



**DÜŞÜK SICAKLIK STRESİNE
DUYARLI VE DİRENÇLİ BİTKİLERDE
ALTERNATİF SOLUNUM YOLU
AKTİVİTESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Nilay AKBULUT

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı
Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR**

2016

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DÜŞÜK SICAKLIK STRESİNE DUYARLI VE DİRENÇLİ
BİTKİLERDE ALTERNATİF SOLUNUM YOLU AKTİVİTESİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Nilay AKBULUT

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Botanik Bilim Dalı**

**ERZURUM
2016**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU



**DÜŞÜK SICAKLIK STRESİNE DUYARLI VE DİRENÇLİ BİTKİLERDE
ALTERNATİF SOLUNUM YOLU AKTİVİTESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR danışmanlığında, Nilay AKBULUT tarafından hazırlanan bu çalışma 28/12/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Botanik Bilim Dalı’nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 05.01.2017 tarih ve 1.../...44 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP, projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2012/170

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DÜŞÜK SICAKLIK STRESİNE DUYARLI VE DİRENÇLİ BİTKİLERDE ALTERNATİF SOLUNUM YOLU AKTİVİTESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Nilay AKBULUT

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Rahmi DÜMLÜPINAR

Bu araştırma, düşük sıcaklıklara dayanıklı olan buğdayın dört varyetesi (Yıldırım, Doğu-88, Ayyıldız, Alpaslan) ve lahanada, düşük sıcaklıklara dayanıksız olan mısırın 3 varyetesi (SZE-TC-913, LG, Antisis) ve fasulye (Elkoca) bitkileri üzerinde yürütülmüştür. Herbir türe has üşüme sıcaklıkları kontrollü olarak uygulandıktan sonra bir takım antioksidant enzim aktiviteleri (Katalaz, peroksidaz, süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, glutatyon reduktaz), lipid peroksidasyon miktarı (MDA içeriği), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit (O_2^-) içerikleri ve özellikle Alternatif Oksidaz (AOX) aktivitesindeki değişimler analiz edilmiştir.

Yapılan analizlere göre, Katalaz aktivitesinin buğday varyetelerinin bazılarında kontrol bitkilerine kıyasla artma, bazılarında ise azalma, mısır varyetelerinde azalma olduğu, fasulyede istatistiki olarak değişmediği, oysa lahanada artma eğilimi gösterdiği, Peroksidaz ve Süperoksit Dismutaz aktivitelerinin de bu bitkilerde (fasulye hariç) genel anlamda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Askorbat peroksidaz aktivitelerinin tüm bitki varyetelerinde genel olarak artmış olduğu, Glutatyon Reduktaz ve oksidatif hasarın seviyesini gösterme anlamında önemli olan H_2O_2 ve Süperoksit içeriklerinin buğday varyetelerinde artma ve azalmalar, mısır ve fasulyede azalma, lahanada ise artma şeklinde değişim gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakarak, üşüme sınır sıcaklığının tüm bitkilere ait varyetelerde antioksidant enzim aktivitelerine etki etmiş olduğunu, soğuğa dayanıklı türler olduğu bilinen buğday ve lahanada genel anlamda tüm antioksidant enzim aktivitelerinin artışına yol açtığını, ancak bazı buğday varyeteleri ve soğuğa dayanıksız olduğu bilinen mısır ve fasulyede (APX hariç) ise bunun tam tersi sonuçları ortaya çıkardığını söylemek mümkündür.

Yaptığımız analizler sonucunda, düşük sıcaklık uygulamasının buğday ve mısır varyetelerinde, fasulye ve lahanada, LPO seviyelerini kontrol gruplarına kıyasla artırdığı, ancak artış seviyeleri kıyaslandığında, mısır varyetelerinde ki artış yüzdelерinin (%125, 122 ve 45) buğday ve fasulye ve lahanada bitkilerine nispeten çok yüksek olduğu, sadece buğdayın B2 kodlu varyetesinde %47'lik bir değerin oluştuğu belirlenmiştir.

Araştırmamızda, AOX proteini translayon düzeylerinin, yapılan üşüme sınır sıcaklığı uygulamalarıyla kendi kontrollerine kıyasla buğday ve mısır varyetelerinin hepsinde ve fasulyede bariz olarak arttığı belirlenmiştir (buğday için %47, 33, 31, 70, mısır için %134, 32, 98, fasulye için %60).

Bu araştırmada elde edilen bulgulara bakarak, özellikle bu araştırmanın da temelini oluşturan AOX enziminin sorumlu olduğu, “Alternatif Solunum Yolu” denilen metabolik yolun, yapılacak eksojen uygulamalar ile aktiveleştirilebilme durumunun araştırılması, soğuğa direnci az olduğu bilinen bitkilere direnç sağlamak adına faydalı sonuçlar verebilir düşüncesindeyiz.

2016, 95 sayfa

Anahtar Kelimeler: Düşük Sıcaklık, Antioksidant Enzim Aktivitesi, LPO, Alternatif Oksidaz, Buğday, Mısır, Fasulye, Lahana

ABSTRACT

Master Thesis

THE COMPARISON OF ALTERNATIVE RESPIRATION PATWAY ACTIVITY IN SENSITIVE AND RESISTANT PLANTS AGAINST TO LOW TEMPERATURE

Nilay AKBULUT

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Botany
Botany of Science

Supervisor: Prof. Dr. Rahmi DÜMLÜPINAR

In this study, we had used 4 varieties of wheat (Yıldırım, Doğu-88, Ayyıldız, Alpaslan) and 1 variety of cole known as cold resistant, and 3 varieties of corn (SZE-TC-913, LG, Antisis), 1 variety of bean (Elkoca) known as cold nonresistant. After application of species-specific chilling temperatures to the seedlings under controlled conditions, some antioxidant enzyme activities (Catalase (CAT), peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD), aspartat peroksidase (APX), glutation reductase (GR)), some stress parameters (CRED-RA, MDA, the content of H₂O₂ and superoxide) and especially changes of Alternative oxidase activity were analyzed on the leaves of the seedlings.

From these findings, it has been determined that CAT activity was increased in the some of wheat varieties and in cole seedlings with compared to control, decreased in the some of wheat varieties and its activity didn't statistically change in bean seedlings. We also observed generally similar increments and decrements for POX and SOD activities in the seedlings (except bean). We identified that APX activity generally increased, GR activity and the content of H₂O₂ and superoxide increased in the some wheat varieties and cole seedlings, decreased in the some wheat varieties, corn and bean seedlings. According to these activity results, it is possible to say that species-specific chilling bounday temperatures effected antioxidant enzyme activities, lead to generally increment of these enzyme activities in the cole and some of wheat varieties known as cold resistant, but decrement in the corn and bean seedlings (except APX) known as cold sensitive plants.

Low temperature treatments lead to increments in the LPO levels in the wheat, corn varieties and bean and cole seedlings, but when LPO increments (%) of corn varieties compare to the other species (wheat varieties, bean and cole), its increment levels were higher than the others. It was only found a high percentage in the one of wheat variety (%47).

In our study, it was determined that levels of AOX enzyme translation were apparently increased in the all wheat (47, 33, 31, 70 %) and corn varieties (134, 32, 98 %) and also bean seedlings (60%) with comparison to their controls.

From the all findings obtained from the study, it can be said that there is a tight relationship between cold hardiness and altenative respiration patway. Therefore, investigation of activatability of alternative respiration pathway can be ensure very useful results for increase of cold hardiness on especially the cold sensitive plant species.

2016, 95 pages

Keywords: Low temperature, Antioxidant Enzyme Activity, Lipid Peroxidation, Alternative Oxidase (AOX), Wheat, Corn, Bean, Cole

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın önemli bir kısmı, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Bunun yanında araştırmanın geriye kalan kısmı Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı ve Veterinerlik Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Elektroforez Laboratuvarı'nda tamamlanmıştır. Bu araştırma 2012/170 nolu Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi olarak desteklenmiştir.

Araştırmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde desteklerini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, başta danışmanım ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Rahmi DÜMLUPINAR'a, çalışmalarım süresince bana yol gösteren ve bölümün imkanlarından faydalanmamı sağlayan çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya, İhtiyaç duyduğum her an, her türlü desteğini gördüğüm saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a, özellikle western blot çalışmalarında deneyimlerinden faydalanmamı sağlayan her aşamasında yardımlarını gördüğüm kıymetli hocalarım Sayın Doç. Dr. Özgür Kaynar'a ve Doç. Dr. Harun Budak'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Tüm zamanlarda benim için her şeyi daha kolay hale getiren ve birlikte çalışmaktan keyif aldığım, öncelikle saygı duyduğum ve sonsuz sevgiler beslediğim kıymetli arkadaşım Deniz TİRYAKİ'ye edeceğim tüm teşekkürleri az sayıyorum.

