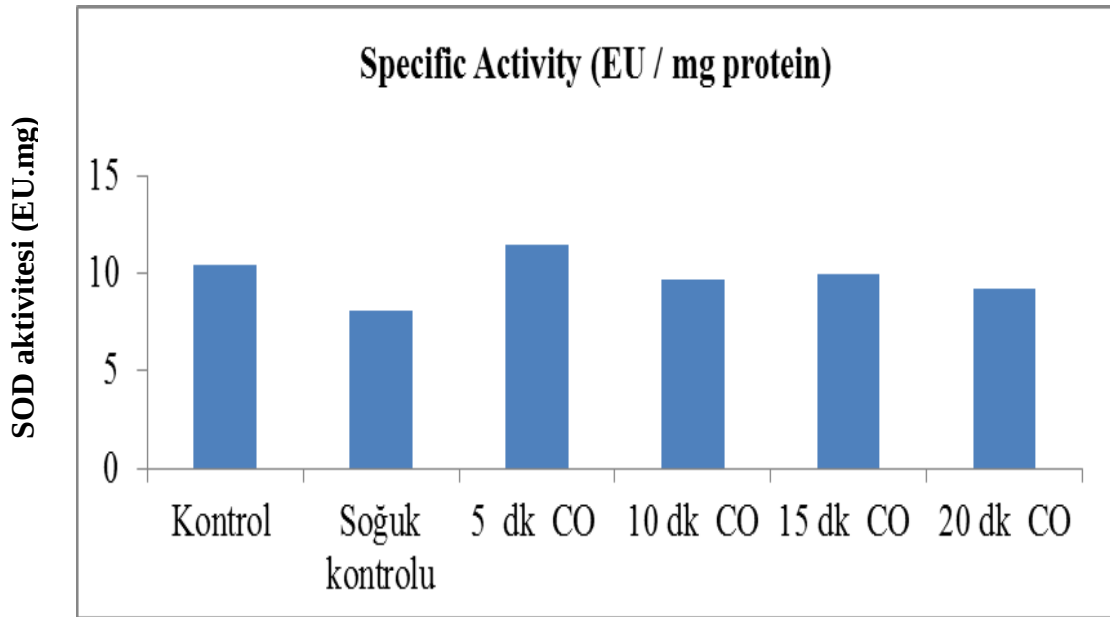
4.3.5. CO uygulaması

Kontrole nazaran soğuk uygulanan bitkilerde (soğuk kontrol) SOD aktivitesinde önemli düşüşün gerçekleştiği, soğuk kontrole nispetle SOD aktivitesinin uygulanan tüm farklı sürelerdeki CO uygulamalarında daha da düşmüş olduğu (5 dk CO uygulaması hariç), tespit edilmiştir (Çizelge 4.18, Şekil 4.18).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 10.416 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %4'lük bir azalışla 10.073 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 10.416 EU.g^{-1} iken, 20 dk CO uygulamasıyla bu değer %13'lük bir azalışla 9.231 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.18 ve Şekil 4.18).

Çizelge 4.18. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) CO uygulanan, fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi(EU.g^{-1} yaprak).

Uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	10.416	0.203574	1
Soğukkontrolu	8.073	0.253506	0.119873
5 dk CO	11.443	0.420694	0.018955
10 dk CO	9.667	0.392602	0.0427
15 dk CO	9.967	0.222184	0.061415
20 dk CO	9.231	0.19834	0.00195



Şekil 4.18. 14 gün 20/25⁰C’de büyütülen fasulye fidelerine, farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) CO uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5⁰C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerleri.

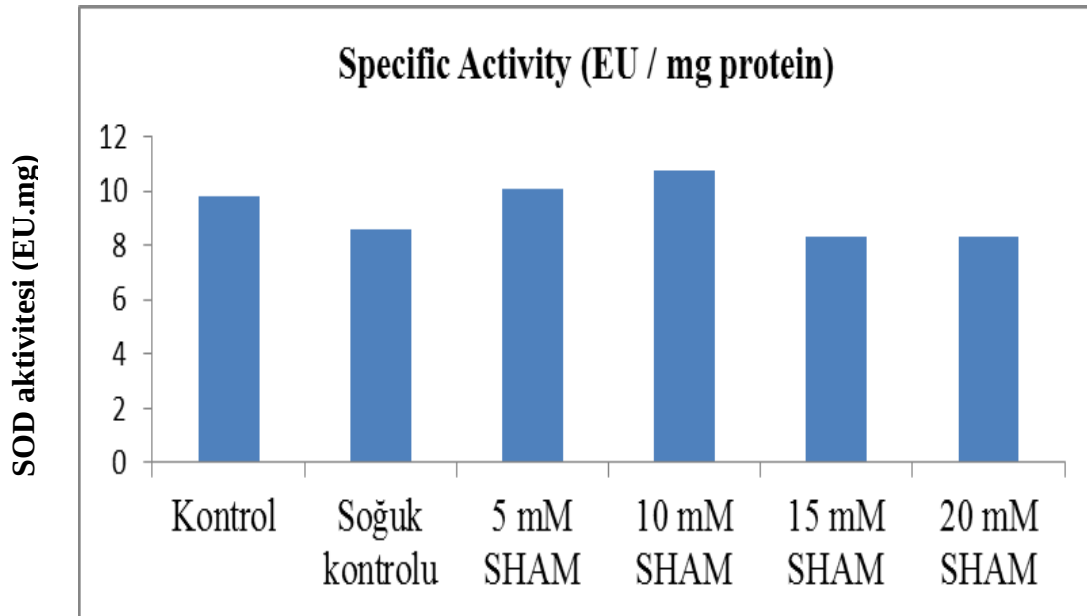
4.3.6. SHAM uygulaması

Kontrole nazaran soğuk uygulanan bitkilerde (soğuk kontrol) SOD aktivitesinde önemli düşüşün gerçekleştiği, soğuk kontrole nispetle SOD aktivitesinin uygulanan 5 ve 10 mM SHAM uygulamalarında yüksek olduğu, 15 ve 20 mM SHAM uygulamalarında ise düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.19, Şekil 4.19).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 9.818 EU.g⁻¹ iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %15’lik bir azalışla 8.571 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 9.818 EU.g⁻¹ iken, 15 mM SHAM uygulamasıyla bu değer %18’lik bir azalışla 8.291 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.19 ve Şekil 4.19).

Çizelge 4.19. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulaması, fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi (EU.g⁻¹ yaprak).

Uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	9.818	1.121133	1
Soğukkontrolu	8.571	0.726629	0.000679
5 mM SHAM	10.108	0.577753	0.001217
10 mM SHAM	10.775	0.643423	0.000491
15 mM SHAM	8.291	0.606814	0.000185
20 mM SHAM	8.306	0.818752	0.035695



Şekil 4.19. 14 gün 20/25°C’de büyütülen fasulye fidelerine, farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5°C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerleri.

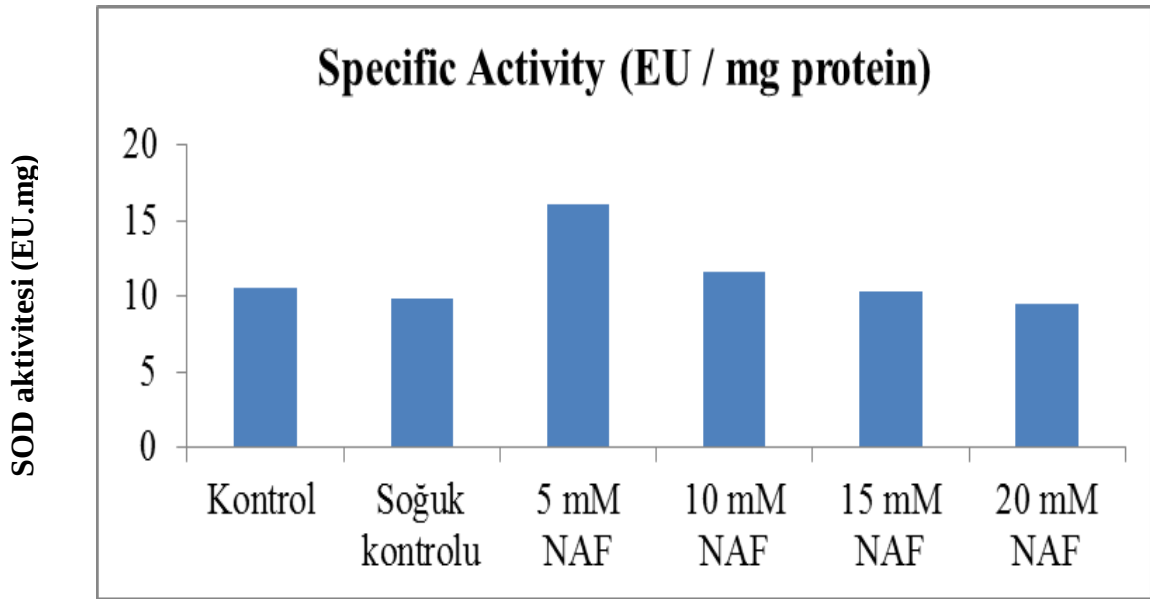
4.3.7. Sodyum florür (NAF) uygulaması

Kontrole nazaran soğuk uygulanan bitkilerde (soğuk kontrol) SOD aktivitesinde önemli düşüşün gerçekleştiği, soğuk kontrole nispetle SOD aktivitesinin uygulanan tüm farklı NAF konsantrasyonlarında yükselmiş olduğu (20 mM NAF uygulaması hariç) belirlenmiştir (Çizelge 4.20, Şekil 4.20).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 10.544 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %8’lik bir azalışla 9.803 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 10.544 EU.g^{-1} iken, 5 mM NAF uygulamasıyla bu değer %52’lik bir artışla 16.068 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.20 ve Şekil 4.20).

Çizelge 4.20. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulaması, fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi(EU.g^{-1} yaprak).

Uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	10.544	0.287361	1
Soğukkontrolu	9.803	0.363772	0.388131
5 mM NAF	16.068	0.388633	3.84E-05
10 mM NAF	11.559	0.154503	0.005747
15 mM NAF	10.378	0.185277	0.447303
20 mM NAF	9.523	0.389828	0.021734



Şekil 4.20. 14 gün 20/25⁰C’de büyütülen fasulye fidelerine, farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulanmış ve kesimden 3 gün önce iklim dolabına (10/5⁰C) transfer edildikten sonra kesilen yapraklardan elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerleri.

4.4. Peroksidaz (POD) Enzim Aktivitesi

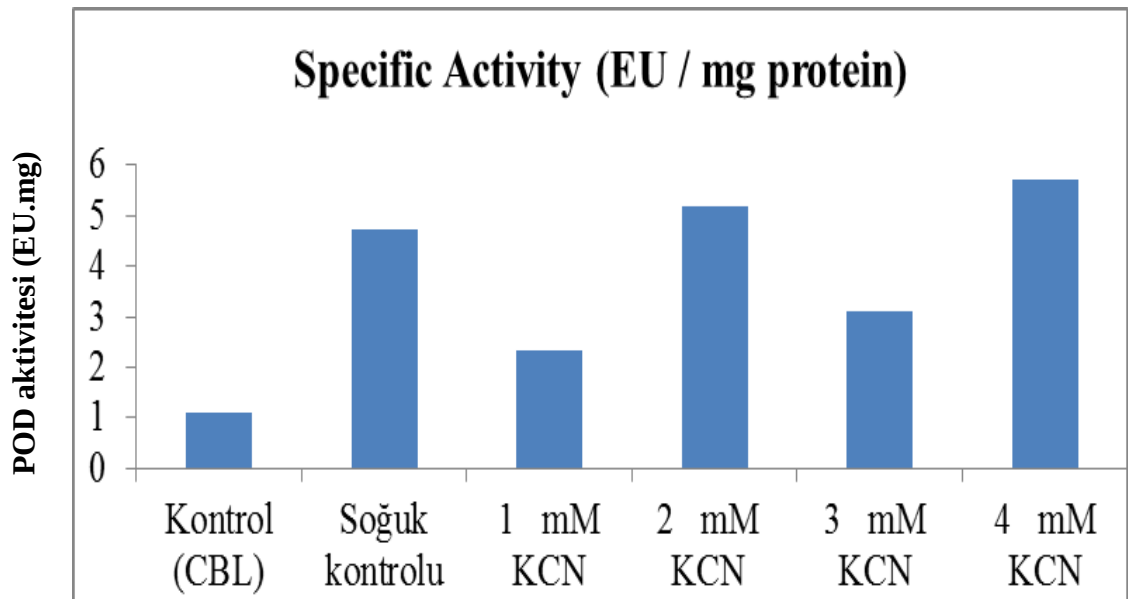
4.4.1. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulamasıyla, peroksidaz (POD) enzim aktivitesi

Uygulanan düşük sıcaklık kontrole göre peroksidaz (POD) enzim aktivitesinde önemli derecede artışa neden olmuştur. Öte yandan uygulanan soğuk+2 ve 4 mM KCN uygulamaları POD aktivitesini daha da artırmış, 1 ve 3mM KCN uygulamaları ise kontrole göre daha az artırmıştır (Çizelge 4.21 ve Şekil 4.21).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki POD aktivitesi 1.086 EU.g⁻¹ iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %336’lık artışla 4.736 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile POD aktivitesi 4.736 EU.g⁻¹ iken bu değer soğuk+ 4 mM KCN için %20’lik bir artışla 5.697 EU.g⁻¹, olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile POD aktivitesi 4.736 EU.g⁻¹ iken bu değer 1mM KCN için %51’lik azalışla 2.339 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.21 ve Şekil 4.21).

Çizelge 4.21. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulanan fasulye yapraklarından elde edilen peroksidaz (POD) enzim aktivitesi değerleri (EU.g⁻¹ yaprak).

Uygulamalar	Average (In Group)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	1.086	0.090021	1
Soğuk kontrolu	4.736	0.636454	0.0006
1 mM KCN	2.339	0.003164	1.76E-05
2 mM KCN	5.173	0.010691	1.61E-07
3 mM KCN	3.111	0.082119	8.68E-06
4 mM KCN	5.697	0.095247	4.34E-07



Şekil 4.21. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda peroksidaz (POD) aktivitesinin farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) KCN uygulamalara göre değişimi.

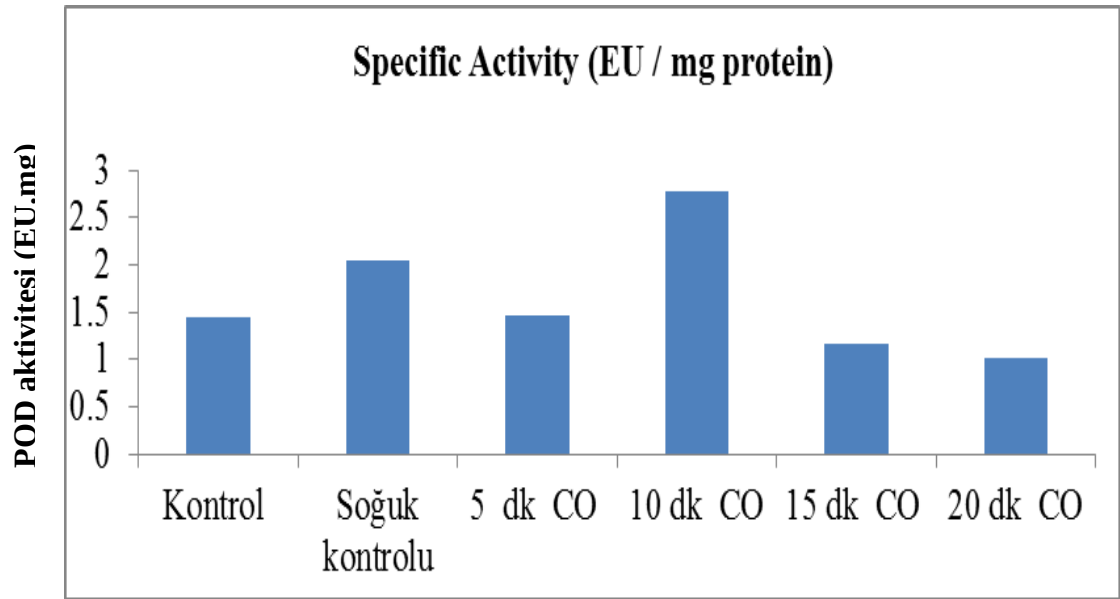
4.4.2. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulamasıyla, peroksidaz (POD) enzim aktivitesi

Soğuk kontrol bitki yapraklarında ki POD değeri kontrole nispetle yüksek çıkmış olup, değişik sürelerde uygulanan soğuk+CO uygulamalarından bazıları POD aktivitesini soğuk kontrole nispeten yükseltirken (10 dk CO), soğuk+5, 15 ve 20 dk CO uygulamaları soğuk kontrol grubuna nispetle daha düşük POD aktivitelerine neden olmuştur (Çizelge 4.22 ve Şekil 4.22).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki POD aktivitesi 1.445 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %42'lik artışla 2.050 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile POD aktivitesi 2.050 EU.g^{-1} iken bu değer 5 dk CO için %29'lük bir azalışla 1.463 EU.g^{-1} , olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile POD aktivitesi 2.050 EU.g^{-1} iken bu değer 10 dk CO için %36'luk bir artışla 2.779 EU.g^{-1} , olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.22 ve Şekil 4.22).

Çizelge 4.22. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulanan fasulye yapraklarından elde edilen peroksidaz (POD) enzim aktivitesi değerleri (EU.g^{-1} yaprak).

Uygulamalar	Average (In Group)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	1.445	0.011788	1
Soğuk kontrolu	2.050	0.00597	1.51E-07
5 dk CO	1.463	0.009278	0.104045
10 dk CO	2.779	0.001573	4.21E-09
15 dk CO	1.166	0.011314	7.78E-06
20 dk CO	1.017	0.012019	1.59E-06



Şekil 4.22. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda peroksidaz (POD) aktivitesinin Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulamalara göre değişimi.

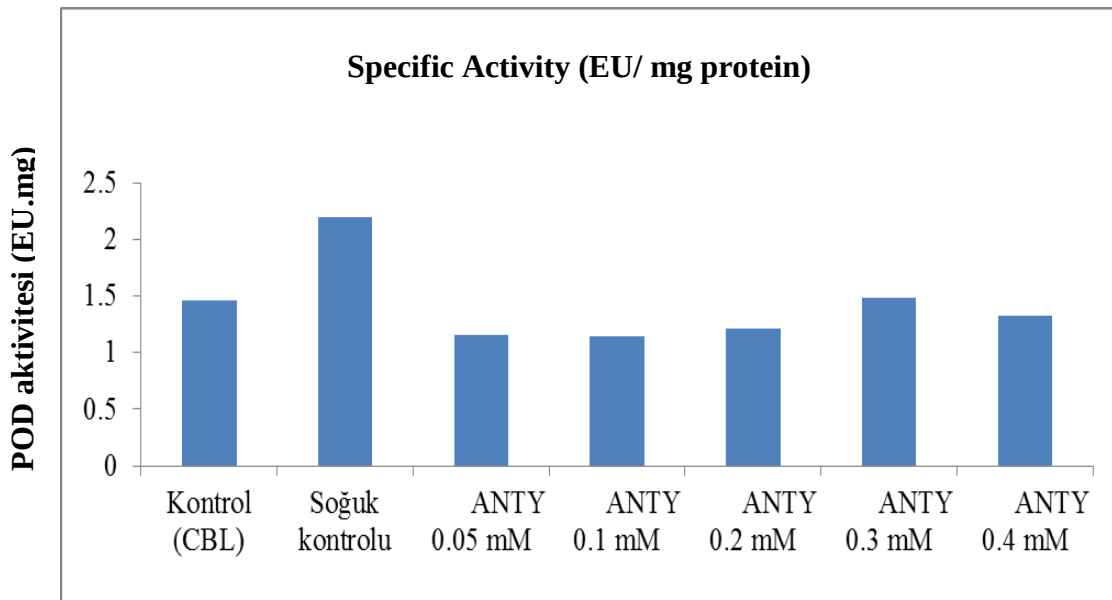
4.4.3. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulamasıyla, peroksidaz (POD) enzim aktivitesi

Soğuk kontrol bitki yapraklarındaki POD değeri kontrole nispetle yüksek çıkmış olup, yapılan tüm Soğuk + Antimycin A uygulamaları, POD aktivitesinin azalmasına, hatta kontrolden dahi daha düşük değerlerin oluşmasına (0.3mM Antimycin hariç) yol açmıştır (Çizelge 4.23 ve Şekil 4.23).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki POD aktivitesi 1.459 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %50'lik artışla 2.201 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile POD aktivitesi 2.201 EU.g^{-1} iken bu değer 0.1 mM Antymisin A için %48'lik önemli bir azalışla 1.141 EU.g^{-1} , olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.23 ve Şekil 4.23).

Çizelge 4.23. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulanan fasulye yapraklarından elde edilen peroksidaz (POD) enzim aktivitesi değerleri (EU.g⁻¹ yaprak).

Uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	1.459	0.019894154	1
Soğukkontrolu	2.201	0.091471049	0.000163544
Antymisin A 0.05 mM	1.158	0.062108083	0.00133233
Antymisin A 0.1 mM	1.141	0.030586848	0.000112576
Antymisin A 0.2 mM	1.208	0.017569546	8.20645E-05
Antymisin A 0.3 mM	1.482	0.033677323	0.361895428
Antymisin A 0.4 mM	1.329	0.031473304	0.003823774



Şekil 4.23. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda peroksidaz (POD) aktivitesinin Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulamalara göre değişimi.

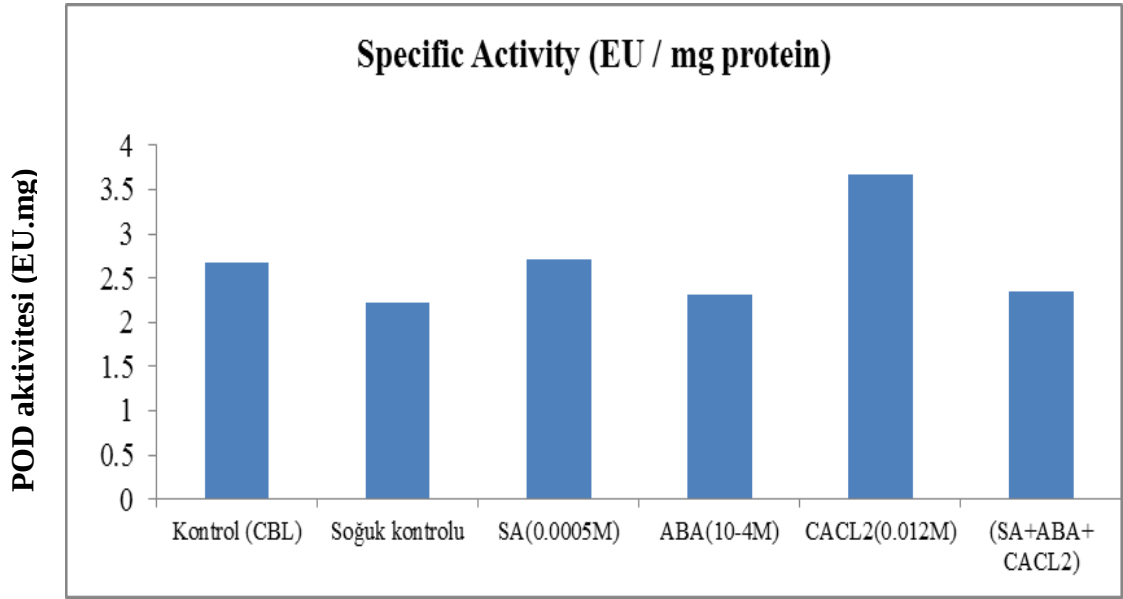
4.4.4. SA, ABA, CaCl_2 , SA+ABA+ CaCl_2 uygulamasıyla, peroksidaz (POD) enzim aktivitesi

Kontrole nazaran soğuk uygulamasında POD aktivitesinde artış gözlenmişken, SA, ABA, CaCl_2 , SA+ABA+ CaCl_2 uygulamalarında POD aktivitesinin daha da arttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.24 ve Şekil 4.24).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki POD aktivitesi 1.673 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %33'lük bir artışla 2.226 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile POD aktivitesi 2.226 EU.g^{-1} iken bu değer CaCl_2 için %64'lük önemli bir artışla 3.665 EU.g^{-1} , olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.24 ve Şekil 4.24).

Çizelge 4.24. SA, ABA, CaCl_2 , SA+ABA+ CaCl_2 uygulanan fasulye yapraklarından elde edilen peroksidaz (POD) enzim aktivitesi değerleri (EU.g^{-1} yaprak).

Uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	1.673	0.003814579	1
Soğuk kontrolu	2.226	0.024706401	6.46E-06
SA(0.0005M)	2.716	0.075977636	0.385459
ABA(10^{-4} M)	2.322	0.037350904	8.49E-05
CaCl_2 (0.012M)	3.665	0.128159898	0.00018
SA+ABA+ CaCl_2	2.356	0.073938204	0.001757



Şekil 4.24. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda peroksidaz (POD) aktivitesinin SA, ABA, CACL₂, SA+ABA+ CACL₂ uygulamalara göre değişimi.

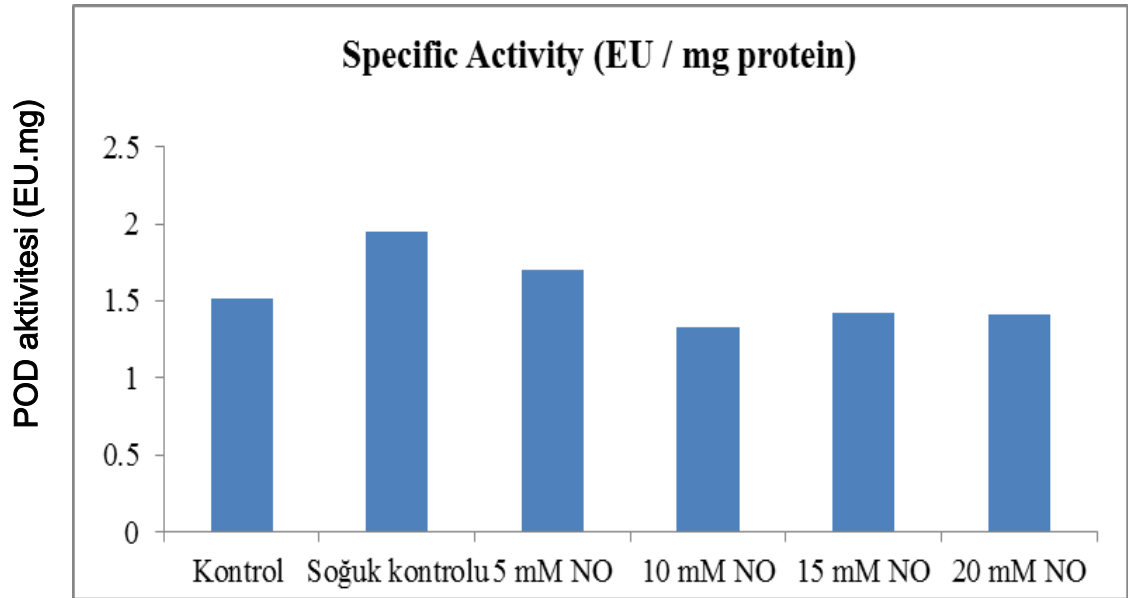
4.4.5. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulamasıyla, peroksidaz (POD) enzim aktivitesi

Soğuk kontrol bitki yapraklarındaki POD değeri kontrole nispetle yüksek çıkmış olup, yapılan tüm Soğuk + NO uygulamaları, POD aktivitesinin azalmasına, hatta kontrolden dahi daha düşük değerlerin oluşmasına (5 mM NO hariç) yol açmıştır (Çizelge 4.25 ve Şekil 4.25).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki POD aktivitesi 1.515 EU.g⁻¹ iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %29'luk artışla 1.952 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile POD aktivitesi 1.952 EU.g⁻¹ iken bu değer 10 mM NO için %47'lik bir azalışla 1.332 EU.g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.25 ve Şekil 4.25).

Çizelge 4.25. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulanan fasulye yapraklarından elde edilen peroksidaz (POD) enzim aktivitesi değerleri (EU.g⁻¹ yaprak).

Uygulamalar	(EU / mg protein)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	1.515	0.203574	1
Soğukkontrolu	1.952	0.353506	0.219873
5 mM NO	1.703	0.420694	0.018955
10 mM NO	1.332	0.392602	0.0427
15 mM NO	1.418	0.222184	0.061415
20 mM NO	1.411	0.19834	0.00195



Şekil 4.25. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda peroksidaz (POD) aktivitesinin Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NO uygulamalara göre değişimi.

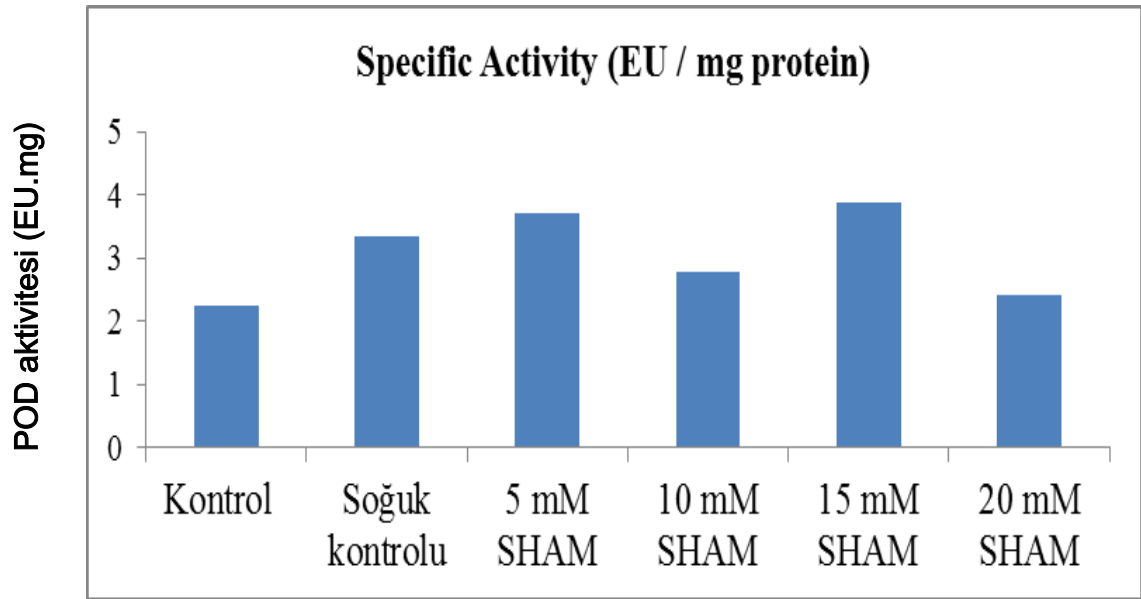
4.4.6. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulamasıyla, peroksidaz (POD) enzim aktivitesi

Kontrole nazaran soğuk uygulamasında POD aktivitesinde artış gözlenmişken, 5 ve 15 mM SHAM uygulaması POD aktivitesini Soğuk kontrole göre daha da artırırken, 10 ve 20 mM SHAM uygulamaları ise düşürmüştür (Çizelge 4.26 ve Şekil 4.26).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki POD aktivitesi 2.240 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %50'lik artışla 3.357 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile POD aktivitesi 3.357 EU.g^{-1} iken bu değer 15 mM SHAM için %15'lik bir artışla 3.879 EU.g^{-1} , olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile POD aktivitesi 3.357 EU.g^{-1} iken bu değer 20 mM SHAM için %28'lik bir azalışla 2.417 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.26 ve Şekil 4.26).

Çizelge 4.26. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulanan fasulye yapraklarından elde edilen peroksidaz (POD) enzim aktivitesi değerleri (EU.g^{-1} yaprak).

Uygulamalar	Average (In Group)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	2.240	0.03255	1
Soğukkontrolü	3.357	0.022165	1.03E-06
5 mM SHAM	3.714	0.045506	1.38E-06
10 mM SHAM	2.779	0.016733	1.4E-05
15 mM SHAM	3.879	0.02331	2.37E-07
20 mM SHAM	2.417	0.03116	0.002451



Şekil 4.26. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda peroksidaz (POD) aktivitesinin Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) SHAM uygulamalara göre değişimi.