Çalışma arkadaşlarım, Sayın Arş. Gör. Gökçe NARDEMİR, Sayın Nurdan GÖNÜL, Sayın Arş. Gör. Mustafa İLERİTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarımın her aşamasında beni yalnız bırakmayan başta annem, babam ve ailemin diğer üyelerine sonsuza dek minnettar kalacağım.

Araştırma süresince tohumları temin ettiğim Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ve Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Nilay AKBULUT

Aralık, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Bitkilerde Stres Kavramı	1
1.2. Düşük Sıcaklık Stresi	4
2. KURAMSAL TEMELLER.....	21
2.1. Reaktif Oksijen Türleri.....	21
2.1.1. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)	22
2.1.2. Süperoksit anyonu (O_2^-).....	23
2.1.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2).....	23
2.1.4. Hidroksil radikali ($^{\bullet}\text{OH}$)	24
2.2. Lipid Peroksidasyonu	25
2.3. Antioksidan Enzimler.....	26
2.3.1. Süperoksit dismutaz (SOD).....	26
2.3.2. Katalaz (CAT)	27
2.3.3. Peroksidaz (POD).....	28
2.3.4. Askorbat peroksidaz (APX)	29
2.3.5. Glutasyon Redüktaz (GR).....	30
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	31
3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	31
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	32
3.3. Yöntemler	35
3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi	35
3.3.2. Çözünebilir protein miktarının tayini	36

3.3.3. Lipid peroksidasyon miktarının belirlenmesi.....	37
3.3.4. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi	38
3.3.4.a. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi.....	38
3.3.4.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi	39
3.3.4.c. Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi	40
3.3.4.d. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayini	40
3.3.4.e. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tayini	41
3.3.5. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi	41
3.3.6. Süperoksit (O ₂ ⁻) içeriğinin belirlenmesi	42
3.3.7. Mitokondri izolasyonu	43
3.3.8. Sodyum dodesil sülfat -Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)	44
3.3.9. AOX proteini ifadesi analizi (Western Blot).....	45
3.3.10. İstatistiksel analiz	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	47
4.1. Çözünabilir Protein Tayini Sonuçları.....	48
4.2. Lipid Peroksidasyon Seviyesi (MDA İçeriği) Sonuçları.....	49
4.3. Antioksidan Enzim Aktiviteleri Sonuçları	52
4.3.1. Katalaz (CAT) aktivitesi sonuçları.....	52
4.3.2. Peroksidaz aktivitesi sonuçları	55
4.3.3. Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları.....	58
4.3.4. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi sonuçları	61
4.3.5. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi sonuçları.....	64
4.4. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) içeriği sonuçları	67
4.5. Süperoksit O ₂ ⁻ İçeriği Sonuçları.....	70
4.6. AOX proteini ifadesi analiz Sonuçları (Western Blot)	73
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	78
5.1. Sonuç	82
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	96

SİMGELER DİZİNİ

μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
AOX	: Alternatif oksidaz
APX	: Askorbat peroksidaz
CAT	: Katalaz
E.C	: Enzim kod numarası
E.Ü	: Enzim ünitesi
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
EU	: Enzim ünitesi
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
kDA	: Kilo dalton
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
NBT	: Nitroblue tetrazolium klorür
nmol	: Nano mol
$\text{OH}^\bullet$	: Hidroksil radikali
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
POD	: Peroksidaz
PVP	: Polivinilpirrolidon
ROT	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Devir/dakika
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiobarbutirik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
$\times g$	: Yerçekimi ivmesinin katı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Başlıca çevresel stres kaynakları	3
Şekil 1.2. Bitkilerde soğuğa uyum süresince indüklenen hücrel değişiklikler	6
Şekil 1.3. Bitki mitokondri iç zarlarında yerleşmiş elektron taşıma sisteminin düzenlenişi ve ATP sentezi.....	10
Şekil 1.4. Alternatif oksidazın redoks aktivasyonu.	13
Şekil 1.5. AOX enziminin diagramatik yapısı	14
Şekil 1.6. Mitokondride AOX in regülasyonu ve yapısı.....	15
Şekil 1.7. Mitokondrial elektron transport kompleksleri ve inhibitörleri	15
Şekil 2.1. Bitki hücrelerinde AOT'lerin oluşabileceği bölgeler	21
Şekil 2.2. Moleküler oksijenden (O ₂) kaynak alan ROT'ların kendi aralarındaki dönüşümleri	25
Şekil 3.1. Protein tayini için kullanılan standart grafik	37
Şekil 3.2. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik.....	39
Şekil 3.3. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik ...	42
Şekil 3.4. Süperoksit içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik.....	43
Şekil 4.1. Buğday bitkisi varyetelerinde (B1, B2, B3, B4) soğuk uygulamasına göre MDA içeriğinin değişimi.....	49
Şekil 4.2. Mısır bitkisi çeşitlerinde (M1, M2, M3) soğuk uygulamasına göre MDA içeriğinin değişimi	50
Şekil 4.3. Fasulye bitkisi(F) soğuk uygulamasında MDA içeriğinin değişimi.....	51
Şekil 4.4. Lahana bitkisi(L) soğuk uygulamasında MDA içeriğinin değişimi	51
Şekil 4.5. Buğday bitkisi çeşitlerinde (B1, B2, B3, B4) düşük sıcaklığın CAT aktivitesi üzerine etkileri	53
Şekil 4.6. Mısır bitkisi çeşitlerinde (M1, M2, M3) düşük sıcaklığın CAT aktivitesi üzerine etkileri	54
Şekil 4.7. Fasulye bitkisinde düşük sıcaklığın CAT aktivitesi üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.8. Lahana bitkisinde düşük sıcaklığın CAT aktivitesi üzerine etkisi	55
Şekil 4.9. Buğday bitkisi çeşitlerinde (B1, B2, B3, B4) düşük sıcaklığın POD aktivitesi üzerine etkileri	56

Şekil 4.10. Mısır bitkisi çeşitlerinde(M1, M2, M3) düşük sıcaklığın POD aktivitesi üzerine etkileri.....	57
Şekil 4.11. Fasulye bitkisinde düşük sıcaklığın POD aktivitesi üzerine etkisi.....	57
Şekil 4.12. Lahana bitkisinde düşük sıcaklığın POD aktivitesi üzerine etkisi	58
Şekil 4.13. Buğday bitkisi çeşitlerinde (B1, B2, B3, B4) düşük sıcaklığın SOD aktivitesi üzerine etkileri	59
Şekil 4.14. Mısır bitkisi çeşitlerinde(M1, M2, M3) düşük sıcaklığın SOD aktivitesi üzerine etkileri.....	60
Şekil 4.15. Fasulye bitkisinde düşük sıcaklığın SOD aktivitesi üzerine etkisi.....	60
Şekil 4.16. Lahana bitkisinde düşük sıcaklığın SOD aktivitesi üzerine etkisi	61
Şekil 4.17. Buğday bitkisi çeşitlerinde(B1,B2,B3,B4) düşük sıcaklığın APX aktivitesi üzerine etkileri	62
Şekil 4.18. Mısır bitkisi çeşitlerinde(M1,M2,M3) düşük sıcaklığın APX aktivitesi üzerine etkileri.....	63
Şekil 4.19. Fasulye bitkisinde düşük sıcaklığın APX aktivitesi üzerine etkisi.....	63
Şekil 4.20. Lahana bitkisinde düşük sıcaklığın APX aktivitesi üzerine etkisi	64
Şekil 4.21. Buğday bitkisi çeşitlerinde (B1, B2, B3, B4) düşük sıcaklığın GR aktivitesi üzerine etkileri	65
Şekil 4.22. Mısır bitkisi çeşitlerinde(M1,M2,M3) düşük sıcaklığın GR aktivitesi üzerine etkileri.....	66
Şekil 4.23. Fasulye bitkisinde düşük sıcaklığın GR aktivitesi üzerine etkisi	66
Şekil 4.24. Lahana bitkisinde düşük sıcaklığın GR aktivitesi üzerine etkisi.....	67
Şekil 4.25. Buğday bitkisi çeşitlerinde(B1, B2, B3, B4) düşük sıcaklığın H ₂ O ₂ aktivitesi üzerine etkileri	68
Şekil 4.26. Mısır bitkisi çeşitlerinde(M1, M2, M3) düşük sıcaklığın H ₂ O ₂ aktivitesi üzerine etkileri.....	69
Şekil 4.27. Fasulye bitkisinde düşük sıcaklığın H ₂ O ₂ aktivitesi üzerine etkisi.....	69
Şekil 4.28. Lahana bitkisinde düşük sıcaklığın H ₂ O ₂ aktivitesi üzerine etkisi	70
Şekil 4.29. Buğday bitkisi çeşitlerinde(B1, B2, B3, B4) düşük sıcaklığın Süperoksit aktivitesi üzerine etkileri	71
Şekil 4.30. Mısır bitkisi çeşitlerinde (M1, M2, M3) düşük sıcaklığın Süperoksit aktivitesi üzerine etkileri	72

Şekil 4.31. Fasulye bitkisinde düşük sıcaklığın Süperoksit aktivitesi üzerine etkisi	72
Şekil 4.32. Lahana bitkisinde düşük sıcaklığın Süperoksit aktivitesi üzerine etkisi	73
Şekil 4.33. Düşük sıcaklık uygulamalarıyla buğday bitkisinde AOX proteini translasyon düzeyi değişimi	74
Şekil 4.34. Düşük sıcaklık uygulamalarıyla buğday bitkisinde AOX proteini translasyon düzeyinin analizi	74
Şekil 4.35. Düşük sıcaklık uygulamalarıyla mısır bitkisinde AOX proteini translasyon düzeyi değişimi	75
Şekil 4.36. Düşük sıcaklık uygulamalarıyla mısır bitkisinde AOX proteini translasyon düzeyinin analizi	75
Şekil 4.37. Düşük sıcaklık uygulamalarıyla fasulye bitkisinde AOX proteini translasyon düzeyi değişimi	76
Şekil 4.38. Düşük sıcaklık uygulamalarıyla fasulye bitkisinde AOX proteini translasyon düzeyinin TotalLab TL-120 programına göre analizi.....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Bitkilere ait varyeteler ve kodlamaları	36
Çizelge 4.1. Buğday, mısır, fasulye ve lahana bitkisine ait kodlamalar	47
Çizelge 4.2. Bitkilerin mg/g protein doku miktarları.....	48



1. GİRİŞ

1.1. Bitkilerde Stres Kavramı

Bitkiler, yaşamları süresince birçok stres faktörüyle karşı karşıya kalırlar. Ekosistemin primer üreticileri olmaları, atmosferin karbondioksit ve oksijen dengesini sağlamaları ve buna bağlı olarak yeryüzündeki sıcaklık dengesini ayarlamaları gibi önemli fonksiyonlara sahip olmaları nedeniyle doğanın vazgeçilmez ögeleri konumundadırlar. Bitkiler, çevrelerinde büyüme ve gelişme şanslarını kısıtlayıcı olumsuz şartlara maruz kalarak strese girebilirler.

Çevresel ve biyolojik faktörlerin ayrı ayrı ya da birlikte fizyolojik olaylarda belirgin değişimler meydana getirmesi stres olarak tanımlanmaktadır. Stres terimi aynı zamanda hasar meydana getirme potansiyelini sahip güç olarak da bilinir. Metabolizma bozukluğunun sonucunda oluşan bu hasarlar bitkinin büyümesinde ve veriminde indirgenmelere sebep olurlar (Hale and Orcutt 1987).

Stres “fizyolojik değişimlere, bedensel zararlara ve hastalıklara neden olma kapasitesine sahip olan biyotik veya abiyotik faktörler” şeklinde de tanımlanmıştır (Cassels and Curry 2001).

Bitkiler belirli derecelerde stres hasarlarına direnebilme ve canlı kalabilme özelliğindedir. Bir bitkinin bazı kısımları (tohumlar, tomurcuk ve dormant hücreler) strese dayanıklıyken, diğer kısımları (meristemler, sukkulent organlar ve fideler) duyarlı olabilir. Ayrıca bitkiler yaşamak zorunda oldukları çevreye kısmen veya tamamen uyum sağlayabilme özelliğine sahiptirler (Bidwell 1974).

Bitkiler streslere karşı, birçok mekanizmanın yanında, biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmalarını devreye sokarak cevap verirler. Bitkiler bir veya daha fazla olumsuz

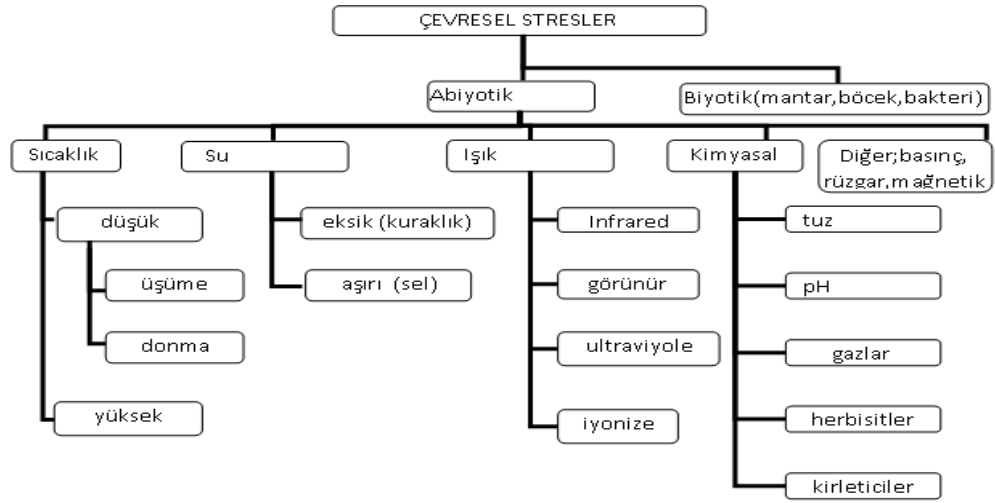
şartlara karşı sınırlı bir cevap kapasitesine sahiptirler (Hale and Orcutt 1987; Kocaçalışkan 2004).

Strese dayanıklılık, sakınma (avoidans) ve tolerans (esneklik) olmak üzere ikiye ayrılır (Levitt 1972). Avoidans, dış çevrede stres oluşturabilecek koşullar olmasına rağmen bitkinin, hücrelerini stresden koruyan bir iç ortam hazırlamasıdır. Diğer bir deyişle, bitkinin dış ortamdan gelen olumsuz faktörlerin etkisini stres oluşmadan önce önleme yeteneğidir. Tolerans ise bitkinin aşırı dış stres şartlarında olduğu kadar içsel stres altında da bir dereceye kadar canlılığını devam ettirme yani strese dayanma kapasitesidir. Bu özelliğe sahip bitkiler stres sonucu oluşan hasarları azaltabilme veya hiç hasar oluşturmama kabiliyetine sahiptirler (Street and Öpik 1984).

Stres fizyolojisinde önemli konulardan birisi de, adaptasyon ve aklimatasyon (uyum) kavramları arasındaki ayrımın iyi bilinmesidir. (Huner *et al.* 1998)

Adaptasyon, uzun süreli çevresel değişimler sonucunda ortaya çıkan genotipik bir cevaptır. Adaptasyon sonucu genomda oluşan değişiklikler stabildir ve populasyonda nesiller boyunca korunmaktadır. Uyum, genetik yapıda değişim olmaksızın, ortam şartlarının değişmesi nedeniyle oluşan fenotipik bir yanıttır (Huner *et al.* 1998). Soğuğa uyum buna verilebilecek uygun örneklerden biridir. Soğuğa uyumda düşük sıcaklığa dirençli bitkilerin, düşük fakat sıfırın üzerindeki sıcaklıklara maruz kalmasıyla, bitki büyümesi ve metabolizmasında yeni düzenlemeler meydana gelir ve neticesinde bitki donmaya karşı direnç sağlar (Jouve *et al.* 2000). Uzun süreli uyum söz konusu olduğunda bitki çeşitli organlarını kaybedilebilir. Ancak bu organlar tekrar oluşup büyüyerek yeni bir morfolojik ve anatomik yapılar kazanır. Kısa süreli uyumda ise transkripsiyon, translasyon, protein sentez hızı ile çeşitli büyüme hormonlarının miktarı ve aktivite miktarı değişir (Gaspar *et al.* 2002).

Şekil 1.1 görüldüğü gibi bitkilerin maruz kaldığı başlıca stres faktörleri, biyotik ve abiyotik olmak üzere iki kısma ayrılabilir.



Şekil 1.1. Başlıca çevresel stres kaynakları (Kadıoğlu 2011)

Hem doğal hem de tarımsal şartlar altında, bitkiler sıklıkla çevresel streslere maruz kalırlar. Dünya genelinde bitkisel üretimde ürün kaybının başlıca nedeni abiyotik streslerdir ve önemli tarımsal ürünlerin ortalama üretimini yaklaşık %50 azaltarak tarım endüstrisinin geleceğini tehdit etmektedir (Bray *et al.* 2000; Mahajan and Tuteja 2005).