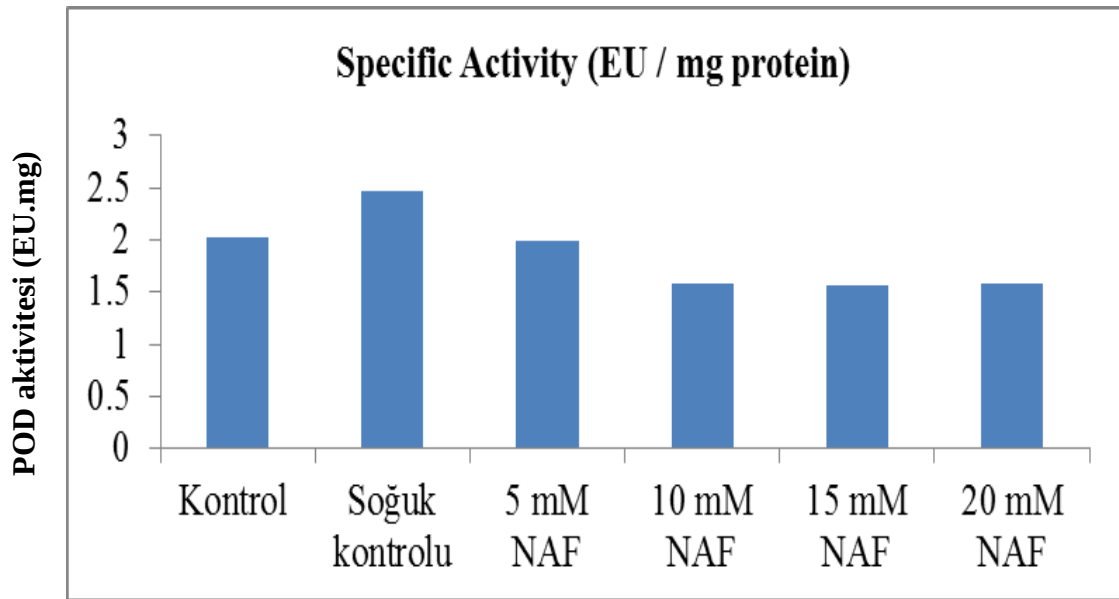
4.4.7. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulamasıyla, peroksidaz (POD) enzim aktivitesi

Kontrole nazaran soğuk uygulamasında POD aktivitesinde artış gözlenmişken, uygulanan tüm konsantrasyonlarda NAF, soğuk kontrole göre POD aktivitesinde azalmaya yol açmıştır (Çizelge 4.27 ve Şekil 4.27).

Kontrol bitkisinin yapraklarındaki POD aktivitesi 2.031 EU.g^{-1} iken, düşük sıcaklık uygulamasıyla bu değer %21'lik artışla 2.461 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ile POD aktivitesi 2.461 EU.g^{-1} iken bu değer 15 mM NAF için %36'lık önemli bir azalışla 1.565 EU.g^{-1} olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.27 ve Şekil 4.27).

Çizelge 4.27. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulanan fasulye yapraklarından elde edilen peroksidaz (POD) enzim aktivitesi değerleri (EU.g⁻¹ yaprak).

Uygulamalar	Average (In Group)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	2.031	0.003971	1
Soğukkontrolu	2.461	0.006654	7.04E-08
5 mM NAF	1.996	0.036498	0.169344
10 mM NAF	1.579	0.002258	6.93E-09
15 mM NAF	1.565	0.001384	4.43E-09
20 mM NAF	1.582	0.002649	8.46E-09



Şekil 4.27. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda peroksidaz (POD) aktivitesinin Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, ve 20 mM) NAF uygulamalara göre değişimi.

4.5. Lipid Peroksidasyon Seviyesinin (MDA Miktarı) Sonuçları

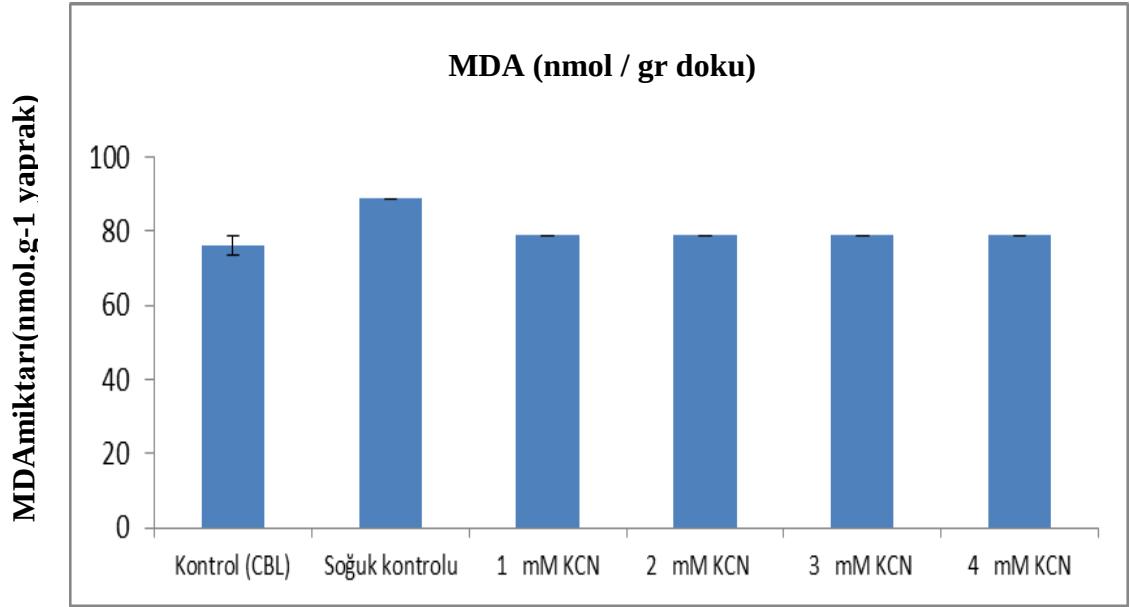
4.5.1. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulaması

Soğuk uygulaması Kontrol grubu bitki yapraklarının MDA içeriğini istatistiki anlamda önemli düzeyde artırmış, Soğuk+KCN uygulamaları ise tüm konsantrasyonlarda Soğuk kontrole oranla MDA içeriğinin daha düşük çıkmasına yol açmıştır (Çizelge 4.28 ve Şekil 4.28).

kontrol bitkilerinde MDA miktarları $76.129 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak ölçülürken, bu değerler düşük sıcaklık uygulamalarıyla %4'lük artışla $88.903 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.28 ve Şekil 4.28).

Çizelge 4.28. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g^{-1} yaprak).

Uygulamalar	MDA (nmol/gr doku)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	76.129	2.654586	1
Soğuk kontrolu	88.903	0	0.144532
1 mM KCN	78.881	0.037248	0.146941
2 mM KCN	78.903	2.01E-14	0.144532
3 mM KCN	78.925	0.037248	0.142224
4 mM KCN	78.903	0	0.144532



Şekil 4.28. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) KCN uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g⁻¹ yaprak).

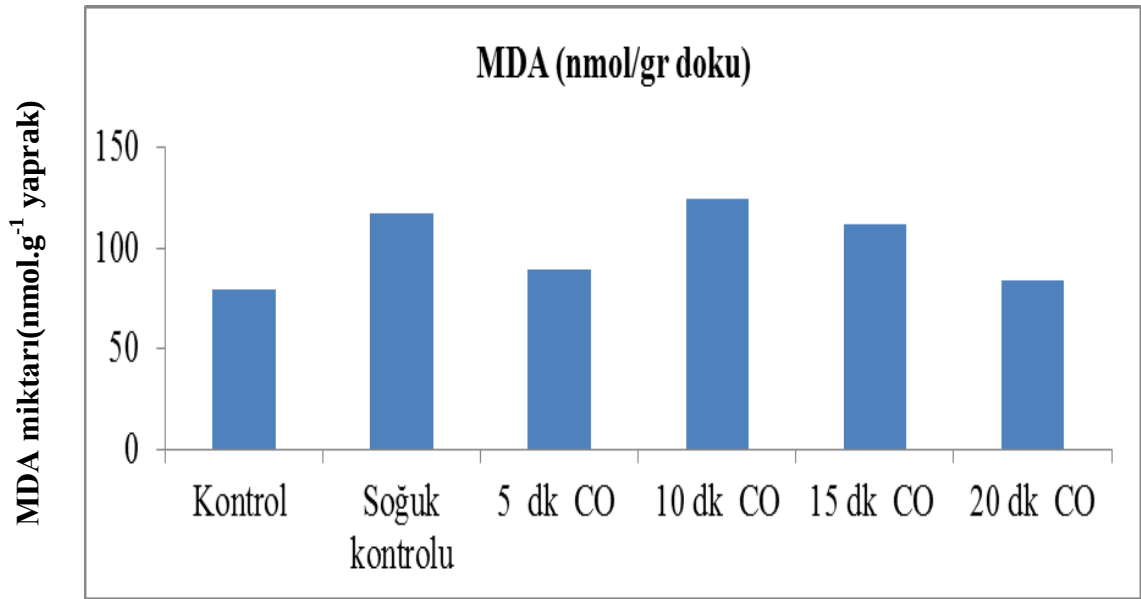
4.5.2. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulaması

Soğuk uygulaması Kontrol grubu bitki yapraklarının MDA içeriğini istatistiki anlamda önemli düzeyde artırmış, Soğuk + CO uygulamaları genelde MDA içeriğinin soğuk kontrole oranla daha düşük çıkmasına (10 dk CO uygulaması hariç) sebep olmuştur (Çizelge 4.29 ve Şekil 4.29).

Kontrol bitkilerinde MDA miktarları 79.720 nmol.g⁻¹ olarak ölçülürken, bu değerler düşük sıcaklık uygulamalarıyla %47'lik artışla 117.483 nmol.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. kontrol bitkilerinde MDA miktarları 79.720 nmol.g⁻¹ iken bu değer 10 dk CO için %55'lik önemli bir artışla 123.871 nmol.g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.29 ve Şekil 4.29).

Çizelge 4.29. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g^{-1} yaprak).

Uygulamalar	MDA (nmol/gr doku)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	79.720	0.915432114	1
Soğuk kontrolü	117.483	0.784872585	6.915E-07
5 dk CO	89.183	0.134301032	5.967E-05
10 dk CO	123.871	0.451612903	1.903E-07
15 dk CO	111.398	0.19710003	5.081E-07
20 dk CO	83.720	0.556237297	0.0029436



Şekil 4.29. Dört farklı zamanda (5, 10, 15 ve 20 dk) CO uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g^{-1} yaprak).

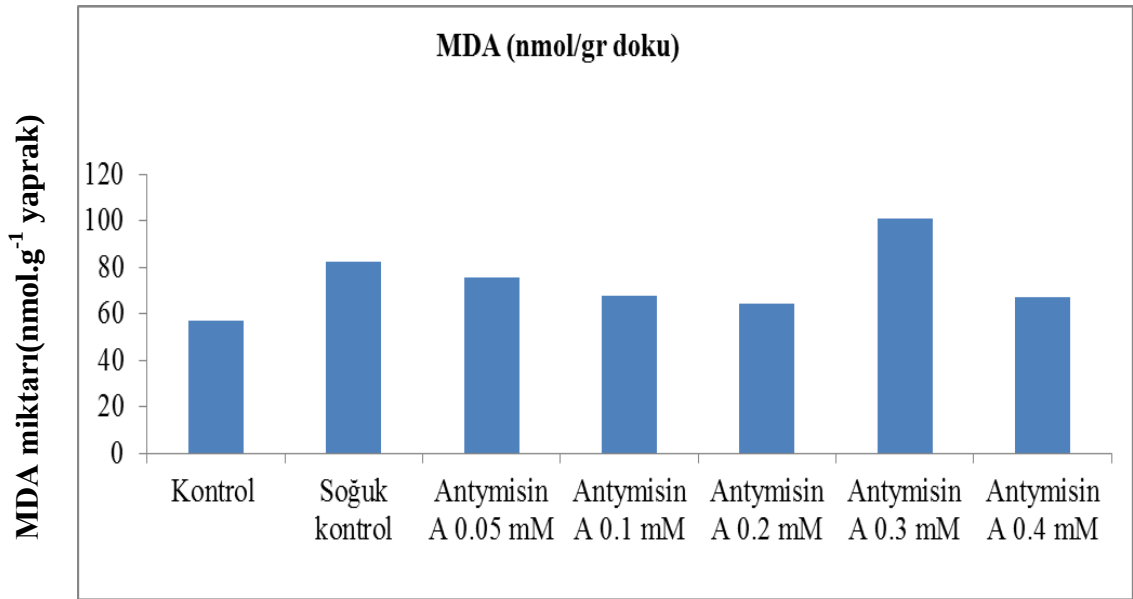
4.5.3. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulaması

Soğuk uygulaması Kontrol grubu bitki yapraklarının MDA içeriğini istatistiki anlamda önemli düzeyde artırmış, ancak soğuk +Antimycin A uygulamaları (20 mM Antimycin A hariç) soğuk kontrole nispeten MDA içeriğinin daha düşük çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.30 ve Şekil 4.30).

Kontrol bitkilerinde MDA miktarları $56.882 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak ölçülürken, bu değerler düşük sıcaklık uygulamalarıyla %44'lük artışla $82.172 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. kontrol bitkilerinde MDA miktarları $56.882 \text{ nmol.g}^{-1}$ iken bu değer 0.3 mM Antymisin A için %78'lik önemli bir artışla $101.032 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir(Çizelge 4.30 ve Şekil 4.30).

Çizelge 4.30. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g^{-1} yaprak).

Uygulamalar	MDA(nmol/gr doku)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	56.882	0.260738831	1
Soğuk kontrol	82.172	0.39420006	8.125E-08
Antymisin A 0.05 mM	75.699	0.613186126	1.045E-06
Antymisin A 0.1 mM	67.849	0.548703261	6.233E-06
Antymisin A 0.2 mM	64.409	0.742169201	7.764E-05
Antymisin A 0.3 mM	101.032	0.709677419	5.729E-08
Antymisin A 0.4 mM	67.140	0.548703261	0.003823774



Şekil 4.30. Beş farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) Antymisin A uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g⁻¹ yaprak).

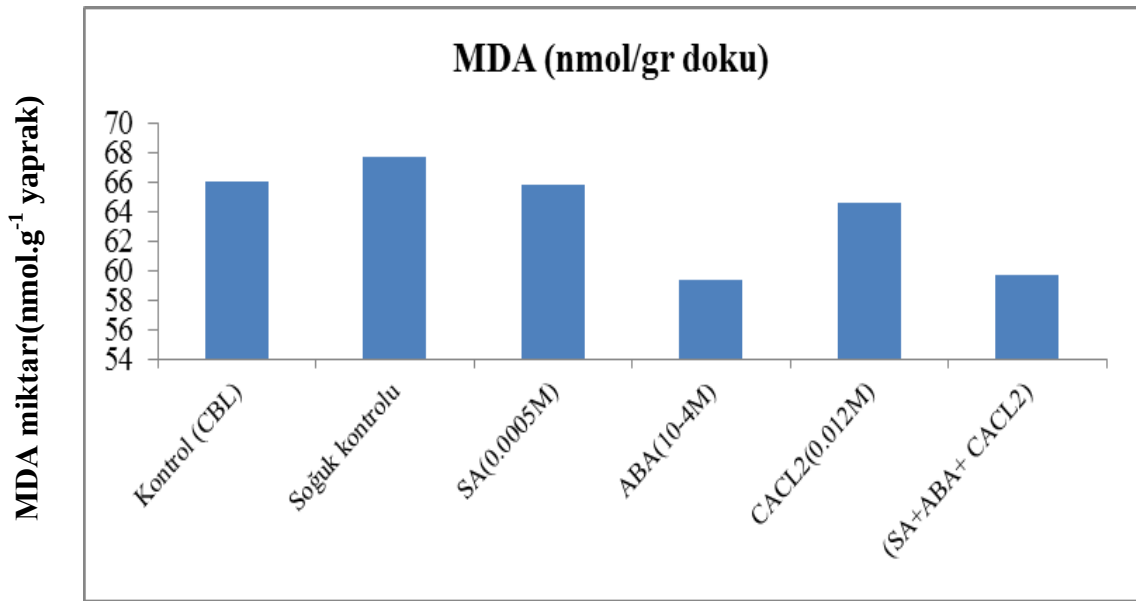
4.5.4. SA, ABA, CaCl₂, SA+ABA+CaCl₂ uygulaması

Soğuk uygulaması Kontrol grubu bitki yapraklarının MDA içeriğini istatistiki anlamda önemli düzeyde artırmış, ancak soğuk +SA, ABA, CaCl₂ ve SA+ABA+CaCl₂ uygulamaları soğuk kontrole nispeten MDA içeriğinin daha düşük çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.31 ve Şekil 4.31).