Çevresel stres kaynaklarının etkileri birbiriyle ilişkilidir. Örneğin, yüksek sıcaklığa dayanıklılık, onunla birlikte oluşan kuraklık koşullarına dayanıklılığa bağlıdır. Diğer yandan donmaya dayanıklılık, dokunun dehidrasyonuna dayanıklılığı ile önemli ölçüde bağlantılıdır (Hale and Orcutt 1987)

Bu stres kaynakları bitkilerin biyosentetik potansiyelini indirger, normal fonksiyonlarını değişikliğe uğratarak bitkinin ölümüne yol açabilecek zararlara neden olabilirler. Örneğin dünyanın ortalama sıcaklığının 1°C'lik azalması halinde pirinç üretiminde de %40'lık bir düşüşün meydana geleceği bildirilmiştir. Bununla beraber narenciye, kışlık tahıl, bazı sebzelerin ve meyve ağaçlarının dona dayanıklılığının 2°C artmasının dünyadaki üretimi önemli derecede artıracak ileri sürülmüştür (Hale and Orcutt, 1987). Bu nedenle ürün kayıplarını en aza indirmek ve dünyanın değişen iklim koşullarına karşı dirençli türler geliştirmek için bitkilerin stresten korunma ve tolerans mekanizmalarının iyi bilinmesi önem kazanmıştır (Bidwell 1974).

Bir bitki üzerinde stres oluşturan koşullar diğeri için stres oluşturmazabilir. Örneğin; bezelye (*Pisum sativum*) ve soya fasulyesi (*Glycine max*) optimum gelişimlerini sırasıyla 20°C ve 30°C'lik sıcaklıklarda gösterirler. Sıcaklık arttıkça, ısı stresinin etkileri bezelyede soya fasulyesinden önce ortaya çıkar. Yani, soya fasulyesinin ısı stresine toleransı daha yüksektir (Kocaçalışkan 2004).

1.2. Düşük Sıcaklık Stresi

Her bitkinin normal büyüme ve gelişim gösterebildiği optimum bir sıcaklık derecesi vardır ve bu sıcaklık derecesinin altındaki sıcaklıklar bitkilerde soğuk stresi olarak bilinmektedir. Ayrıca, belirli sıcaklık koşulları bir bitki için optimum olurken, diğer bitki için strese neden olabilmektedir (Mahajan and Tuteja 2005).

Soğuk stresinden etkilenme derecelerine göre bitkiler 3 gruba ayrılırlar; soğuğa hassas olanlar, soğuğa dayanıklı fakat dona duyarlı olanlar ve dona dayanıklı olanlar. Soğuğa hassas olan bitkiler 12°C'nin altındaki sıcaklıklarda hasar görürler. Soğuğa dayanıklı ancak dona duyarlı olanlar 12°C'nin altındaki sıcaklıklara uyum sağlayabilir, ama donma sıcaklıklarında yaşamlarını sürdüremezler. Dona duyarlı olan bitkiler ise donma sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda hayatta kalabilirler ve bu sıcaklıklara uyum sağlayabilirler. Üşüme ve donma streslerinin mekanizmaları ve etki şekilleri farklılık gösterir. Soğuk stresi hücreler üzerine düşük sıcaklığın doğrudan etkisidir. Donma ise dolaylı olarak rol oynar ve hücreleri buz oluşumu ile hasara uğratar (Pearce 1999).

Yeryüzünün nadir yerlerinde sıcaklıklar, bitkilerin hayatsal fonksiyonlarını uygun şekilde sürdürmelerine izin veren 5°C ile 25°C arasında kalmaktadır (Larcher 1995).

Düşük sıcaklığın özellikle ekonomik değeri olan bitkiler üzerine neden olduğu zararları önlemek için her yıl büyük bütçeler harcanmasına rağmen ekonomik kaybın milyonlarca dolar civarında olduğu bildirilmiştir (Steponkus 1992).

Düşük sıcaklık çimlenme, büyüme ve gelişme, reproduktif organlar ve hasat sonrası depolama süresi de dahil olmak üzere bitkilerde birçok olay üzerinde etkili olan çevresel bir faktördür (Lyons 1973; Wang 1990).

Bitkilerin en önemli özelliklerinden birisi de poikilotermik canlılar olmasıdır. Yani bitki dokularının sıcaklığı ortam sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir (Hale and Orcutt 1987). Bitkiler Aktif olarak yer değiştirme yeteneğine sahip değildir ve bulundukları ortamın sıcaklığındaki değişimleri algılayıp, metabolik reaksiyonlarını, oluşan yeni sıcaklık rejimine göre ayarlamak zorundadırlar. Bitkiler aleminde düşük sıcaklıklara tolerans gösterme açısından farklı varyasyonlar bulunmaktadır (Rajashekar 2000).

Bir bitki türünün düşük sıcaklığa gösterebileceği toleransın derecesi genetik faktörlerle belirlenir ve bitkinin yaşadığı ortamın iklim özelliklerine de bağlıdır (Sutka and Galiba 2003).

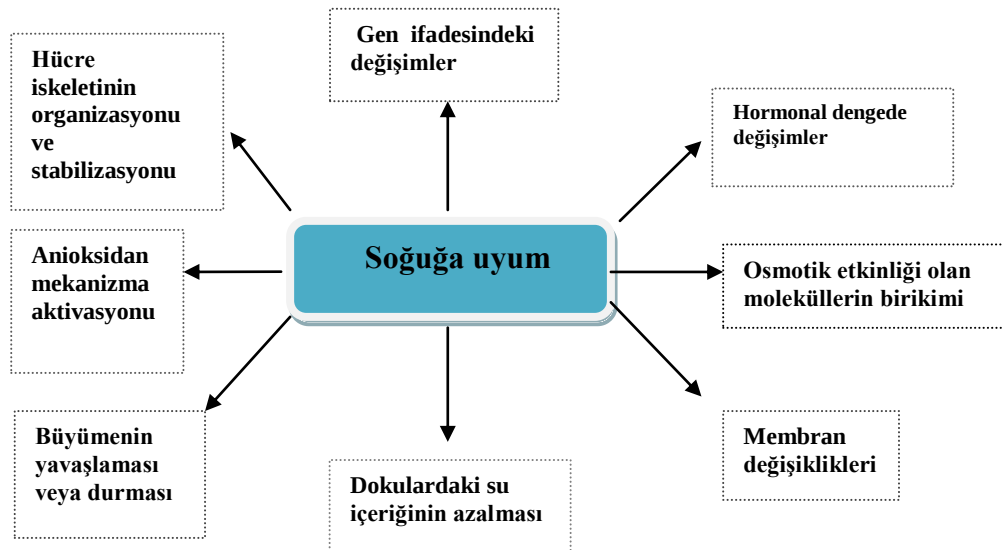
Ekstrem sıcaklıklar, kuraklık, oksidatif, stres tuzluluk, kimyasal toksisite gibi abiyotik stresler bitki gelişimi ve verimliliği üzerinde olumsuz etkisi olan birçok morfolojik, fizyolojik ve moleküler değişimlere neden olurlar (Wang *et al.* 2003).

Bitkiler, düşük sıcaklığa yaşamlarının belli evrelerinde diğer evrelerine göre daha duyarlıdır. Örneğin genç fideler olgun bitkilerle karşılaştırıldığında, genç fidelerin düşük sıcaklıktan olgun bitkilere göre daha fazla etkilendikleri bildirilmiştir (Patterson *et al.* 1987; Alberdi and Corcuera 1991; Nishida and Murata 1996).

Bitkilerdeki soğuk hasarının belirtileri; soğuğa maruz kalma süresine, bitkinin genotipine, bitkinin gelişim evresine, soğukla temas eden dokuya, sıcaklığa, rüzgara, suya, besinlere ve ışık gibi diğer çevresel koşullara bağlı olarak değişmektedir (Saltveit and Morris 1990). Bu belirtiler; bitki büyüme hızının yavaşlaması, yaprak genişliğinin daralması, hücresel otolizin ve yaşlanmanın hızlanması, programlanmış hücre ölümleri, ışıktaki fotooksidasyon sonucu klorofil kaybı nedeniyle klorozis oluşumu, hücre zar yapılarının bozulması ve bunun sonucunda hücre bütünlüğünün bozulması, protoplazmik

akışkanlığın azalması ve nekrozis olarak özetlenebilir (Saltveit and Morris 1990; Kratsch and Wise 2000; Mahajan and Tuteja 2005; Bertamini *et al.* 2007; Rymen *et al.* 2007).

Soğuğa uyum, bitki metabolizmasında morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişimlerin meydana geldiği oldukça karmaşık bir olaydır. Bu değişimler arasında büyümenin durması, dokulardaki su miktarının azalması, rozet oluşumu, absisik asit (ABA) miktarının geçici olarak artması, membran lipid kompozisyonunun değişmesi, serbest prolin, çözünebilir karbohidratlar ile antifriz proteinler gibi osmotik etkinliğe sahip moleküllerin birikimi, antioksidan enzimlerin aktiviteleri ile antioksidan moleküllerin miktarının artmasının yanı sıra birçok genin ifadesinin artması sayılabilir (Şekil 1.2). Bu parametrelerin bitkisel dokulardaki miktarı ve aktivitelerindeki farklılıklara göre, bir bitkinin düşük sıcaklığa toleranslı olup olmadığı, toleranslı ise soğuğa uyumun sağlanması için hangi metabolik değişimlerin olması gerektiği hakkında fikir elde edilebilmektedir (Nishida *et al.* 1996; Tao *et al.* 1998; Thomashow 1999; Janda *et al.* 2003; Mahajan and Tuteja 2005).



Şekil 1.2. Bitkilerde soğuğa uyum süresince indüklenen hücresel değişiklikler (Xin and Browse 2000)

Düşük sıcaklık stresinden öncelikle ve en fazla etkilenen organel, kloroplasttır. Soğuk zararının belirtileri kloroplast şişmesi, tilakoitlerin biçim değiştirmesi ve genişlemesi, nişasta granüllerinin boyutunda ve sayısında azalma ve kloroplast zarından periferik retikulum denilen küçük çıkıntıların oluşumu şeklinde tipik olarak ortaya çıkmaktadır (Kratsch and Wise 2000).

Kloroplastın aksine mitokondri, soğuk stresine daha toleranslı bir organeldir ve sadece soğuğa karşı aşırı duyarlı bitkilerin mitokondrileri düşük sıcaklıklardan görünür şekilde etkilenir. Aşırı duyarlı türlerde, mitokondri zarının fiziksel durumunun farklılaştığı ve bu nedenle sitokrom *c* oksidaz aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (De Santis *et al.* 1999; De Virville *et al.* 2002).

Çekirdek, nadiren donma derecesinin altındaki düşük sıcaklık stresinden görünür bir şekilde değişikliklere uğrar. Aşırı duyarlı bitkilerin soğuk stresi uygulanmış hücre kültürlerinde kromatin yoğunlaşması (Yun *et al.* 1996), kromatin ve nükleoluslardaki parçalanma nedeniyle çekirdekte meydana gelen genişleme ve mikofilamentlerde yığılma gözlenmiştir (Ishikawa 1996). Bunlara ek olarak, düşük sıcaklıklara maruz kalan hücrelerde golgi veziküllerinin şiştiği ve endoplazmik retikulumun genişlediği de bildirilmiştir (Ishikawa 1996).

Düşük sıcaklık hasarının ilk belirtilerinden biri, kök bölgesinden su alımı ve transpirasyon arasındaki dengenin bozulması nedeniyle meydana gelen gövde dehidrasyonudur (Vernieri *et al.* 2001). Buna ek olarak, kökteki gibi gövdede de büyüme hızı yavaşlar. Soğuğa maruz kalma sonucu bitkilerin yaprak genişliği daralır. Daha şiddetli soğuk stresi hücrel otolizi ve yaşlanmayı artırır. Otoliz ve yaşlanma dokularda ya da dokuların yüzeyinde lezyonlara neden olabilir. Bu lezyonlar genellikle hücre hasarına bağlı olarak yaprak epidermisinde çukur ya da batık bölgeler olarak görülmektedir. Düşük sıcaklık stresi esnasında, ışıpta fotooksidasyon sonucu klorofildeki farklılaşmalar nedeniyle yapraklarda sararmalar (klorozis) ve benekler (nekrozis) görülür (Saltveit and Morris 1990).

Düşük sıcaklıklara hassas bitkilerde soğuğa dayanıklılık, bitkinin gelişim evresine bağlıdır. Tohum, düşük nem içeriği ve dinlenme halinde (dormant) olması nedeni ile uzun süreli düşük sıcaklıklara oldukça toleranslıdır. Tohumun su içeriğinin artmasıyla birlikte tohum, soğuğa duyarlı hale gelebilir. Soğuk, suyun emilimini geciktirir ya da ilk emilimi sırasında zar bütünlüğünü bozar, elektrolit (iyon) sızıntısını artırır ve çimlenmeye engel olur (Bois *et al.* 2006).

Düşük sıcaklıkların diğer bir fizyolojik etkisi fotosentez üzerinedir. Fotosentez, ışık enerjisini biyokimyasal olarak kullanılan kimyasal potansiyel enerjiye (ATP) ve redoks potansiyel enerjiye (NADPH₂) kloroplastlardaki tilakoid zarlara yerleşmiş sistemler aracılığıyla dönüştüren mekanizmadır. Fotosentezin birincil reaksiyonları sıcaklıktan bağımsızdır ve ışık enerjisini yakalayıp enerjiyi redoks potansiyel enerjiye aktarmak için fotosistem PSI ve PSII tarafından katalizlenirler. Buna karşılık, sıcaklığa bağımlı biyokimyasal reaksiyonlar bu redoks potansiyel enerjisini kararlı NADPH₂ formuna dönüştürür (Paul and Foyer 2001; Ensminger *et al.* 2006). Bu sıcaklığa bağımlı reaksiyonların düşük sıcaklık stresi koşullarında inhibe olduğu rapor edilmiştir (Allen and Ort 2001; Foyer *et al.* 2002).

Bunlara ilave olarak ışıktaki soğuğa maruz kalma neticesinde PSI'in verici bölgesinde oksijenin indirgenmesi ile süperoksit radikali veya uyarılmış klorofil molekülünün enerjisini oksijene aktararak singlet oksijen üretiminin artmasının, hücre bileşenlerde oksidatif hasarlara ve fotosentetik yapılarda fotoinhibisyona neden olduğunu bildiren çalışmalar vardır (Wise 1995; Foyer *et al.* 2002; Hogewoning and Harbinson 2007).

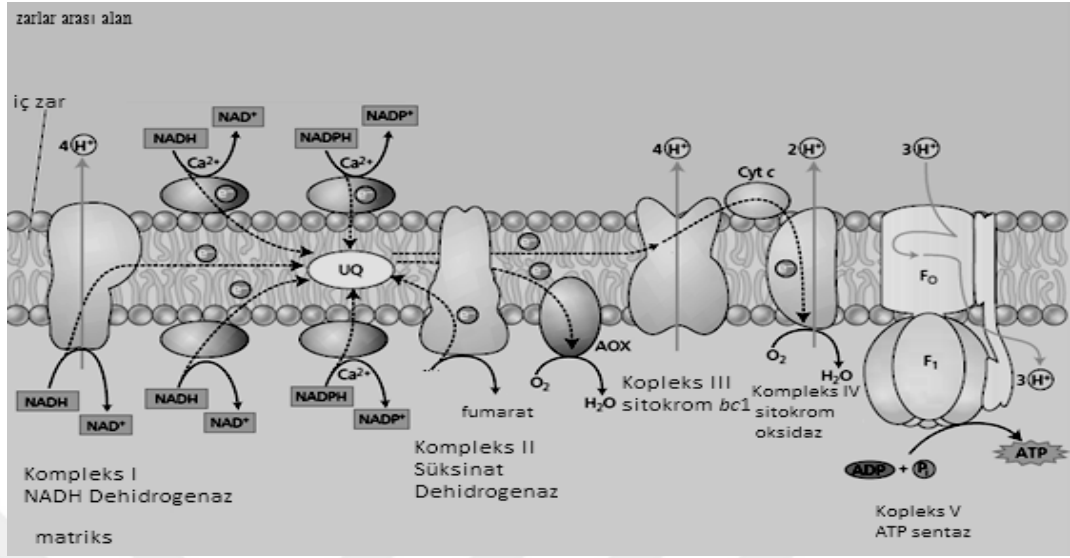
Düşük sıcaklık stresi fizyolojik olaylardan solunumu da etkiler. Yapılan çalışmalar sıcaklık değerindeki azalmanın, fotosentezin aksine solunumun hızını arttırdığını saptamıştır. Zhou and Solomos (1998)'un çalışmasında, araştırmacılar patates yumrularını 10°C'den 1°C'ye aktararak 12. günde solunum değerinde üç kat artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu araştırmayı destekler nitelikteki başka bir çalışmada da, 20°C'den 5°C'ye aktarılan lale soğanlarında da O₂ tüketiminin dolayısı ile oksidatif fosforilasyon hızının arttığı rapor edilmiştir (Kannerworff and Vander Plas 1994).

Yapılan farklı bir çalışmada ise önceki araştırmaları destekler nitelikte sonuçlar elde edilmesinin yanı sıra bitkilere özgü olduğu bilinen alternatif solunum yolu aktivitesinin de artış gösterdiği tespit edilmiştir.

25°C’de yetiştirilen patates yumrularına kıyasla 5°C’de yetiştirilen patates yumrularındaki CO₂ çıkışı düşük sıcaklık uygulamasının ilk dört gününde hızla artmış 10 gününde ise en üst seviyeye ulaştığını rapor edilmiştir. Eşit koşullardaki patates yumrularından izole edilen mitokondrilerdeki alternatif oksidaz (AOX) aktivitesinin ise kontrol bitkisine kıyasla 10 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Borecky and Vercesi 2005).