Kontrol bitkilerinde MDA miktarları 57.086 nmol.g⁻¹ olarak ölçülürken, bu değerler düşük sıcaklık uygulamalarıyla %44'lük artışla 76.742 nmol.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. kontrol bitkilerinde MDA miktarları 57.086 nmol.g⁻¹ olarak ölçülürken, bu değerler CaCl₂ uygulamalarıyla %13'lük artışla 64.581 nmol.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. kontrol bitkilerinde MDA miktarları 57.086 nmol.g⁻¹ iken bu değer ABA için %4'lük artışla 59.312 nmol.g⁻¹ olarak belirlenmiştir(Çizelge 4.31 ve Şekil 4.31).

Çizelge 4.31. Dört farklı made SA, ABA, CaCl_2 , SA+ABA+ CaCl_2 uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g^{-1} yaprak).

Uygulamalar	MDA (nmol/gr doku)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	57.086	0.162362	1
Soğuk kontrolu	76.742	0.22349	0.000486
SA(0.0005M)	65.785	0.074497	0.043278
ABA(10^{-4} M)	59.312	0.074497	3.22E-07
CaCl_2 (0.012M)	64.581	0.232616	0.000778
SA+ABA+ CaCl_2	59.677	0.281219	4.37E-06



Şekil 4.31. Dört farklı made SA, ABA, CaCl_2 , SA+ABA+ CaCl_2 uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g^{-1} yaprak).

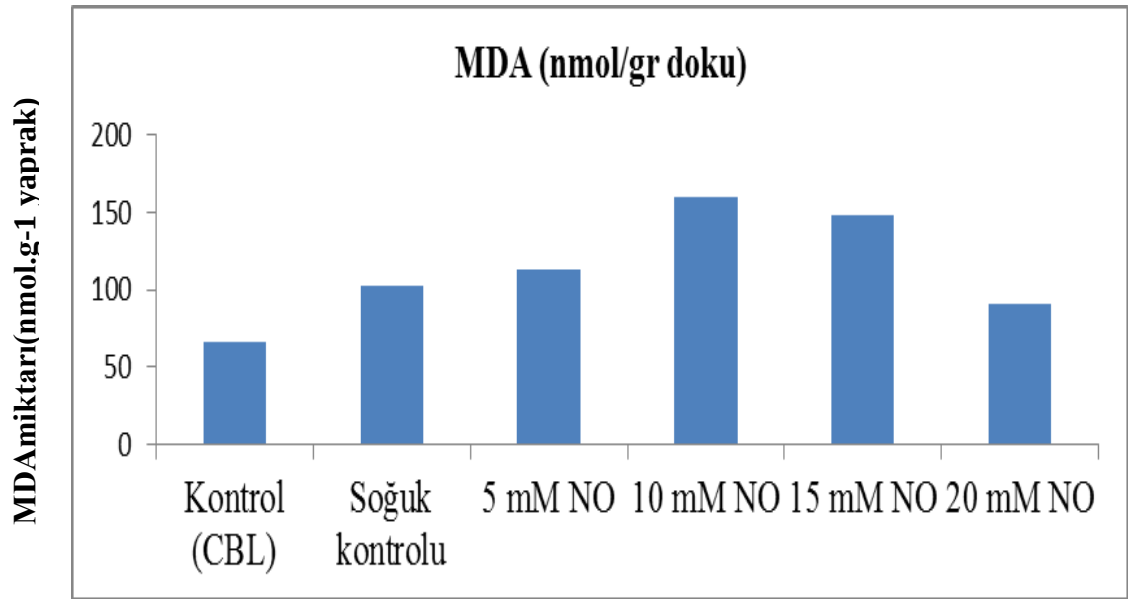
4.5.5. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20 mM) NO uygulaması

Soğuk uygulaması Kontrol grubu bitki yapraklarının MDA içeriğini istatistiki anlamda önemli düzeyde artırmış, Soğuk+NO uygulamaları ise tüm konsantrasyonlarda Soğuk kontrole oranla MDA içeriğinin daha yüksek çıkmasına (20 mM NO uygulaması hariç) yol açmıştır (Çizelge 4.32 ve Şekil 4.32).

Kontrol bitkilerinde MDA miktarları $66.236 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak ölçülürken, bu değerler düşük sıcaklık uygulamalarıyla %56'lık artışla $103.054 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. kontrol bitkilerinde MDA miktarları $66.236 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak ölçülürken, bu değerler 10 mM NO uygulamalarıyla %141'lik bir artışla $159.892 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. düşük sıcaklık uygulamalarıyla MDA miktarları $103.054 \text{ nmol.g}^{-1}$ iken bu değer 10 mM NO için %55'lik artışla $159.892 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir(Çizelge 4.32 ve Şekil 4.32).

Çizelge 4.32. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) NO uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g^{-1} yaprak).

Uygulamalar	MDA (nmol/gr doku)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	66.236	0.31825051	1
Soğuk kontrolu	103.054	0.0372484	3.82E-09
5 mM NO	113.613	3.24125334	1.47E-05
10 mM NO	159.892	21.6064828	0.001685
15 mM NO	148.581	0.48708609	1.66E-09
20 mM NO	90.6237	0.2265732	4.39E-08



Şekil 4.32. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) NO uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g⁻¹ yaprak).

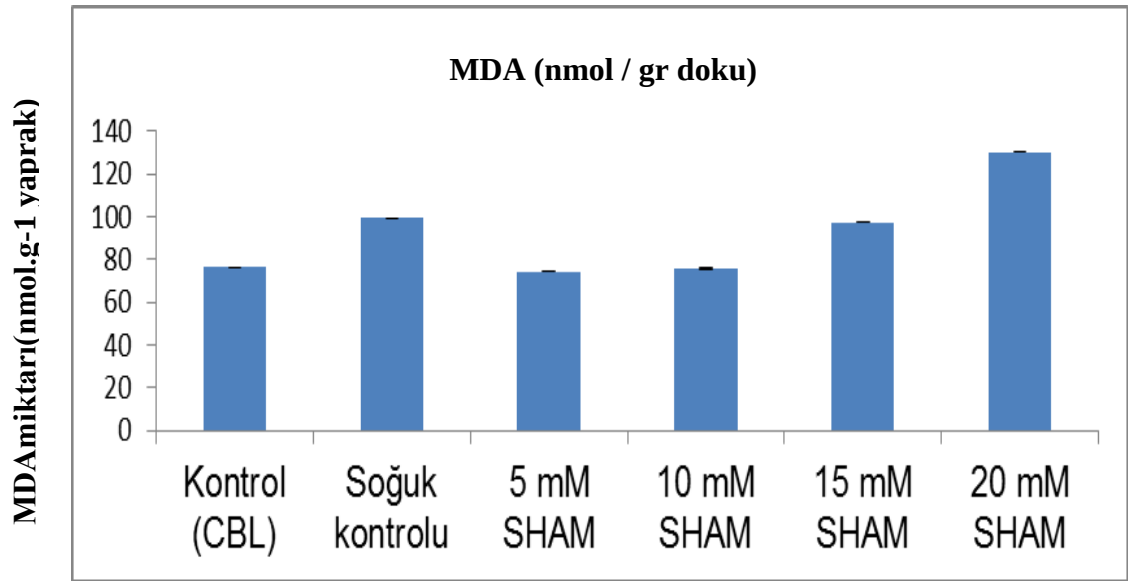
4.5.6. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20 mM) SHAM uygulaması

Soğuk uygulaması Kontrol grubu bitki yapraklarının MDA içeriğini istatistiki anlamda önemli düzeyde artırmış, Soğuk+SHAM uygulamalarından 5 ve 10 mM SHAM uygulamalarının MDA içeriğini düşürücü etki yaptığı, oysa 15 mM'lık olanın pek etkilemediği, ancak 20 mM SHAM uygulamasının çok önemli düzeyde MDA içeriğini artırıcı etki yaptığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.33 ve Şekil 4.33).

Kontrol bitkilerinde MDA miktarları 76.107 nmol.g⁻¹ olarak ölçülürken, bu değerler düşük sıcaklık uygulamalarıyla %30'luk artışla 99.204 nmol.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. kontrol bitkilerinde MDA miktarları 76.107 nmol.g⁻¹ olarak ölçülürken, bu değerler Soğuk+20 mM SHAM uygulamalarıyla %54'luk bir artışla 130.107 nmol.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. düşük sıcaklık uygulamalarıyla MDA miktarları 99.204 nmol.g⁻¹ iken bu değer Soğuk+5 mM SHAM için %27'lik bir azalışla 78.215 nmol.g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.33 ve Şekil 4.33).

Çizelge 4.33. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) SHAM uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g^{-1} yaprak).

Uygulamalar	MDA (nmol/gr doku)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	76.107	0.0372484	1
Soğuk kontrolu	99.204	0.09855001	2.89E-10
5 mM SHAM	78.215	0.09855001	6.36E-06
10 mM SHAM	79.892	0.32472406	0.31806
15 mM SHAM	97.312	0.24425412	1.23E-08
20 mM SHAM	130.107	0.14899362	4.36E-11



Şekil 4.33. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) SHAM uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g^{-1} yaprak).

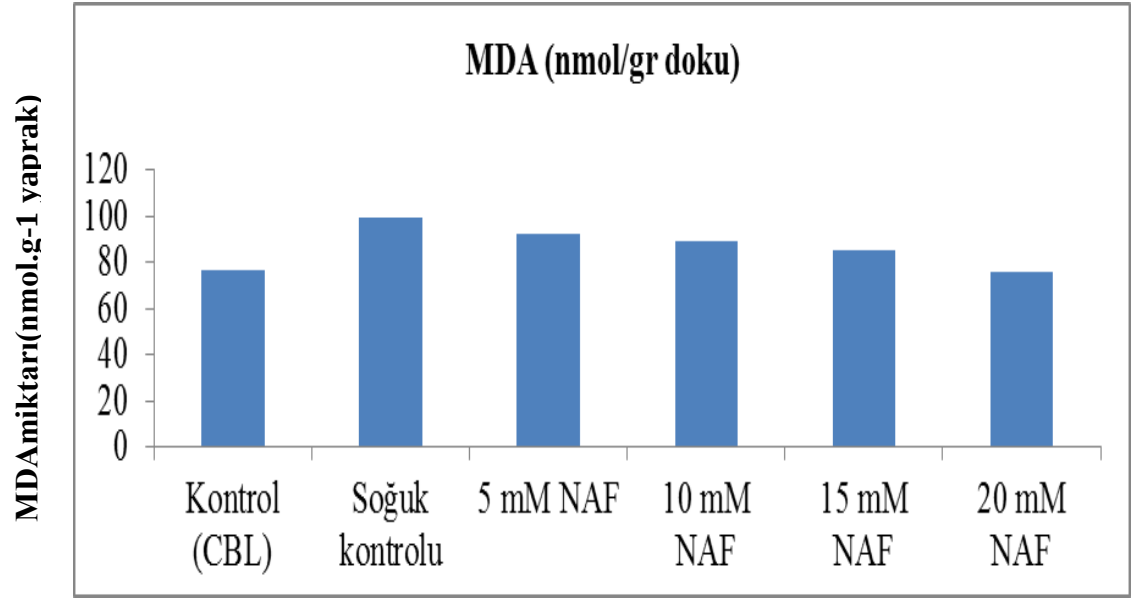
4.5.7. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20 mM) NAF uygulaması

Soğuk uygulaması Kontrol grubu bitki yapraklarının MDA içeriğini istatistiki anlamda önemli düzeyde artırmış, Soğuk+NAF uygulamaları ise tüm konsantrasyonlarda Soğuk kontrole oranla MDA içeriğinin daha düşük çıkmasına yol açmıştır (Çizelge 4.34 ve Şekil 4.34).

Kontrol bitkilerinde MDA miktarları $76.667 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak ölçülürken, bu değerler düşük sıcaklık uygulamalarıyla %29'luk artışla $99.140 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. kontrol bitkilerinde MDA miktarları $76.667 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak ölçülürken, bu değerler Soğuk+5 mM NAF uygulamalarıyla %16'lık bir artışla $92.667 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. düşük sıcaklık uygulamalarıyla MDA miktarları $99.140 \text{ nmol.g}^{-1}$ iken bu değer Soğuk+20 mM NAF için %23'lük bir azalışla $75.699 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir(Çizelge 4.34 ve Şekil 4.34).

Çizelge 4.34. Dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20 mM) NAF uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g^{-1} yaprak).

Uygulamalar	MDA (nmol/gr doku)	Standart Sapma	Ttest
Kontrol	76.667	0.134301032	1
Soğuk kontrolu	99.140	0.134301032	3.401E-09
5 mM NAF	92.667	0.098550015	7.831E-09
10 mM NAF	89.441	0.134301032	3.256E-08
15 mM NAF	85.269	0.134301032	1.583E-07
20 mM NAF	75.699	0.134301032	0.0009098



Şekil 4.34. Dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 3, 4 mM) NAF uygulaması fasulye yapraklarından elde edilen Malondialdehid (MDA) miktarı değerleri (nmol.g^{-1} yaprak).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Total Protein İçeriği

Bu araştırmada düşük sıcaklıklara hassas olduğu bilinen fasulye fidelerine üşüme sıcaklıklarının (10°C) uygulanması sonucunda, yapraklardaki total protein içeriğinin istatistiki olarak önemli düzeylerde arttığı belirlenmiştir. Bu durum daha önce yapılan tüm araştırmaların sonuçlarıyla paralellik arz etmektedir. Ancak fidede ki alternatif solunum yoluna etki ettiği bilinen aktivator (KCN, CO, NaF, SA, ABA, Antimycin A ve NO) ve inhibitör (SHAM) niteliğinde olan kimyasalların üşüme sıcaklıklarında fidede uygulanması sonucunda, total protein içeriğinde soğuk kontrol ile mukayese edildiğinde çok daha fazla artışlara yol açıldığı (sadece Antimycin A uygulaması kontrole oranla protein içeriğinde önemli düzeyde artışa neden olmuştur) belirlenmiştir. Bitkilerde soğuğa direnç sağlama mekanizmalarının önemli bir parçasını da, bitkide bazı özel proteinlerin sentezlenmesi olduğu yaygın olarak kabul gören bir durumdur. Ancak bu araştırmada düşük sıcaklıklarla birlikte uygulanan, normal elektron taşıma zincirini farklı noktalardan bloke ederek, alternatif solunum yolu üzerinde görevli Alternatif oksidaz enziminin aktivitesini aktive artırıcı yönde etkili olduğu bilinen bu kimyasalların uygulanması halinde total protein sentezinin daha da artmış olması, bize, bu maddelerin öncelikle mitokondriyal ETS'yi bloke etmeleri nedeniyle ETS'den etrafa savrulan elektronların oksidan maddelerin yoğunluğunun artmasına yol açtığını ve bu maddelerin belirli bir düzeye ulaşması sonucunda, söz konusu olan Alternatif oksidazın (AOX) sentezinde görevli gen bölge veya bölgelerinin normalden daha fazla aktifleştirildiğini (transkripsiyonel etki) ve bu bölgelerden mRNA'ların sentezlendiğini, bu mRNA'ların da protein sentezlerinde kalıplık yapmak suretiyle total protein içeriğinde belirlenmiş olan bu artışı ortaya çıkarmış olduğunu düşündürmektedir. Yani bu AOX'un aktifleşmesine yol açan, dolayısıyla alternatif solunumun aktif hale gelmesini sağlayan bu kimyevi maddeler, sadece hücrede var olan AOX enziminin mitokondrilerde ki ilgili yerine bağlanmasına sebep olmamakta, aynı zamanda hücrenin gen merkezlerine de bir yolla etki ederek yeni AOX enzimlerinin de sentezlenmesini uyarıcı etki gösteriyor olabileceğini düşünmekteyiz. Zira AOX kapasitesinin, protein miktarının ve AOX

kodlayan mRNA transkript miktarının çeşitli biyotik ve abiyotik stres şartları altında arttığı birçok araştırmayla rapor edilmiştir (Simons *et al.* 1999; Djajanegara *et al.* 2002; Sieger *et al.* 2005; Rasmusson *et al.* 2009; Çakmak 2010). AOX proteinindeki bu değişimler stres şartları altında artan ROS miktarının AOX proteinini kodlayan gen ekspresyonunu artırdığı şeklinde bir yaklaşımla açıklanmıştır. Ancak benzer şekilde, AOX enzimin inhibitörü olduğu bilinen SHAM maddesinin de 10 ve 20 mM konsantrasyonlarda total protein içeriğinde artışa yol açmış olması, ileri sürdüğümüz fikirle çelişmektedir. Bu durumda, AOX aktivatörlerinin sadece AOX sentezi üzerine değil, aynı zamanda bu yolla ilgili olup olmadığını kesin olarak söyleyemeyeceğimiz birçok değişik proteinin de sentezine yol açıyor olabileceğini, SHAM'ın ise yaprak hücrelerinde ki mevcut AOX inaktivasyonlarını sağlamanın yanı sıra, yine bu metabolik yolla ilgili veya başka metabolik yollarla ilgili protein sentezlerine yol açıyor olabileceğini düşünmekteyiz.