Soğuk stresi uygulanan bitkilerde AOX aktivitesinin artış göstermesi soğuk stresine cevapta antioksidan sisteme ek olarak AOX’un da ekin bir şekilde dahil olabileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır. Genel olarak solunum tüm canlılarda meydana gelir. Solunum kompleks moleküllerden karbondioksit ve enerjinin açığa çıkarıldığı oksidatif bir metabolik yoldur. Solunumda asıl amaç, hücrelerde enerjinin geçerli formu olan kimyasal potansiyel enerjinin (ATP) üretilmesidir. Sentezlenen ATP, bitki hücrelerindeki kimyasal sentezlerde enerji kaynağı olarak kullanılır. Aerobik organizmalarda glikoliz, trikarboksilik asit döngüsü (TCA), ve mitokondriyal elektron transport sistemi karbon metabolizmasının temelini oluşturur. Solunum, bütün bitkilerde hayatın devamı, büyüme, ve karbon dengesi için temel ögedir. Solunum enzimlerinin büyük çoğunluğu tüm organizmalarda aynı olsa da bitki solunum sistemi, diğer birçok organizmalarda bulunmayan metabolik bir ağ ile kuşatılmıştır. Bitkiler sitosolik glikolizis, TCA döngüsü ve ETS de farklı alternatif enzimlere sahiptirler. Bitkilerde solunum metabolizmasının değişken doğası, ATP üretiminin yanı sıra çok değişik ve önemli biyosentetik rollere de sahip olduğunu gösterir.

Oksidatif fosforilasyon, mitokondrial elektron transport sisteminde (miETS) meydana gelir. Elektron transport sistemi beş temel protein kompleksi içerir (Şekil 1.3). Bu kompleksler mitokondri iç zarına yerleşmiş şekilde bulunurlar.



Şekil 1.3. Bitki mitokondri iç zarlarında yerleşmiş elektron taşıma sisteminin düzenlenişi ve ATP sentezi (Taiz and Zeiger 2008’den modifiye edilerek alınmıştır)

Kompleks I(NADH dehidrogenaz), matriksdeki NADH’ları okside eder ve elektronları Ubikinon’a (UQ) transfer ederek UQ’u Ubikinol’a (UQH₂) indirir. ETS zincirine elektronların en büyük giriş bölgesidir (Friedrich and Böttcher 2004).

Kompleks I’in bir bölgesi proton taşınmasından sorumludur ve mitokondri iç zarının içine yerleşmiştir. Diğer bölgesi mitokondri matriksinin iç kısmına doğru uzanır ve NADH’ın oksidasyonundan sorumludur (Abdrakhmanova *et al.* 2004). NADH’dan ubikinona elektron transferi esnasında Kompleks I’den her elektron çifti için zarlar arası boşluğa 4 proton pompalanır (Friedrich and Bottcher 2004).

Mitokondial elektron transport sisteminde bitkilere özgü olan iki tip NADH dehidrogenaz; içsel NADH-dehidrogenaz mitokondri iç zarının iç yüzeyine konumlanmış, dışsal NADH- dehidrogenaz ise mitokondri iç zarının dış yüzeyinde yerleşmiş şekilde bulunur ve ubikinon aracılığıyla özellikle stres durumlarında ETS zincirine katılırlar. Bu iki tip NADH-dehidrogenazdan elektronlar ubikinona transfer edilirken mitokondri zarları arasına proton pompalanmaz. İki tip NADH-dehidrogenazda kompleks I’in aksine rotenona hassas değildir (Moller 2002).

Mitokondrial oksidatif fosforilasyon sisteminin en küçük protein kompleksi, hidrofobik membran proteinlerine bağlı iki alt ünite içeren kompleks II'dir. Kompleks II (süksinat-ubikinon oksidoredüktaz) ETS zincirine elektronların ikinci giriş kapısıdır (Yankovskaya *et al.* 2003).

Kompleks II (Süksinat dehidrogenaz), süksinatın oksidasyonu ile UQ'u indirgeyen bir membran-bağlı sitrik asit yolu enzimidir (Browse *et al.* 2006).

Kompleks III (ubikinol-sitokrom c oksidoredüktaz), dimerik yapılardır ve mitokondrial elektron transport sisteminin merkezine yerleşmiştir (Berry *et al.* 2000). Sitokrom *b* ve *c1* den oluşan kompleks III'ün spesifik inhibitörü Antimisin A'dır. Antimisin A kompleks III'teki sitokrom *b* ile sitokrom *c1* arasındaki elektron akışına engel olarak kompleks III'ü inhibe eder (Storey 1972; Roberts *et al.* 1980).

Kompleks IV (sitokrom c-O₂ oksidoredüktaz) solunum zincirinin sonunda bulunur. Membran içerisinde monomer veya dimer formdadır (Michel *et al.* 1998). Kompleks III ile kompleks IV arasında elektron transferi sitokrom *c* aracılığıyla sağlanır. Sitokrom *c* mitokondri iç zarının yüzeyine bağlı ve hareket yeteneği olan küçük bir proteindir (Taiz and Zeiger 2008).

Kompleks IV sitokrom *c* aracılığıyla kompleks III'ten elektronları alarak zarlar arasında proton pompalar ve moleküler oksijenin indirgenmesiyle su molekülünün oluşmasında görev alır (Lambers 1997; Parsons 1998). Kompleks IV'ün redox reaksiyon merkezinde (sitokrom *a*, sitokrom *a*₃, Cu_A ve Cu_B) yer alan enzimlerden sitokrom *a*₃'e ciyanürün bağlanması *in vivo* ortamda kompleks IV'ü inhibe ederek elektron akışını durdurur (Jones *et al.* 1984). Ciyanüre benzer şekilde karbon monoksit (CO) ve azid de (NaNO₃) sitokrom *c* oksidazı inhibisyona uğratar (Wilson 1967).

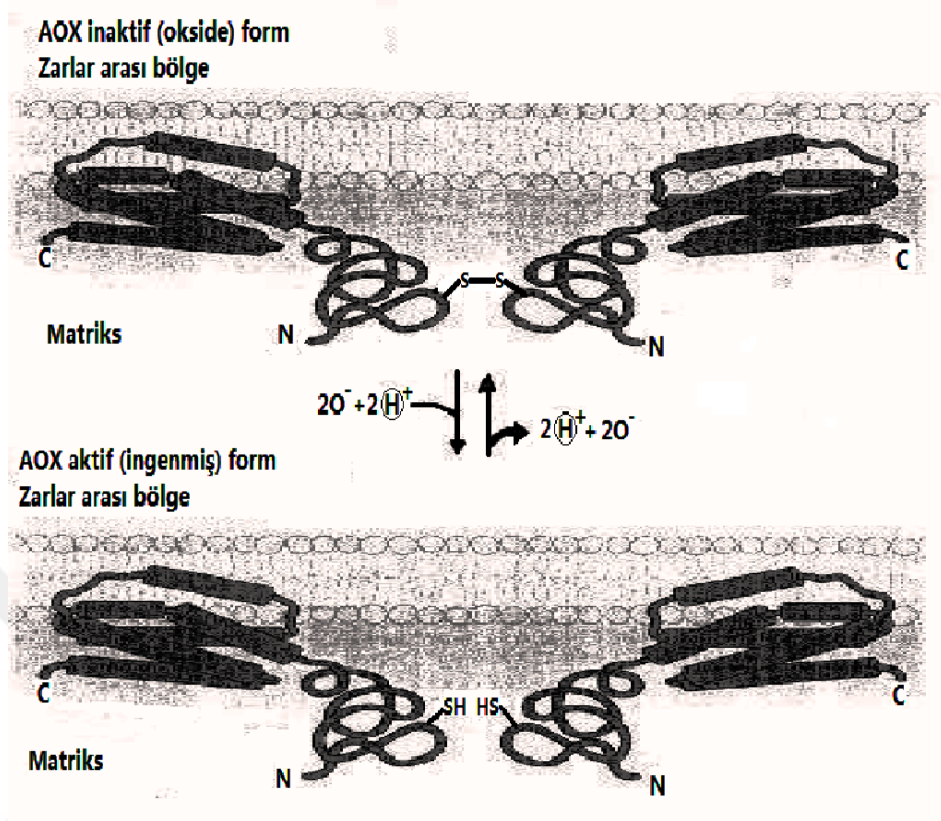
Kompleks I, III ve IV mitokondri iç zarı üzerinden protonların translokasyonu için gerçekleştirilen elektron transportu ile oluşan elektrokimyasal proton gradiyentinden

kaynaklanan enerjiyi kullanır. Zarlar arası boşluğa pompalanan protonların ATP sentaz üzerinden matrikse geçmesiyle birlikte ATP üretimi gerçekleşir (Browse *et al.* 2006).

Kompleks V (ATP sentaz) mitokondri membranına tutturucu F_o -bölgesi ile F_1 -bölgesi olarak tanımlanan baş kısmından oluşur (Stock *et al.* 2000). ATP sentazın iki bölgesi kataliz süresince dönebilen merkez sap ve baş bölgesinin dönmesini önleyen periferik bir sap ile birbirine bağlıdır. ATP sentazın alt ünitelerinin dönmesi mitokondri iç zarlarının iki tarafı arasında bir protein gradienti oluşmasına sebep olur ki; bu gradiyent farkı ADP fosforilasyonunun temelidir (Dudkina *et al.* 2006).)

Hayvanlardan farklı olarak mantar, bitki, ve bazı protistler, son elektron alıcısı olan O_2 'e NADH ve NADPH dan gelen elektronların taşınımı için ilave enzimler içerirler (Vanlerberge and McIntosh 1997; Rasmusson *et al.* 2004). Bu enzimlerin, her biri bir tip polipeptidden oluşur ve proton pompalayamazlar. Bununla birlikte proton pompalamayan ve iç mitokondri membranının iç ve dış yüzeylerine konumlanmış NAD(P)H dehidrogenazlar içerirler (Şekil 1.3). Bitki mitokondrileri, bu dehidrogenazlar aracılığıyla matriks ve sitosölden gelen NADH ve NADPH'ları direkt olarak okside edebilme kabiliyetine sahiptirler (Rasmusson *et al.* 2004). Ayrıca bitki solunumundaki ETS zinciri UQH_2 'i okside eden ve O_2 'i indirgeyen ve yine proton pompalamayan alternatif oksidaz (AOX) içerir.

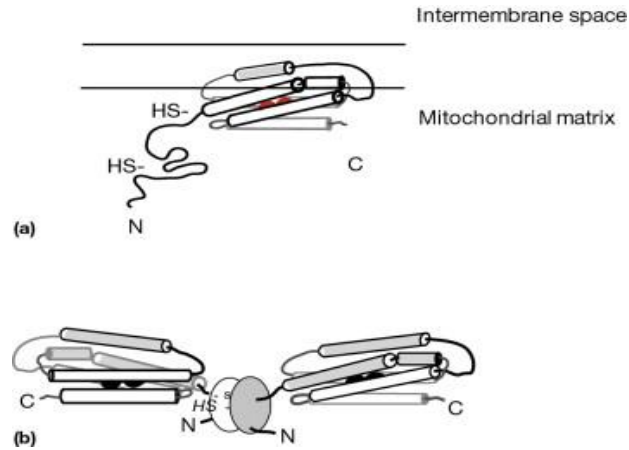
AOX üzerinden elektron transferi ile elektronlar, proton pompalanan üç bölgenin ikisinden (Kompleks III ve IV) geçmez ve alternatif yolda UQ ve oksijen arasında enerji elde etme yeri bulunmadığından bu yol ile elektronların transferinden kaynaklanan enerji ısı olarak yayılır (Vanlerberghe and McIntosh 1997; Millenaar and Lambers 2003).



Şekil 1.4. Alternatif oksidazın redoks aktivasyonu (Yaniv 2002).

Bitkilerde mitokondri iç zarına sıkıca bağlanmış integral membran proteini olan AOX homodimer formda bulunur ve indirgenmiş (dimer 70 kDa) veya yükseltgenmiş (monomer, 36 kDa) formlarda bulunabilir (Şekil 1.4).

Mitokondri iç zarları arasında homo dimerik olarak heliks şeklinde yerleşmiştir (Umbach and Siedow 1993; Siedow *et al.* 1995).



Şekil 1.5. AOX enziminin diagramatik yapısı

(a) AOX monomeri, (b) bitkilerde bulunan dimerik AOX yapısı. İki kırmızı nokta (a) iki demir merkezini göstermektedir, (b) şeklinde siyah gösterilmiştir.

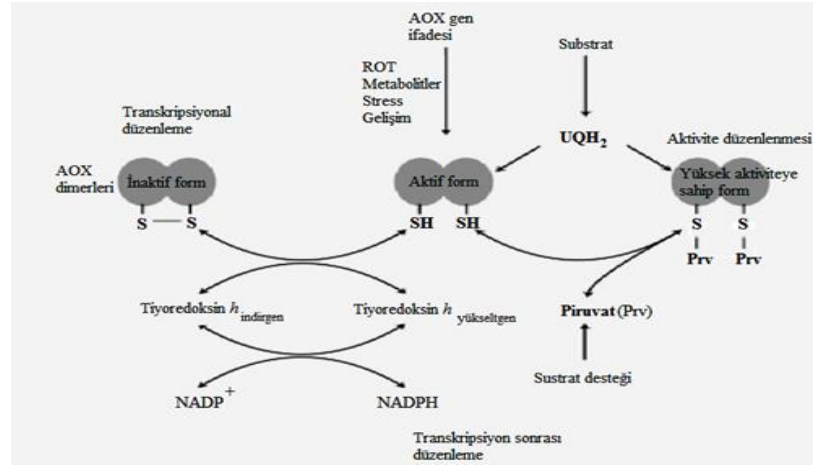
Mitokondri iç zarında dimer olarak bulunan AOX'in inaktif formu dimerlerin birbirine kovalent bağlarla bağlanmış şeklidir (Vanlerberghe *et al.* 1999).

AOX enzimi, disülfid bağlarının indirgenmesi ile aktive olur (Şekil 1.4) (Umbach and Siedow 1993).

Disülfid bağlarının indirgenmesi, NADPH'lar tarafından başlangıçta indirgenen mitokondriyal tiyoredoksinler tarafından gerçekleştirilir (Şekil 1.4) (Laloi *et al.* 2001; Gray *et al.* 2004). Tiyoredoksinler, disülfid bağlarını indirgemek suretiyle enzimleri düzenler ve bu düzenlemede muhtemelen redoks-aktif sisteinler de rol alır.

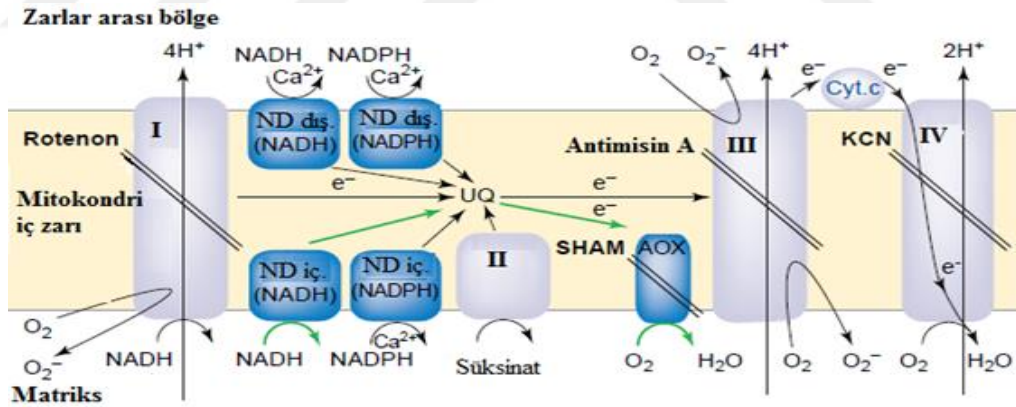
Tiyoredoksinler hücrede redoks reaksiyonlarını düzenlemekle sorumlu olan küçük proteinlerdir. Her yerde hazır halde bulunan bu proteinler prokaryotların, ökaryotların tümünde ve fotosentetik organizmaların büyük bölümünde işlevseldir (Schürmann and Jacquot 2000; Baughan *et al.* 2002).

*In vitro*da AOX homologlarının çoğunun da yine başlangıçta piruvat ve diğer keto asitlerle stimüle edildikleri rapor edilmiştir (Millar *et al.* 1993; Vanlerberghe *et al.* 1995; Rhodas *et al.* 1998).



Şekil 1.6. Mitokondride AOX in regülasyonu ve yapısı (Taiz and Zeiger Web 11.3)

AOX aktivitesi salisilhidroksamik (SHAM) asit tarafından inhibe edilir. SHAM indirgenmiş ubikinondan oksijene elektronların akışı engeller (Şekil 1.7) (Schonbaum *et al.* 1971; Michae 1989).



Şekil 1.7. Mitokondrial elektron transport kompleksleri ve inhibitörleri (Moller 2002)

Termojenik bitkilerde tespit edilmiş aşırı ısı üretimi artan O_2 tüketimi ile alakalıdır. Örneğin, ortam sıcaklığı $5^\circ C$ iken *Philodendrum selloum* bitkisi çiçeklerinin sıcaklığını yaklaşık $40^\circ C$ civarına yükseltebilir (Nagy *et al.* 1972). Bir nilüfer türünde (*Nelumbo nucifera*), termogenezis boyunca oksijene elektron akışının çoğunlukla AOX üzerinden gerçekleştiği rapor edilmiştir (Watling *et al.* 2006).

Enerjiyi paylaştıran mekanizma olarak Alternatif oksidaz (AOX) ilk kez termojenik bitkilerde bazı dokularda ısı üreten sistem olarak keşfedilmiştir (Meeuse 1975).

Bu yolla ısı üretiminin anterlerde aromatik bileşikler buharlaştırmak ve pollinatörleri cezbetmek amacıyla kullanıldığı da tespit edilmiştir (Meeuse 1975).