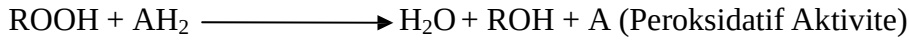
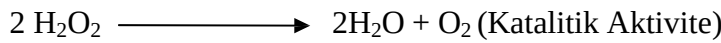
5.2. Antioksidant Enzim Aktiviteleri

Fasulye fidelerine uyguladığımız düşük sıcaklıklar, bitkinin yapraklarında kontrolle kıyaslandığında CAT ve POD aktivitelerinde istatistiki anlamda önemli düzeyde artışlara yol açmıştır. Genel anlamda stress altında ki bitkide antioksidant enzim aktivitelerinin artışı, bitkinin stresten korunmak için gerekli olan bir mekanizmasını devreye soktuğu anlamına gelmektedir. Şöyle ki; stress altında ki üşümeye hassas olan bitkide stresin süre ve şiddetine bağlı olarak hücre ve organel zarlarının bu stress nedeniyle tahribat gördüğü ve bu tahribatın sonucunda hücre içinde oksidan özellikteki maddelerin miktarının arttığı görülür. Bitki, söz konusu bu oksidantları metabolize ederek toksik etkilerini yok edecek veya azaltacak olan antioksidan enzimlerinin aktivitelerini düzenleyebildiği oranda o strese karşı direnç gösterebilmektedir. Bu noktadan hareketle, söz konusu antioksidant enzim aktivitelerinin üşüme sıcaklıklarında fasulye yapraklarında artmış olması, bu bitkinin bu stress şartlarında zar yapılarının tahribat görmüş olabileceğini ve hücre oksidan özellikteki maddelerin normal şartlardakinden daha fazla oluştuğunu ve bitkinin genotipinde sahip olduğu bu oksidatif strese karşı koyabilme potansiyeli sayesinde antioksidatif mekanizmasını devreye

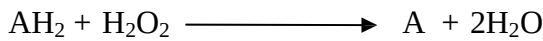
sokabildiğini göstermektedir. Fakat fasulye bitkisinin üşüme sıcaklıklarına ancak belirli bir süre dayanabildiği (üşüme sınır sıcaklığı fasulye için $10/5^{\circ}\text{C}$ 'de varyetesiine bağlı olarak 4-9 gün) bilinmektedir. Bu süre sonunda fasulye bitkisinin ölüyor olması, stresin devamı halinde hücre zarlarında ki tahribatın artmaya devam ettiği, dolayısıyla daha fazla oksidant maddelerin ortaya çıktığı, ancak bitki hücrelerinin bu artışa karşı koyacak olan antioksidatif mekanizmayı kendi genetik potansiyeli ile doğal süreç içerisinde düzenlemeye devam edemediği anlamına gelmektedir. Bu ön bilgilerden hareketle, bitkide stresin neden olduğu hasar arttıkça hücre ve organel zarlarında ki hasarın da artmakta olduğunu, özellikle mitokondri ve kloroplast gibi ETS olaylarının cereyan ettiği organel zarlarında meydana gelebilecek hasarın artışıyla hücre içinde oksidant özellikteki maddelerin miktarında paralel artışların olabileceğini, oksidant madde yoğunluğunun giderek artış göstermesinin de bitkinin genetik potansiyelini harekete geçirerek antioksidant enzim sentezini tetiklemekte olduğunu, yani antioksidant enzimlerinin aktivitesinde artışa yol açtığını söylemek mümkün gözükmektedir. Bu durumda, fasulye bitkisine uyguladığımız üşüme sınır sıcaklığı, yaprak hücre ve organel zarlarında hasara yol açmış, bazı oksidant maddeler normalden daha fazla ortaya çıkmaya başlamış ve bu oksidantları bertaraf etmek üzere hücrelerde antioksidant maddelerin sentezinde ve dolayısıyla aktivitesinde artışlar gözlenmiştir. Zira bu araştırmada fasulye yaprak dokularında aktivitelerini belirlemeye çalıştığımız CAT ve POD aktivitelerinin soğuk kontrolde, kontrole nazaran yüksek, oysa SOD aktivitelerinin düşük çıkmış olması, üşüme stresine maruz bıraktığımız fasulye bitkisinde CAT ve POD enzimlerinin üzerinde etkili oldukları oksidant maddelerin (H_2O_2) normalden daha fazla, oysa SOD enziminin üzerinde etkili olduğu oksidantların ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ise üşüme stresi şartlarında nispeten daha az sentezlenmekte olduğunu bir göstergesi olduğunu düşünmekteyiz.

Öte yandan fasulye bitkilerine üşüme sınır sıcaklığı ile birlikte uyguladığımız Antimycin A, KCN, NaF, NO, CO, bazı konsantrasyonlarda CAT, POD ve SOD aktivitelerinde artışa yol açarken, bazı konsantrasyonlarda ise istatistiki anlamda önemli düşüşlere sebep olmuşlardır. Söz konusu enzimlerin hücrede üstlenmiş oldukları fonksiyonlara ve bu enzimler hakkında elde edilen bilgilere kısaca göz atacak olursak;

Katalaz (CAT) yüksek miktardaki H_2O_2 'nin iki elektronunu kullanarak su (H_2O) ve oksijene (O_2) indirgenmesini katalizleyen demir porfirin içeren tetramerik ve yüksek molekül ağırlığına sahip bir enzimdir (McClung 1997; Chaudiere and Ferrari 1999). Aynı zamanda katalaz (CAT), düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite gösterebilir (Chaudiere and Ferrari 1999).



Peroksidaz (POD), hidrojen (H^+) vericisi olarak birçok organik ve inorganik substratı kullanarak H_2O_2 'yi temizler ve hidrojen vericisi olarak kullandıkları substrata göre isimlendirilirler. POD aktivitesi, dış kaynaklı sinyallere ve zor çevre koşullarına cevap olarak hızlı bir şekilde değişebilir. Çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahip olan Peroksidaz (POD), bitkilerde yüksek seviyede bulunur. POD, elverişsiz çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve bitki hücresinin en önemli koruyucu enzimlerinden birisidir (Bakardjieva and Christov 1996). POD' lar aşağıdaki reaksiyonu katalizlerler.



SOD sayesinde hücrede oluşan süperoksiti uzaklaştırılır ve Haber-Weiss reaksiyonu ile hidroksil radikalının ($\text{OH}^\cdot$) oluşum riski azaltılır. SOD, süperoksit anyonlarını ($\text{O}_2^{\cdot-}$) uzaklaştırmasına rağmen toksik bir oksijen türevi olan ($\text{O}_2^{\cdot-}$)'yi H_2O_2 'ye dönüştürür (Mehlhorn 1996). Bu reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 , fotosentezin güçlü bir inhibitörüdür ve kloroplast fonksiyonu için risk oluşturur. Bu toksik ürün de peroksidazlar tarafından temizlenir.

Bu bilgiler ışığında, hücrede oluşan oksidant maddenin türüne ve miktarına bağlı olarak, hücrenin bu oksidantların toksik etkilerini bertaraf edebilmek için antioksidatif mekanizmasını harekete geçirdiği ve hangi oksidant maddelerden daha fazla oluşmakta ise, o oksidantı yok edecek antioksidantları daha fazla oranda sentezini sağladığını düşünebiliriz. Bu araştırmada bizim fasulye bitkisine üşüme stresi uygulamadan birkaç saat öncesinde yukarıda belirttiğimiz kimyasal maddeleri uygulamamızın asıl amacı, bu maddelerin mitokondriyal ETS'yi bloklayarak, ETS'ye NADH ve FADH₂ tarafından verilen elektronların kısa yoldan O₂'e aktarılmasını sağlayan alternative solunum yolunun teşvik edilmesini sağlamak ve bu sayede üşüme sıcaklıkları nedeniyle mitokondri krista zarlarında meydana gelmekte olan hasar nedeniyle ETS boyunca ilerleyen elektronların normal doğrultusundan saparak çevreye saçılma oranını düşürmek, yani oksidant maddelerin oluşum sıklığını azaltmak ve böylece öncelikle mitokondri içinde ve sonrasında sitoplazmada oluşabilecek olan oksidatif hasarı henüz oluşmadan bertaraf edebilmek ve böylece üşüme stresine karşı hassas olan fasulye bitkisinin direnç mekanizmasına bir nebze de olsa katkı yapıp yapamayacağımızı belirlemektir. Bu amaçla uygulamış olduğumuz alternative solunum yolunu aktive edici bu maddelerin (Antimycin A, KCN, NaF, NO, CO) CAT, POD ve SOD aktivitelerini bazı konsantrasyonlarda istatistiki anlamda önemli düzeyde düşürdüğünü ve hedeflediğimiz bu etkiyi gösterdiklerini belirlemiş olduk. Örnek olarak; **CAT için:** soğukla birlikte uygulanan Antimycin A uygulanan tüm konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2, 3 ve 4 mM), 1 ve 3 mM KCN uygulamalarında, 15 dk'lık CO uygulamasında, 15 mM NO uygulamasında CAT aktivitelerinin soğuk kontrole nispetle azaldığı belirlenmiş, **POD için:** 1 ve 3 mM KCN, 5, 15 ve 20 dk'lık CO, Antimycin A'nın uygulanan tüm konsantrasyonları (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4 mM), NaF'nin uygulanan tüm konsantrasyonları (5, 10, 15 ve 20 mM), 10, 15 ve 20 mM NO, **SOD için:** 5, 10 ve 15 mM NO. Bu araştırmada ayrıca uygulamış olduğumuz SA ve ABA'nın da alternative solunum yolunu aktive ettikleri iyi bilinmektedir (Kocaçalışkan, 2003; Taiz ve Zeiger; 2008). Bu maddelerin hangi konsantrasyonlarda optimum etkiye sahip olduğu bilinen sadece bir konsantrasyonda uygulamaları yapılmış ve merakımızı gidermek için de CaCl₂'yi de katarak kombinasyon halinde nasıl bir etki oluşturacakları test edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, soğuk + SA, ABA, CaCl₂, uygulamaları tek başlarına uygulandıklarında CAT aktivitesinin soğuk kontrole nispetle daha da artmasına yol

açmış, ancak kombinasyon halinde iken (soğuk+SA+ABA+CaCl₂) diğer tüm uygulamalar içinde en düşük CAT aktivitesinin oluşumuna yol açtığı belirlenmiştir. **SOD için:** ABA ve CaCl₂ uygulamaları SOD aktivitesini daha da azaltırken, SA+ABA+CaCl₂ uygulamasında ise kontrolde ki kadar yüksek SOD değerleri kaydedilmiştir. **POD için:** Kontrole nazaran soğuk uygulamasında POD aktivitesinde artış gözlenmişken, SA, ABA, CaCl₂, (SA+ABA+ CaCl₂) uygulamalarında POD aktivitesinin daha da arttığı belirlenmiştir. Deneyler sırasında yapılan gözlemler ve elde edilen bu bulgulara genel olarak bakıldığında, soğuğa karşı dirençte olumlu etkileri olduğu iyi bilinen ABA, SA ve CaCl₂'nin gerek tek tek ve gerekse kombine olarak uygulanmaları halinde antioksidant mekanizma üzerinde farklı yönlerde etkili olabildiklerini, fakat her iki durumda da bitkinin soğuğa karşı direncini artırmada etkili olabildiklerini söylemek mümkün gözükmemektedir.

Yaptığımız MDA içeriği testlerinde, üşüme sınır sıcaklığı uygulamasının fasulye bitki yapraklarındaki MDA içeriğini istatistiki anlamda artırıcı yönde etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgu, önceki araştırma sonuçlarıyla paralellik arz etmekte örnek olup, bu durum şöyle izah edilmektedir. Stres şartlarında hücrede serbest radikallerin (süperoksid anyonu, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali) yoğunluğunda artışlar oluşmakta ve antioksidatif mekanizmaların yeterli gelememesiyle bu radikaller hücre ve organellerde ki diğer biyomoleküllere etki ettiği gibi aynı zamanda gerek hücre zarı ve gerekse organel zarlarındaki lipidleri oksidatif hasara uğratarak zar yapılarının bozulmasına yol açmaktadır. İşte bu olaya “Lipid Peroksidasyonu” adı verilmekte olup, Bu olay sonucunda, doymamış yağ asitlerinin peroksidasyon ürünü olarak ortaya çıkan Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi, hücredeki lipid peroksidasyon yoğunluğu göstermekte, yani hücredeki zarların gördüğü hasarın ne ölçüde olduğunu dolaylı yoldan anlamamıza imkan vermektedir (de Azevedo Neto *et al.* 2006; Posmyk *et al.* 2005). Bu literatür bilgileri hareketle, üşüme sınır sıcaklığı uygulanan fasulye bitki yapraklarında MDA içeriğinde artış olmasını izah etmek oldukça kolay olacaktır; Üşüme sınır sıcaklığını alan bitkilerin hücre ve organel zarlarının sıvı-jelden, katı-jele geçiş olduğu ve zarlarda ki bu katılaşmanın aynı zamanda kırılma ve çatlamalara da yol açtığı iyi bilinmektedir.

Özellikle mitokondri ve kloroplast zarlarında söz konusu hasarların oluşması, hücrede normalden daha fazla oksidant maddelerin oluşumuna yol açmakta, oluşan bu oksidantlar da hücre mevcut olan tüm biyomolekülleri etkiledikleri gibi hücre ve organel zarlarında ki doymamış yağ asitlerini de oksitlemekte ve böylece normal şartlardan daha fazla MDA oluşumuna neden olduğu anlaşılmaktadır. Ancak Alternatif solunum yolunu aktive ettiği bilinen maddelerin (KCN, CO, Antimycin A, SA ve ABA) genel olarak uyguladığımız konsantrasyonların birçoğunda, bitkiye üşüme stresiyle birlikte verilmesi halinde, fasulye yapraklarında oluşan MDA içeriğinde azalmalar belirlenmiştir. Biz bu durumun şöyle izah edilebileceğini düşünüyoruz: Fasulye fidelerine uygulamış olduğumuz bu maddeler, mitokondriyal ETS'yi inhibe etmekte, alternative oksidazın aktifleşerek, ETS'ye giren elektronların Krista boyunca ilerleyerek değil de kestirmeden oksijene aktarılmasını sağlamaktadırlar. Üşüme sınır sıcaklığı alan bitki hücre ve organel zarlarında kırılma ve çatlama olabileceği yukarıda belirtilmişti. Söz konusu ETS'nin vuku bulduğu zarlarda bu hasar oluşmuş ise, bu durumda elektronların en kısa yoldan oksijene ulaştırılmaları halinde, hücrede oluşabilecek çok daha büyük bir oksidatif hasarın önüne geçilmiş olur. Nitekim uygulamış olduğumuz KCN, CO, Antimycin A, SA ve ABA'nın MDA içeriği üzerinde azaltıcı etki yapması, bu maddelerin hücrede soğğun zarlarda yaptığı hasar nedeniyle reaktif oksijen türlerinin oluşum hızının yavaşlatıldığı, daha az oranda ki bu oksidantların da hücre zarlarındaki doymamış lipidlerle nispeten daha az oranda etkileştikleri ve bu sayede daha az MDA oluşumunu sağladıkları şeklinde izah edilebilir.

KAYNAKLAR

- Acar, O.: "Kuraga Dayanıklı Bazı Arpa (*Hordeum spp.*) çeşitlerinde süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitelerinin Araştırılması", Doktora Tezi, Ege Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye, (1999).
- Aebi, H., 1974. Catalase, in: H.U. Bergmeyer (Ed), Methods of enzymatic analysis, Varley, Chemie/ Academic Pres, 680 p, Weinheim/ New York.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya.
- Allen, D.J., & Ort, D. R. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. Trends In Plant Science. 6(1):36-41
- Alscher, R.G., Donahue, J.L., Cramer, C., 1997, Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells, Physiol. Plantarum, 100, 224- 233.
- Anlarsal, E., 2005. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Yemelik Tane Baklagiller Ders Notları
- 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.
- Antikainen, M., 1996. Cold Acclimation in Winter Rye (*Secale cereale* L.): identification and characterization of protein involved in freezing tolerance. Painasolama OY. Turku.
- Antikainen, M. and Griffith M., 1997. Antifreeze proteins accumulation in freezing tolerant cereals. Physiol. Plant. 99, 423-432.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology, 55: 373-399.
- Aroca, R., Irigoyen, J.J., Sanchez-diaz, M., 2001. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against oxidative stress during chilling and subsequent recovery in two maize varieties differing in chilling sensitivity. Plant Sci., 161: 719-726.
- Agarwal, S. and Pandey V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. Biologia Plantarum, 48(4), 555-560.
- Agarwal, S., Sairam R.K., Srivastava G.C. and Meena R.C., 2005. Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. Biologia Plantarum, 49(4), 541-550.
- Asada, K., 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue. In: Foyer, C.H., Mullineaux, P.M. (Eds.), Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 77-104.
- Asada, K., 1999, The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 50, 601-639.
- Asada, K., 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. Philos T Ror Soc. B. 355: 1419-1430.
- Ashraf, M., Zafar, Z.U., Cheema, Z.A., 1994. Effect of Low Potassium Regimes on Some Salt and Grougthtolerant Lines of Pearl Millet. Phyton. Horn., 34 (2):

- 219-227.
- Atıcı, Ö. and Nalbantoğlu B., 2003. Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry*, (64), 1187-1196
- Atıcı, Ö., Nalbantoğlu B., 1999a. Effect of apoplastic proteins on freezing tolerance in leaves. *Phytochemistry*, (50), 755-761.
- Atıcı, Ö. and Nalbantoğlu B. 1999b. Apoplastic proteins associated with the cold acclimation process in leaves. *Bio-Sci. Res. Bull*, (15), 55-60.
- Bakardjieva, N., and Christov, K., 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from moses (*Mnium* sp.) and ferns (*Polydium vulgare*) to high temperature. *Can. J. Bot.*, (74), 1665-1670.
- Bakht, J., Bano, A., Dominy, P., 2006, The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (*Cicer arietinum*) cold tolerans. II. Effects on plasma membrane structure and function, *J. Exp. Bot.*, 57, 3707-3715.
- Banci, L., 1997. Structural properties of peroxidase. *J. Biotech.*, (53), 253-263.
- Bartoli, C.G., Gómez, F., Martínez, D.E., and Guamet, J.J., 2004. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Journal of Experimental Botany*, 55: 1663-1669.
- Becana, M., Dalton, D.A., Moran, J.F., Iturbe- Ormaetxe, I., Matamoros, M.A., Rubio, M.C., 2000. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. *Physiologia Plantarum*, 109: 372-81.
- Beak, K.-H. and Skinner D. Z., 2003. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Science*, (165), 1221-1227.
- Baet, S.H., Kwan I.S., Part T.I., Yun S.J., Kim J.K. and Chai K.G., 2000. Activities and isozyme profiles of antioxidant enzymes in intercellular compartment of overwintering barley leaves. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 33(5), 385-390.
- Bergmeyer, J., and Grabl, M., 1983. *Methods of Enzymatik Analysis* (Third Edition), 190-302, Germany.
- Bishop, D.L., 2002. Gene expression of vakuolar peroxidase with stress-induced pathogenesis in wheat sheats. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, (61), 65-71.
- Boyer, J.S., 1982. Plant productivity and environment. *Science*, (218), 443-48.
- Bolwell, G.P. and Wojtaszek, P., 1997, Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence-a broad perspective, *Physiol. Mol. Plant P.*, 51, 347-366.
- Bowler, C., Van Maontague, M., Inze, D., 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (43), 83-116.
- Burris, R.H., 1960. Hydroperoxidase (peroxidase and catalase). In: Ruhland W.ed. *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. 12. Berlin, Springer-Verlag, 365-400.
- Bruggemann, W., Dauborn, B. and Klaucke, S. 1995. Chilling sensitivity of photosynthesis: ecophysiological studies in two *Lycopersicon* species of different chilling tolerance. *Acta Physiol. Plant* 17: 113-122.
- Braidot, E., Petrucci, E., Vianello, A., Macri, F., 1999. Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. *FEBS Letters*, 451: 347-50.

- Bräutigam, A., Gagneul, D., Weber, A.P., 2007. High-throughput colorimetric method for the parallel assay of glyoxylic acid and ammonium in a single extract. *Analytic Biochemistry*, 362: 151–153
- Brouwer, R., 1981. Coordination of growth phenomena within a rootsystem of intact maize plants. *Plant and Soil*, 63: 65–72.
- Browse, J.A., Moller, I.M., Rasmusson, A.G., 2006. Respiration and lipid metabolism. In L Taiz, E Zeiger, eds, *Plant physiology*, Ed 4. Sinauer Associates Inc., Sunderland pp. 253-288
- Browse, J. and Xin, Z., 2001, Temperature sensing and cold acclimation, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 241-246.
- Breusegem, F.V., Vranova, E., Dat, J.F., Inze, D., 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci*, (161), 405–414. Burnie, D.: “Bitkiler” Anksiklopedi Yayınları, 4stanbul, Türkiye, (1989) 39.
- Cai, Z.Q., Chen Y.J., Guo Y.H. and Cao K.F., 2005. Responses of two field-grown coffee species to drought and re-hydration. *Photosynthetica*, 43 (2), 187-193.
- Cakmak, I., 2000. Role of zinc in protecting plant cells from reactive oxygen species. *New Phytologist* 146: 185-205.
- Chanda , S.V., and Singh, Y.D., 1997. Changes in peroxidase and IAA oxidase activities during wheat grain development. *Plant Physiol. Biochem.*, (35), 245- 250.
- Chaudiere, J., and Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem. Toxicol.*, (37), 949-962.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiology Reviews*, 59:527–605.
- Chang, M.Y., Chen, S.L., Lee C.F., and Chen Y.M., 2001. Cold acclimation and root temperature protection from chilling injury in chilling-sensitive mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42:53, 60.
- Cheng, H.Y. and Song, S.Q., 2006, Species and organ diversity in the effect of hydrogen peroxide on superoxide dismutase activity in vitro, *Journal of Integrative Plant Biology*, 48 (6), 672-678.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu., J.K., 2006, Gene regulation during cold acclimation in plants, *Physiol. Plantarum*, 126, 52-61.
- Choi, S.M., Jeong, S.W., Jeong, W.J., Kwon, S.Y, Chow, W.S., Park, Y., 2002, Chloroplast Cu/Zn-superoxide dismutase is a highly sensitive site in cucumber leaves chilled in the light, *Planta*, 216, 315-324.
- Cleland, F.C. and Ajami A., 1974. Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honey dew as being salicylic acid. *Plant Physiol.*, (54), 904-906.
- Clifton, R., Millar, A.H., Whelan, J., 2006. Alternative oxidases in Arabidopsis: A comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochimica Biophysica Acta*, 1757: 730-741.
- Close, T.J., 1997. Dehydrins: a commonality in response of plants to dehydrations and low temperature. *Physiol. Plant.* (100), 291-296.
- Cramer, M.D., Lewis, O.A.M., 1993. The Influence of NO_3^- and NH_4^+ Nutrition on the Gas-Exchange Characteristics of the Roots of Wheat (*Triticum-Aestivum*) and Maize (*Zea-Mays*) Plants. *Annals of Botany*, 72: 37-46.

- Considine M.J., Holtzapffel R.C., Day, D.A., Whelan, J. and Millar A.H. (2002) Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol.* 129: 949–953.
- Çakmak, I. and Horst W. J., 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*), *Physiologia Plantarum*, (83), 463-468.
- Çakmak,T., 2010. Bitki solunum zinciri: Hücresel redoksün inorganik azot kaynaklarıyla düzenlenmesi ve alternatif oksidazın redoks yanıtları. Doktora Tezi, Atatürk üniversitesi fen bilimleri enstitüsü, Erzurum.
- Çınar, S., 2005. Mangan ve Demir Stresi Uygulanmış Roka (*Eruca sativa*) Bitkisinde Bazı Antioksidan Enzim Aktivitesindeki ve Lipid Peroksidasyon Düzeylerindeki Değişiminin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H., and Scott, I.M., 1998. Parallel changes in H_2O_2 and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol.*, 116, 1351-1357.
- Davidson, J.F., Schiestl, R.H., 2001, Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell Biol.*, 21, 8483-8489.
- Daşgan, h.y., koç, s., ekici,b., aktaş, h., abak, k., 2006. Bazı fasulye ve börülce Genotiplerinin Tuz Stresine Tepkileri Alatarım 2006, 5 (1): 23-31
- De Azevedo Neto, A.D., Prisco J.T., Enéas-Filho J., de Abreu C.E.B., Gomes- Filho E., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes, *Environ. Exp. Bot.*, (56), 87–94.
- De Santis, A., Landi, P. and Genchi, G. (1999) Changes of mitochondrial properties in maize seedlings associated with selection for germination at low temperature. Fatty acid composition, cytochrome c oxidase, and adenine nucleotide translocase activities. *Plant Physiol.* 119: 743–754.
- De Vos, C.H.R., Vooijs R., Schat H. and Ernst W.H.O., 1989. Copper induced damage to permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*, (135), 165-169.
- De Vos, C.H.R., Schat H., Waal M. A. M., Vooijs R. and Ernst W.H.O., 1991. Increased resistance to copper induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*, *Physiol. Plant.*, (82), 523-528.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. ve Thorpe, T.A., 1981. Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dimutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32: 93-101.
- Ding, CK., Wang C.Y., Gross KC. and Smith D.L., 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of parhogenesis-related-protein genes and increases resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* (214), 895-901.
- Djajanegara, I., Finnegan, P.M., Mathieu, C., McCabe, T., Whelan, J., Day, D.A., 2002. Regulation of alternative oxidase gene expression in soybean. *Plant Molecular Biology*, 50: 735–742.
- Doğan, N. 2006. Su stresi altındaki fasulye(*Phaseolus vulgaris L.*) bitkisinin iyon alım mekanizmasının araştırılması.Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Dutilleul, C., Garmier, M., Noctor, G., Mathieu, C., Chetrit, O., Foyer, C.H., Depaepe, R., 2003. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell*, 15: 1212-1226.
- Durner, J., Shah J., and Klessig D.F., 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 2(7), 266-274.
- Eberhard, S., Doubrova N., Marta V., Mohnen D., Southwick A., Darviell A. and Albersheim P., 1989. Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell layer explant morphogenesis. *Plant Cell*, (1), 747-755.
- Elthon, T.E., Nickels, R.L. and McIntosh, L. (1989) Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* 89: 1311–1317.
- Esim, N., 2011. Nitrik oksitin mısırdá (*Zea mays*) düşük sıcaklık stresitoleransı üzerine etkisi. Doktratezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Edwads, R., Blount, J.W., Dixon, R.A., 1991. Glutation and elicitation of the phytoalexin response in legume cell cultures. *Planta* 184:403-409.
- Ewart, K.V., Lin Q. and Hew C.L., 1999. Structures funtion and evulation antifreeze proteins. *CMLS*, (55), 271-283.
- Eyidoğan, F.D., Öktem H.A., Yücel, M., 2003. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. *Acta Physiologia Plantarum*, 25, 263-269.
- Fao, 2009. Faostat <http://faostat.fao.org>
- Farooq, M., Aziz T., Basra S. M. A., Cheema M. A. and Rehman H., 2008. Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. *J. Agronomy and Crop Science*, (194), 161–168.
- Fernie, A.R., Carrari, F., Sweetlove, L.J., 2004. Respiratory metabolism: Glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 254-261.
- Fennell, A. and Markhart, A.H., 1998, Rapid acclimation of root hydraulic conductivity to low temperature, *J. Exp. Bot.*, 49, 879-884.
- Feierabend, J., Schaan, C., Hertwig, B., 1992. Photoinactivation of Catalase Occurs Under Both High and Low Temperature Stress Conditions and Accopanies Photoinhibition of Photosystem II. *Plant Physiol.*, (100), 1554-1561.
- Fiorani, F., Umbach, A.L., Siedow, J.N., 2005. The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of Arabidopsis aox1a transgenic plants. *Plant Physiology*, 139: 1795-1805.
- Finnegan, P.M., Whelan, J., Millar, A.H., Zhang, Q.S., Smith, M.K., Wiskich, J.T., Day, D.A., 1997. Differential expression of the multigene family encoding the soyabean mitochondrial alternative oxidase. *Plant Physiology*, 114: 455-466.
- Finnegan, P.M., Whelan, J., Millar, A.H., Zhang, Q.S., Smith, M.K., Wiskich, J.T., Day, D.A., 1997. Differential expression of the multigene family encoding the soyabean mitochondrial alternative oxidase. *Plant Physiology*, 114: 455-466.
- Firat, B.: “Bitki Nasıl Beslenir” Atlas Kitabevi, Konya, (1998) 213-278.
- Foyer, C.H., Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133: 21–25.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J., 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 92: 696–717.

- Foyer, C.H. and Noctor, G., 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria, *Physiologia Plantarum*, 119: 355-364.
- Foyer, C.H. and Noctor, G., 2005, Oxidant and antioxidant signalling in plants: are-evaluation of the concept of oxidative stress in physiological context, *Plant Cell Environ.*, 28, 1056-1071.
- Fowler, S. and Thomashow, M.F., 2002, Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway, *Plant Cell*, 14, 1675-1690.
- Fridovich, L., 1986. Biological Effect of Superoxide Radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, (247), 1-11.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, (64), 97-112.
- Gabor, K., Ballmoos, P. V., & Brunold, C. 2001. Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling- induced injury. *Plant Physiology*. 127:1147-1156
- Gaspar, T., Penel, C., Hagege, D., Greppin, H., 1991. Peroxidases in Plant Growth Differentiation and Development Processes. Univ. M. Curie-Sklodowska, Lublin, Poland and Univ., Geneva, Switzerland. Fridovich 1986;
- Gechev, T., Gadjev I., Breusegem, F. V., Inze, D., Dukiandjiev, S., Taneve, V., Minkov, I., 2002. Hydrogen peroxide protect tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *CMLS*, (59), 708-714.
- Genişel, M., 2010. Kemik tozu solüsyonu, CaCl₂ ve IAA uygulamalarının tuz stresi altındaki fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin fizyolojik parametreleri üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Givan, C.V., 1999. Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress. *Biology Reviews*, 74: 277–309.
- Graham, P.H., Ranalli, P., 1997. Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Field Crops Res.* 53; 131-146.
- Gray, G.R., Villarimo, A.R., Whithead, C.L., McIntosh, L., 2004. Transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants with increased expression levels of mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase: Evidence implicating this enzyme in the redox activation of the alternativ oxidase. *Plant Cell Physiology*, 45:1413-1425.
- Greene, R., 2002. Oxidative Stress and Acclimation Mechanisms in Plants. *The Arabidopsis Book*, BioOne Publishers, Washington, pp. 1–20.
- 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.
- Gökmen, Ö., 2006. Domateste Soğuk Strsinin Antioksidatif Mekanizmalar Yönünden Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana
- Gupta, K.J., Zabalza, A., van Dongen, J.T., 2009. Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiologia Plantarum*, 137: 383–391

- Guo, S., Brueck, H., and Sattelmacher, B. 2002. Effects of supplied nitrogen form on growth and water uptake of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Plant and Soil*, 239: 267–275.
- Guo, Z., Ou, W., Lu S., Zhong Q., 2006. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiol. Biochem.*, (44), 828-836.
- Guy, C.L. and Li, Q.B., 1998, The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family, *Plant Cell*, 10, 539-556.
- 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.
- Halliwell, B., 1984. Toxic Effects of Oxygen on Plant Tissues, In: *Chloroplast Metabolism, The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells*. Oxford Press, Oxford. 180-206.
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiology*, 141: 312-322.
- Hagar, H., Udea, N., Shah, S.V., 1996, Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK1 cells, *Am. J. Physiol.*, 271, F209- F215.
- Hansen, J.M., Go, Y.M. and Jones, D.P., 2006. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46: 215-234.
- Hernandez, J.A., Ferrer M.A., Jimenez A., Barcelo A.R. and Sevilla F., 2001. Antioxidant systems and O_2^- / H_2O_2 production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*, (127), 817-831.
- Hernández-Nistal, J., Dopico, B., Labrador, E., 2002, Cold and salt stress regulates the expression and activity of a chickpea cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase, *Plant Sci.*, 163, 507-514.
- He, Y., Liu, Y., Cao, W., Huai, M., Xu, B., and Huang, B. 2005. Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in *Kentucky bluegrass*. *Crop Sci.*, 45, 988 – 995.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 25, 189-198.
- Hoefnagel, M.H.N., Millar, A.H., Wiskich, J.T., Day, D.A., 1995. Cytochrome and alternative respiratory pathways compete for electrons in the presence of pyruvate in soybean mitochondria. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 318:394–400.
- Hon, W-C., Griffith M., Chong P., Yang D.S.C., 1994. Extraction and isolation of antifreeze protein from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiol.*, (104), 971-980.
- Hon, W-C., Griffith M., Mlynarz A., Kwok Y.K., Yang D.S.C., 1995. Antifreeze proteins in winter rye leaves are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.*, (109), 879-889.

- Horvath E., Janda T., Szalai G. and Paldi E., 2002. In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. *Plant Sci.*, (163), 1129-1135.
- Hutchison, r.s., groom, q. And ort, d.r., 2000. Differential effects of Chilling induced photooxidation on the redox regulation of photosynthetic Enzymes. *Biochemistry* 39: 6679-6688
- Hull, M.R., Long, S.P., Jahnke, L.S., 1997, Instantaneous and developmental effects of low temperature on the catalytic properties of antioxidant enzymes in two *Zea* species, *Aust. J. Plant Physiol.*, 24, 337-343.
- Igamberdiev, A.U., Gardeström, P., 2003. Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. *Biochimica Biophysica et Acta*, 1606: 117-125.
- Inze, D. and Van Montagu, M. 1995. Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 153-158.
- Ito, Y., Saisho, D., Nakazono, M., Tsutsumi, N., Hiari, A., 1997. Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in rice are increased by low temperature. *Gene*, 203: 121-129
- Janda, T., Szalai, G. Tari, I and Paldi, E. (1999). Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208:175-180.
- Janda, T., Szalai G., Rios-Gonzales K., Veisa O. and Paldi E., 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science*, (164), 301-306.
- Jarillo, J.A., Capel J., Leyva A., Martinez-Zapater J.M., Salinas J., 1994. Two related lowtemperature- inducible genes of *Arabidopsis* encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. *Plant Mol. Biol.* 25, 693-704.
- Kadioğlu, A., 2007. Bitki Fizyolojisi . 406, 407 s., Karadeniz Teknik Üniversitesi. Trabzon.
- Kaminska-Rozek, E., Pukacki P.M., 2005. Effect of freezing desiccation on cold hardiness, ros, membrane lipid levels and antioxidant status in spruce seedlings. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 74(3), 218-228.
- Kang, H.M., Saltveit M.E., 2001. Activity of enzymatic antioxidant defence systems in chilled and heat shocked cucumber seedlings radicles. *Physiol. Plant.* 113, 548- 556.
- Kang, H.M., Saltveit M.E., 2002. Antioxidant enzymes and DPPH-radical scavenging activity in chilled and heat shocked rice (*Oryza sativa* L.) seedlings radicles. *J. Agric. Food Chem.* 50, 513-518.
- Kang, G., Wang C., Sun G., Wang Z., 2003. Salicylic acid changes activities of H₂O₂ metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. *Environ. Exp. Bot.*, (00), 1-7.
- Kaya, E., 2011. Erken bitki gelişme aşamasında kuraklık ve tuzluluk streslerine tolerans bakımından fasulye genotiplerinin taraması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe bitkileri Anabilim dalı, Adana.

- Keleş, Y., Öncel I., 2002. Perponse of antioxidative defence system to temparature and water stress combinations in wheat seedlings. *Plant Sci.* 163, 783-790.
- Kerby, K., and Somerville, S.C., 1992. Purification of an infection-related, extracellular peroxidase from barley. *Plant Physiol.*, (100), 397-402.
- Kiara D.V., & Roy, D.N. 1999. Oxidative stress and antioxidative defense with an emphasis on plants antioxidants. *Environ.Rev.* 7:31-51
- Kim, K.Y., Kwon, S.Y., Lee, H.S., Hur, Y., Bang, C.W., Choi, K.S., Kwak, S.S., 2000. Differantial expression of four sweet potato peroxidase genes in respons to abscisic acid and ethaphon. *Phytochemistry*, (54), 19-22.
- Kocaçalışkan, İ., 2008. Bitki Fizyolojisi. 38, 219, 220 s., Dumlupınar Üniversitesi. Kütahya.
- Kornyeyev, D., Logan B.A., Payton P., Allen R.D. and Holaday A.S., 2001. Enhanced photochemical light utilization and decrease chilling-induced photoinhibition of photosystem II in cotton overexpressing genes encoding chloroplast-targeted antioxidant enzymes. *Physiologia Plantarum*, (113), 323-331.
- Kratsch, H.A. and Wise, R.R., 2000, The ultrastructure of chilling stress, *Plant Cell Environ.*, 23, 337-350.
- Kronfuss, G., Wieser G., Havranek W.M., and Polle A., 1996. Effects of ozone and mild drought stress on total and apoplastic guaiacol and lipid peroxidation in current year needles of young Norway Spruce (*Picea abies* L., Karst). *J. Plant Physiol.* 148, 203-206.
- Kuru, H.İ., 2007. Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Kuşvuran, Ş., 2010. Kavunlarda Kuraklık ve Tuzluluğa Toleransın Fizyolojik Mekanizmaları Arasındaki Bağlantılar Çukurova Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü,DoktrTezi 356 sayfa, Adana
- Laloi, C., Rayanpuram, N., Chartier, Y., Grienberger, J.M., Bonnard, G., Meyer, Y., 2001. Identification and characterization of mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 14144-14149.
- Lambers, H., 1982. Cyanide-resistant respiration: a non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. *Physiologia Plantarumm*,55:478–85.
- Lasa, B., Frechilla, S., Aparicio-Tejo, P.M., Lamsfus, C., 2002. Alternative pathway respiration is associated with ammonium ion sensitivity in spinach and pea plants. *Plant Growth Regulation*, 37: 49–55.
- Lee, D.H. and Lee, C.B., 2000, Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays, *Plant Sci.*, 159, 75-85.
- Lee, T.M., and Lin Y.H., 1996a. Peroxidase activity in ethylene-induced rice (*Oryza sativa* L.) coleoptil elongation. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 37(4), 239-245.
- Lee, T.M., and Lin, Y.H., 1996b. Peroxidase activity in ethylene,ABA, or MeJA, treat rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, (37), 201-207. Chanda and Singh 1997;
- Leng, P., Itamura, H., Yamamura, H., Deng, X.M., 2000, Anthocyanin accumulation in apple and peach shoots during cold acclimation, *Scientia Horticulturae*, 83, 43-50.

- Leja, M., Mareczek A., Ben J., 2003. Antioxidant properties of two apple cultivars during long-term storage. *Food Chem.* (80), 303-307.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., *et al.* 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186: 464–478.
- Liu, Y.J., Norberg, F.E.B., Szilagyi, A., De Paepe, R., Åkerlund, H.E., Rasmusson, A.G., 2008. The mitochondrial external NADPH dehydrogenase modulates the leaf NADPH/NADP⁽⁺⁾ ratio in transgenic *Nicotiana sylvestris*. *Plant and Cell Physiology*, 49: 251-263.
- Liu, Y., Jiang, H., Zhao, Z., and An, L., 2010. Nitric oxide synthase like activity-dependent nitric oxide production protects against chilling induced oxidative damage in *Chorispora bungeana* suspension cultured cells. *Plant physiology and Biochemistry*. 48, 936-944.
- Lin, C.C. and Koa C.H., 2000. Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, (30), 151-155.
- Lin, C.C., and Kao C.H., 2001. Absciscic acid induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Science*, (160), 323-329.
- Lin, K.H., Pai F.H., Hwang S.Y., Lo H.F., 2006. Pre-treating paclobutrazol enhanced chilling tolerance of sweet potato. *Plant Growth Regul.*, (49), 249-262.
- Lukatkin, A.S., 2002. Contribution of oxidative stress to the development of cold-induced damage to leaves of chilling-sensitive plants: 2. the activity of antioxidant enzymes during plant chilling. *Russ. J. Plant Physiol.*, 49, 782-788.
- Lynch, D. V. and Steponkus P. L., 1987. Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv. Puma). *Plant Physiology*, (83), 761-767.
- Madakbaş, s.h., dolar, s., bayraktar, h., ellialtıoğlu, ş., orta karadeniz bölgesi'nde taze fasulye yetiştirilen alanlarda görülen antraknoz hastalığı etmenine (*colletotrichum lindemuthianum* (sacc&magnus) lambs.scrib) ait ırkların tesbiti ve bazı fasulye çeşitlerinin hastalığa dayanım durumlarının belirlenmesi üzerinde araştırmalar. Vı. Sebze tarımı sempozyumu, 19-22 eylül, kahramanmaraş, bildiriler, s:138-142.
- Mahajan, S. and Tuteja, N., 2005, Cold, salinity and drought stresses: an overview, *Arch. Biochem. Biophys.*, 444, 139-158.
- Marentez, E., Griffith M., Mlynarz A. And Brus R., 1993. Protein accumulate in the apoplast of winter rye leaves during cold acclimation. *Physiol. Plant.* 87, 499-507.
- Martina, R., Steipe B., Zenk M.H., 1995. Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. *FEBS Letters* 377, 175-180.
- Maxwell, D.P., Wang, Y., McIntosh, L., 1999, The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96: 12246-12251
- Marschner, h., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, 657- 680.
- Mauch-Mani, B. and Metraux J.P., 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, (82), 535-540.
- McCabe, T.C., Finnegan, P.M., Millar, A.H., Day, D.A., Whelan, J., 1998. Differential expression of alternative oxidase genes in soybean cotyledons during postgerminative development. *Plant Physiology*, 118: 675-682

- McClung, C.R., 1997. Regulation of catalases in Arabidopsis. *Free Radical Bio. Med.*, (23), 489-496.
- McDonald, A.E. and Vanlerberghe, G.C. 2006. The organization and control of plant mitochondrial metabolism. In: *Control of Primary Metabolism in Plants*. pp. 290–324. Plaxton, W.C. and McManus, M.T., Eds., *Annual Plant Reviews*, volume 22, Blackwell Publishing, Oxford.
- Meeuse, B.J.D., 1975. Thermogenic respiration in aroids. *Annual Reviews in Plant Physiology*, 26: 117-126
- Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H.G., Foyer, C.H., 1996. Comparison of Ascorbate- Dependent Peroxidase Activity in Horseradish Peroxidase Types I and II and in Leaf Extracts, *FEBS Letts.*, (378), 203-206.
- Minibaeva, F.V., and Gordon, L.K., 2003. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russ. J. of Plant Physiology*, 50(3), 411-416.
- Millar, A.H., Wiskich, J.T., Whelan, J., Day, D.A., 1993. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Letter*, 329: 259-262
- Millenaar, F.F., Lambers, H., 2003. The alternative oxidase: In vivo regulation and function. *Plant Biology*, 5: 2-15
- Milyutina, I. L., Sudachkova N. E., Romanova L.I. and Semenova G.P., 2008. Effect of Cold Stress in the Rhizosphere on the Activity of Antioxidant Enzymes in the Tissues of *Pinus sylvestris*. *Contemporary Problems of Ecology*, 1(4), 404–408.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*, 7: 405–410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F., 2004, Reactive oxygen gene network of plants, *Trends Plant Sci.*, 9, 490-498.
- Minibaeva, F.V., and Gordon, L.K., 2003. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russ. J. of Plant Physiology*, 50(3), 411-416.
- Molina, A., Bueno P., Marin M.C., Rodriguez-Rosales M.P., Belver A., Venema K. And Donaire J.P., 2002. Involvement of endogenous salicylic acid content, lipoxygenase and antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension cultures to NaCl. *New Phytologist*, (156), 409-415.
- Moller, I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 561–591.
- Moon, B. Y., Higashi S., Gombos Z., Murata N., 1995, Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against lowtemperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Science*, (92), 6219-6223.
- Morsy, M.R., Jouve L., Hausman J-F., Hoffmann L., Stewart J.McD., 2007. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. *J. Plant Physiol.*, 164, 157-167.
- 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 asitin arpada(*Hordeum vulgare* L.) soğuk Toleransını sağlama ve apoplastik ve simplastik Proteinler üzerine etkileri nin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22: 867–880.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J.P., 2007, Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria, *Physiol. Plantarum*, 129, 185-195.
- Nagy, K.A., Seymour, R.A., Odell, D.K., 1972. Temperature regulation by inflorescence of *Philodendron*. *Science*, 178: 1195-1196
- Nasibi, F. In 2003. Different bands of ultraviolet radiation on some parameters of oxidative stress in growing canola Valqay MS Thesis, University of Kerman.
- Nishiyama, Y., Ikeda, H., Haramaki, N., 1998. Oxidative Stress is Related to Exercisein Tolerance in Patients With Heart Failure. *Am. Heart. J.*, (135), 115.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Use of mithochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 55: 49-57
- Noctor, G., De Paepe, R., Foyer, C.H., 2007. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant Science*, 12: 125–134
- O’Kane, D., Gill, V., Boyd, P., Burdon, R., 1996, Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus, *Planta*, 198, 371-377.
- Otter, T., Polle A., 1997. Characterisation of acidic and basic apoplastic peroxidases from needles of Norway Spruce (*Picea abies*, L., Karsten) with respecth to lignifying substrates. *Plant Cell Physiol.* 38(5):595-602.
- Öktem, H.A., Eyidogan F., Demirba D., Bayrac A.T., Oz M.T., Ozgur E., Selcuk, F., Yucel, M., 2008. Antioxidant responses of lentil to cold and drought stres. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 17(1), 15-21.
- Padu, E., 1999. Apoplastic peroxidases, ascorbat and lignification in relation to nitrate supply in wheat stem. *J. Plant Physiol.* 154, 576- 583.
- Patykowski, J., Urbanek H., 2003. Activity of enzymes related to H₂O₂ generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, (151), 153–161.
- Palma, F., Lluch C., Iribarne C., 2009. Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Growth Regul.*, (58), 307–316.
- Pearce, R.S., 1999, Molecular analysis of acclimation to cold, *Plant Growth Regul.*, 29, 47-76.
- Pearse, I.S., Heath, K.D., Cheeseman, J.M., 2005, Biochemical and ecological characterization of two peroxidase isoenzymes from the mangrove, *Rhizophora mangle*, *Plant Cell Environ.*, 28, 612-622.
- Plaxton, W.C., 2006. Metabolic flexibility helps plants to survive stress. Web-Essay for Chapter 11 (Respiration) of the 4th Edition of *Plant Physiology*. Taiz, L. And Zeigler, E., Eds. URL: <http://www.plantphys.net/article.php?ch=e&id=124>.

- Polle, A., and Junkermann W., 1994. Inhibition of apoplastic and symplastic peroxidase activity from of Norway Spruce by the photooxidant hydroxymethyl hydroperoxide, *Plant Physiol.* 104:617-621.
- Polle, J.E.W., & Melis, A. 2003. Jin, E.S., Yokthongwattana, K., Role of the reversible xanthophyll cycle in the photosystem II damage and in *Dunaliella salina*. *Plant physiology*. 132:325-364.
- Posmyk, M.M., Bailly C., Szafranska K., Janas K.M., Corbineau F., 2005, Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings, *J. Plant Physiol.*, (162), 403-412.
- Prasad, T.K., 1997, Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings, *Plant Physiol.*, 114, 1369-1376.
- Puntarulo, S., Sanchez, R.A., Boveris, A., 1988. Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiology*, 86:626–30.
- Purvis, A.C., Shewfelt, R.L., 1993. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiologia Plantarum*, 88: 712–718.
- Purvis, A.C., Shewfelt, R.L., Gegogine, J.W., 1995, Superoxide production by mitochondria isolated from green bell pepper fruit, *Physiol. Plantarum*, 94, 743-749.
- Purvis, A.C., 1997. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 100:165–70
- Rab, A. and Saltveit, M.E., 1996, Differential chilling sensitivity in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings, *Physiol. Plantarum*, 96, 375-382.
- Raskin, I., 1992 b. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol.*, (99), 799-803.
- Raskin, I., 1992a. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (43), 439-463.
- Rasmusson, A.G., Soole, K.L., Elthon, T.E., 2004. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annual Review in Plant Biology*, 55: 23-29
- Rasmusson, A.G., Alisdair, R., Fernie and Joost T., van Dongen., 2009. Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? *Physiologia Plantarum*, 137: 371-382.
- Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Sweet, C.R., Lennon, A.M., Rauch, G.S., Siedow, J.N., 1998. Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria-identification of the cysteine residue involved in alpha-keto acid stimulation and intersubunit disulfite bond formation. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 30750-30756
- Rhoads, D.M., Subbaiah, C.C., 2007. Mitochondrial retrograde regulation in plants. *Mitochondrion*, 7: 177–194
- Ribas-Carbo, M., Taylor, N.L., Giles, L., Busquets, S., Finnegan, P. M., Day, D.A., Lambers, H., Medrano, H., Berry, J.A. and Flexas, J., 2005. Effects of water stress on respiration in soybean (*Glycine max*. L.) leaves. *Plant Physiology*, 139: 466–473.
- Rikin, A., Blumenfeld, A. ve Richmond, A.E. 1976 Chilling resistance as affected by stressing environments and abscisic acid. *Bot.Gaz.* 137:307-312
- Sala, J.M., 1998. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruit to chilling. *Postharvest Biol. and Technol.*, 20, 81-89.

- Sala, J.M., Lafunte M.T., 2000. Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold stored mandarin fruits. *Postharvest Biol. and Technol.*, 3, 255-261.
- 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.
- Sağlam, S., Çiftçi, C.Y., Khawar, K.M., Atak, M., Özcan, S., 2005. In Vitro Koşullarda Fasulye Bitkisine Dört Yapraklı Aşamada Transformasyon Çalışmaları. *Akdeniz Üniv. Ziraat Fak. Dergisi*, 18(2), 291-294.
- Saisho, D., Nambra, E., Naito, S., Tsutsumi, N., Hirai, A., Nakazono, M., 1997. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 35: 585-596
- Saltveit, M.E. and Morris, L.L., 1990, Overview of chilling injury in horticultural crops, *Chilling Injury of Horticultural Crops*, C.Y. Wang (eds), CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 3-15.
- Saltveit, M. E. 2001. Chilling injury is reduced in cucumber and rice seedlings and in tomato pericarp discs by heat-shocks applied after chilling. *Postharvest Bio. Techn.* 21: 169-177.
- Saruyama H. and Tanida M. 1995. Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and -tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.*, (109), 105–113.
- 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.
- Scandalios, J.G., 2001, Molecular responses to oxidative stress, *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*, M.J. Hawkesford and P. Buchner (eds), Kluwer Academic Publ., pp. 181-208.
- Scebba, F., Sebastiani, L., Vitagliano, C., 1998, Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation, *Physiol. Plantarum*, 104, 747-752.
- Schettel, N. L. and N. E. Balke, 1983. Plant growth response to several allelopathia chemicals. *Weed Sci.*, (31), 293-298. Scandalios, J.G., 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutase. *Plant Physiol.*, (101), 7-12.
- Setha, S., Kanlayanarat S., and Srilaong V., 2000. Changes in polyamine levels and peroxidase activity 'khakdum' (*Carica papaya* L.) under low temperature storage conditions. *Quality Assurance in Agricultural Produce* 593-598.
- Seymour, R.S., White, C.R., Gibernau, M., 2003. Environmental Biology: Heat reward for insect pollinators. *Nature.*, 426: 243-244.
- Seppanen, M.M. 2000. Characterize of freezing tolerance in *Solanum commersonii*(dun.) with special reference of the relationship between and oxidative stress. University of Helsinki department of production section of crop husbandry. 56:4-4
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K., 2001, Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray, *Plant Cell*, 13, 61-72.

- Senaratna, T., Touchhell D., Bunn E., and Dixon K., 2000. Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regul.* 30:157-161.
- Sharma, S.S., Dietz, K.J., 2008. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*, 14:43-50.
- Shim, I.S., Momose Y., Yamamoto A., Kim D.W., and Usui, K., 2003. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to a salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 39: 285-292.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000, Molecular response to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 217-223.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., 2003, Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6, 1-8.
- Siedow, J.A., and Umbach, A.L., 2000. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochimica Biophysica et Acta*, 1459: 432–439.
- Sieger, S.M., Kristensen, B.K., Robson, C.A., Amirsadeghi, S., Eng, E.W., Abdel-Mesih, A., Møller, I.M., Vanlerberghe, G.C., 2005. The role of alternative oxidase in modulating carbon use efficiency and growth during macronutrient stress in tobacco cells. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1499–1515
- Srivastava, S. Dwivedi U.N., 2001. Plant regeneration from callus of *Cuscuta reflexa*- an angiospermic parasite-and modulation of catalase and peroxidase activity by salicylic acid and naphthalene acetic acid. *Plant Physiol.* 39, 529-538.
- Simons, B.H., Millenaar, F.F., Mulder, L., Van Loon, L.C., Lambers, H., 1999. Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of *Arabidopsis* with *Pseudomonas syringae* pv tomato. *Plant Physiology*, 120: 529–538
- 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.
- Souza, I.R.P. and McAdam J.W., 2001. Gibberellic acid dwarfism effect on the growth dynamics of b73 maize (*Zea mays* L.) leaf blades; a transient increase in apoplastic peroxidase activity precedes cessation of cell elongation. *J. Exp. Bot.*, 52(361), 1673-1682.
- Spiteller, G., 2001. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, (122), 617-657.
- Stahl, W., and Sies, H., 2002. Introduction: Reactive Oxygen Species, *Research Monographs*, 1-2.
- Streb, P., Michael-Knauf, A., Feierabend, J., 1993. Preferential Photoinactivation of Catalase and Photoinhibition of Photosystem II are Common Early Symptoms under Various Osmotic and Chemical Stress Conditions. *Physiol. Plant.*, (88), 590-598.
- Streb, P., Shang W. and Feierabend J., 1999. Resistance to cold-hardened winter rye leaves (*Secale cereale* L.) to photo-oxidative stress. *Plant Cell and Environment*, 22, 1211- 1223.

- Sudhakar, C., Lakshmi A. and Giridarakumar., 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulber (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, (161), 613-619.
- Suzuki, N. and Mittler, R., 2006, Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signalling and destruction, *Physiol. Plantarum*, 126, 45-51.
- Şimsek, F., 1999. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu. *Türkiye Klinikleri J Pediatr*, 8(1), 42-47.
- Taiz, L., and Zeiger, E., Çeviri; Türkan, İ., 2008. Bitki fizyolojisi. 615 s., İzmir.
- Tamas, L.,Dudikovi, J.,Durcekove,K., Huttove, J., Mistrik, I., Zelinova,V., 2008. The impact of heavy metals on the activity of some enzymes along the barley root. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 86–91.
- Tambussi, E.A., Bartoli, G.G., Guamet, J.J., Beltrano, J., Araus, J.L., 2004, Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves, *Plant Sci.*, 167, 19-26.
- 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., 2004. Düşük sıcaklık ve salisilik asidin kışık buğday yapraklarındaki donma toleransı, oksidatif enzim aktiviteleri ve apoplastik proteinler üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Taşgın E., Atıcı Ö., Nalbantoğlu B. Popova LP. 2006. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*, (67), 710-715.
- Tatar, O and Gevrek M.N. 2008 Influence of water stress on proline accumulation, lipid peroxidation and water content of wheat. *Asian Journal of Plant Sciences*, 7(4),409-412.
- Thomashow, M.F., 1999, Plant cold acclimation, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 571-599.
- Tiwari, B.S., Belenghi, B. and Levine, A., 2002. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiology*, 128: 1271–1281.
- Turan, Ö., 2007. Nohut (*Cicer arietinum* L.) Çeşit ve hatlarının soğuk stresine karşı toleransının fizyolojik ve biyokimyasal parametreler ile belirlenmesi. Yüksek lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Uluocak, N.: “Toprak Koruması ve Yem Niteliği Bakımından Türkiye’nin Önemli Otlak Bilgileri”, 4.Ü Orman Fakültesi, 4stanbul, Türkiye (1984) 117
- Umbach, A.L., Siedow, J.N., 1993. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide resistant alternative oxidase protein in higher-plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiology*, 103: 845-854.
- Umbach, A.L., Fiorani, F., Siedow, J.N., 2005. Characterization of transformed *Arabidopsis* with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiology*, 139: 1806-1820.

- Uemura, M., Joseph, R.A. and Steponkus P.L., 1995. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. Effect of plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions, *Plant Physiology*, (109), 15-30.
- Uemura, M. and Steponkus, P.L., 1999, Cold acclimation in plants: relation between lipid composition and cryostability of the plasma membrane, *J. Plant Res.*, 112, 245-254.
- Uemura, M., Tominaga, Y., Nakagawara, C., Shigematsu, S., Minami, A., Kawamura, Y., 2006, Responses of the plasma membrane to low temperatures, *Physiol. Plantarum*, 126, 81-89.
- Vanacher, H., Foyer C.H., Carver T.L.W., 1998b. Changes in apoplastic antioxidants induced by powdery mildew attack in oat genotypes with race non-specific resistance. *Planta* 208: 444-452.
- Vance, C.P., Uhde-Stone, C. and Allan, D.L., 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157: 423-447.
- Vanlerberghe, G.C., Day, D.A., Wiskich, J.T., Vanlerberghe, A.E., McIntosh, L., 1995. Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria - dependence on tricarboxylic-acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation. *Plant Physiology*, 109: 353-361.
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L., 1997. Alternative oxidase: From gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 48: 703-734.
- Vanlerberghe, G. .C (2005) Partitioning of respiratory electrons in the dark in leaves of transgenic tobacco with modified levels of alternative oxidase. *Physiol. Plant.* 125, 171-180.
- Venema, J.H., Villerius, L. and Van Hasslt, P.R. 2000. Effect of acclimation to suboptimal temperature on chilling-induced photodamage: Comparison between a domestic and high-altitude wild *Lycopersicon* species. *Plant Science*. 152: 153-163.
- Vercesi, A.E., 2001. The discovery of an uncoupling mitochondrial protein in plants. *Bioscience Reports*, 21: 195-200.
- Vranová, E., Inzé, D. and Van Breusegem, F., 2002, Signal transduction during oxidative stress, *J. Exp. Bot.*, 53, 1227-1236.
- Watling, J.R., Robinson, S.A., Seymour, R.S., 2006. Contribution of the alternative pathway to respiration during thermogenesis in flowers of the sacred lotus. *Plant Physiology*, 140: 1367-1373
- Warren, G.J., 2001, Responses to low temperature and adaptations to freezing, *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*, M.J. Hawkesford and P. Buchner (eds), Kluwer Academic Publ., pp. 209-247.
- Wang, L.J., Huang W.D., Li J.Y., 2003. Effects of salicylic acid on the peroxidation of membrane-lipid of leaves in grape seedlings. *Scientia Agricultura Sinica* , 36(9), 1076-1080.
- Wang, X., Li, W., Li, M., Welti, R., 2006, profiling lipid changes in plant response to low temperatures, *Physiol. Plantarum*, 126, 90-96. Wang, Z., Reddy, V.R., Quebedeaux, B., 1997b, Growth and photosynthetic responses of soybean to short-term cold temperature, *Environ. Exp. Bot.*, 37, 13-24.
- Wagner, A.M., Krab, K., 1995. The alternative respiration pathway in plants: Role and regulation. *Physiologia Plantarum*, 95: 318-325.

- Westhuizen, E.J., Qian X.M., Botha A.M., 1998. Differential induction of apoplastic peroxidase and chitinase activities in susceptible and resistant wheat cultivars by Russian wheat aphid infestation. *Plant Cell Rep.* 18: 132-137.
- Whelan, J., Millar, A.H., Day, D.A., 1996. Oligomerization and the affinity of maize phosphoenolpyruvate carboxylase for its substrate. *Plant Physiology*, 104: 613-616
- Wisniewski, M., Webb, R., Balsamo, R., Close, T.J., Yu X.-M., Griffith, M., 1999. Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiol. Plant.* 105, 600-608.
- Willekens, H., Villarroel R., Montagu M.V., Inze D., Camp, W.V., 1997. Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.), *FEBS Letters* 352, 79-83.
- Willits, D.H. ve PEET, M.M. 1998. The effect of night temperature on greenhouse grown tomato yields in warm climates. *Agric. Forest Meteorol.* 92: 191-202.
- Wingsle, G., Gardestrom P., Hallgren Karpinski S., 1991. Isolation, purification and subcellular localisation of isozyme of superoxide-dismutase from Scot pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Plant Physiol.* 95:21-28.
- Wood, E. S., and Simith, C. A., 1991. *Molecular and Cell Biochemistry*. Chapman & Hall, Hong Kong.
- Xin, Z. and Browse, J., 2000, Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures, *Plant Cell Environ.*, 23, 893-902.
- Yadeghari, L. Z., Heidari R., Carapetian J., 2008. Cold pretreatment-induced changes in antioxidant enzyme activities and relative water content and soluble sugars in shoots and roots of soybean seedlings. *Research Journal of Biological Sciences*, 3(1), 68-73.
- Yağmur, Y., 2008. Farklı Asma (*Vitis vinifera* L.) Çesitlerinin Kuraklık Stresine Karşı Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Tolerans Parametrelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir
- Yang, S.J., Hosokawa M., Mizuta Y., Yun J.G., Mano J., Yazawa S., 2001. Antioxidant capacity is correlated with susceptibility to leaf spot caused by a rapid temperature drop in *Saintpaulia* (African violet). *Sci. Hort.*, 88, 59-69.
- Yaşar, F. Ellialtıoğlu, S. and Yildiz. K. 2008. Effect of salt stress on antioxidant defense systems, lipid peroxidation, and chlorophyll content in green bean. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(6), 782–786.
- Yingli, Y., Shijian, X., Lizhe, A., Nianlai, C., 2007. NADPH oxidase-dependent hydrogen peroxide production, induced by salinity stress, may be involved in the regulation of total calcium in roots of wheat. *Journal of Plant Physiology*, 164,1429-1435.
- Yılmaz, S., ve Ozan, T. S., 2003. Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki iliksi. *Türk Biyokimya Dergisi*, 28(4),252-256.
- Yordanova, R.Y., Christov K.N. and Popova L.P., 2004. Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environ. and Exp. Botany*, (51), 93-101.
- Yu L.J., Lan W.Z., Qin W.M., and Xu H.B., 2001. Effects of salicylic acid on fungal elicitor-induced membrane-lipid peroxidation and taxol production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Process Biochemistry*, (37), 477–482.

- Yu, X.M., Griffith M., 2001. Winter rye antifreeze activity increases in response to cold and drought, but not abscisic acid. *Physiologia Plantarum*, (112), 78–86.
- Zhao, L., Zhang, F., Guo, J., Yang, Y., LI, B. and Zhang, L., 2004. Nitric Oxide Functions as a Signal in Salt Resistance in the Calluses from Two Ecotypes of Reed, *Plant Physiology*, 134:849-857. s146
- Zykova, V.V., Kolesnichenko, A.V., Voinikov, V.K., 2002, Involvement of reactive oxygen species in plant mitochondrial response to low-temperature stress, *Russ. J. Plant Physiol.*, 49, 269-276.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında İran'ın Azerbaycan ilinin Poldeşt ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini aynı ilçede ve lise öğrenimini Şot ilçesinde tamamladı. 1991 yılında girdiği Ürmiye Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 1995 yılında mezun oldu. Aynı yıl Milli Eğitim Bakanlığı kadrosu ile öğretmenliğe atandı. Çesitli okullarda öğretmenlik ve idarecilik yaptı.

2010 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir. halen öğretmen olarak çalışmaktadır. Evli ve iki çocuk babasıdır.