Arum maculatum bitkisinde polinasyon süresince AOX in aktif olduğu apendiks bölgesinde sıcaklığın hava sıcaklığından 15°C daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Meeuse 1975).

McCain and Hill (1977)'nin kışlık ve yazlık buğday çeşitlerini araştırmalarında kullanarak alternatif oksidaz kapasitesindeki farkı tespit etmişlerdir. Araştırmacılar yazlık buğdaya göre kışlık buğdayın daha fazla alternatif oksidaz kapasitesine sahip olduğunu saptamış ve soğuğa tolerans ile alternatif oksidaz kapasitesi arasında pozitif bir korelasyonun olabileceği fikrini öne sürmüşlerdir. Benzer bir çalışma da aynı araştırmacılar dört farklı buğday kültüründe etiyole yapraklardan izole ettikleri mitokondrilerde alternatif solunum kapasitesinin kültürlere oranla kompleks III respirasyon değerinin %8 ile %35 arasında değişim gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Öte yandan çiçeklerde termoregülasyonun, tozlaşmayı (polinasyon) sağlayan böcekler için termal bir ödül olduğunu gösteren kanıtlar rapor edilmiştir (Seymour *et al.* 2003).

Sitokrom yolunun aksine, AOX antimsin A ve siyanide dayanıklıdır. Siyanid ve antimsin A- dayanıklı O₂ tüketimi bütün angiospermelerde, çoğu mantar ve protistlerde yaygındır (Vanlerberghe ve McIntosh 1997). Bitkilerde okside edilen solunum substratlarının büyüme, depolama veya ATP sentezi için gereksinim duyulandan daha fazla olması durumunda, alternatif yolun bu substratların okside edildiği, diğer bir deyişle “enerji fazlalığı” yolu olarak işlev gördüğü ileri sürülmüştür (Lambers 1982). Bu görüşe göre, ancak elektronların esas solunum yolu aktivitesinin doygunluğa ulaşmasından sonra alternatif yolu kullandıkları belirtilmiştir. Fakat unutulmaması gereken önemli bir nokta, *in vivo* ortamda eğer solunum hızı hücrenin ATP ihtiyacını

karşılar (ve ADP seviyesi çok düşerse) ancak o zaman doygunluk meydana gelebilir. Bununla birlikte sitokrom yolunun doygunluğa ulaşmasından önce de alternatif oksidazın aktif olabileceği gösterilmiştir (Fiorani *et al.* 2005). Böylece alternatif oksidaz, mitokondriye biyosentetik reaksiyonlarda kullanılan karbon iskeletinin sentez ve ATP'nin nispi üretim hızlarını ayarlama olanağını sağlar.

Alternatif yolun diğer bir işlevinin, mitokondride solunumu engelleyen çeşitli streslere (fosfat eksikliği, soğuk, kuraklık, osmotik stres v.s.) karşı bitkilerin oluşturduğu bir yanıt olabileceği belirtilmiştir (Wagner and Krab 1995). Elektron taşıma zincirinden elektronların boşalmasıyla alternatif yol, ubikinon havuzunun aşırı indirgenme potansiyelini engeller. Eğer bu yapılmazsa, söz konusu elektronlar süperoksit anyonları ve hidroksil radikalleri gibi zararlı reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açabilir. Bu şekilde alternatif yol, solunum üzerindeki stresin zararlı etkilerini azaltabilir (Wagner and Krab 1995; Moller 2001).

Memelilerin mitokondrilerinde toplam oksijen tüketiminin %1-5'inin (Chance *et al.* 1979), bitki mitokondrilerinde ise yaklaşık %1'inin ROS üretimi ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (Puntarulo *et al.* 1988). Diğer taraftan bitki mitokondrilerinde solunumla ROT üretiminin artan AOX aktivasyonu ile azaldığı rapor edilmiştir (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 (Hoefnagel *et al.* 1995; Lambers, 1982; Rasmusson *et al.* 2009).

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).

AOX proteinindeki bu değişimler stres şartları altında artan ROS miktarının AOX proteinini kodlayan gen ekspresyonunu artırdığı şeklinde bir yaklaşımla açıklanmıştır. Mitokondriler, özellikle kompleks I ve kompleks III'ün bulunduğu kısımlardaki

salınımının büyük katkısıyla ROT üretiminin bitkilerde kloroplastlardan sonra en yaygın olduğu bitki organelidir (Noctor *et al.* 2007).

Bitki mitokondrisinde ROS'un kaynağı, süperoksit radikalının üretildiği kompleks I ve kompleks III'tür ve süperoksit radikalının artması toksik hidrojen peroksit radikalının birikmesine yol açar (Braidot *et al.* 1999; Navrot *et al.* 2007).

Stres şartları altında AOX gen ekspresyonunun artması durumu AOX' ın ubikinon indirgenme düzeyini azaltmak ve böylece ROT üretiminin azalması şeklinde yorumlanmıştır (Purvis and Shewfelt 1993; Møller 2001; Rhoads and Subbaiah 2007). Bununla birlikte AOX aktivitesinin ortamdaki moleküler oksijen miktarının azalmasına katkıda bulunarak ROT üretiminin engellenmesine yardımcı olabileceği de bildirilmiştir (Gupta *et al.* 2009).

Bunlara ek olarak AOX indirgenmiş oksijenin suya dönüşümünde de görev alır. AOX üzerinden aktarılan dört elektron için bir su molekülü oluşur (Siedow and Moore 1993). Bu durum organelin içinde oksijen-su konsantrasyonunun stabil kalmasına destek olur ve mitokondrideki ROS üretiminin kısıtlanmasında da etkilidir (Maxwell *et al.* 1999).

AOX karbon metabolizması, elektron transportu ve ATP döngüsü arasındaki tıkanıklığı tolere eder ve böylece karbon iskeleti, ATP ve indirgenmiş güç desteğine ihtiyacı olan diğer metabolik süreçlerle solunum arasındaki entegrasyonu sağlayarak solunumun optimize edilmesinde görev alır (Finnegan *et al.* 2004; Vanlerberghe *et al.* 2009).

Termojenik olmayan bitkilerde soğuk uygulamasının AOX aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir (Vanlerberghe and McIntosh 1997; McIntosh *et al.* 1998; Zhou and Solomos 1998; Calegario *et al.* 2003).

Fiorani *et al.* (2005) 12°C'de büyütülen *Arabidopsis* bitkisinde AOX proteini miktarının daha sıcak koşullarda yetiştirtenlere nazaran oldukça yüksek olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca AOX'ı eksik olan bitkiler için düşük sıcaklık şartlarının daha büyük tehdit

oluşturduğu saptanmıştır. Aynı araştırmacı soğuk stresine maruz bırakılarak yetiştirilen transgenik *Arbidopsis* bitkisinde AOX protein düzeyinin yaprak fenotipinde farklılıklara neden olduğunu gözlemlemiştir.

Searle *et al.* (2010) sıcak ayları soğuk aylarla karşılaştırdığında, soğuk aylarda alp çimenlerinin sitokrom yoluna oranla daha fazla AOX proteini içerdiğini ifade etmiştir. Bu çalışma neticesinde, benzer şekilde bir takım çalışmalar sıcak ortamlarda gelişen bitkilere kıyasla soğuk ortamlarda gelişen bitkilerin daha fazla AOX proteini içerdiğini belirlemişlerdir (Campbell *et al.* 2007; Umbach *et al.* 2009; Wang *et al.* 2011).

Bu çalışmanın bulguları, daha sonraki zamanlarda Nobuyuki *et al.* (2008)'in araştırmasıyla da desteklenmiştir. Soğuğa hassas ve toleranslı iki buğday çeşidiyle yapılan çalışmada araştırmacılar, 22°C'de iki hafta yetiştirildikten sonra 4°C'ye transfer edilen buğday varyetelerinde hassas türe göre toleranslı buğday varyetesinin alternatif solunum yolunun daha ciddi bir artış gösterdiğini belirlemişlerdir. Yine aynı araştırmacılar toleranslı buğday varyetesinde AOX proteini gen transkripsiyonunun hassas varyeteye göre daha yüksek olduğunu tespit ederek soğuk aklimasyonu ve donma toleransı ile mitokondriyal alternatif solunum yolunun ilişkili olduğu fikrini öne sürmüşlerdir.

Wang *et al.* (2011)'in yaptığı çalışmada yabani tip, AOX ekspresyonu baskılanmış tip ve AOX ekspresyonu artırılmış transgenik *Nicotiana tabacum* bitkilerini 28/22°C ideal yetiştirme ortamından 12/5°C'lik soğuk şartlara aktarıldıktan sonra 24 saat içinde yaprak dokusunda AOX1a mRNA ve AOX proteini düzeylerinin yüksek oranda arttığını saptamışlardır. Aynı çalışmada araştırmacılar, yaprak şeker düzeyinin AOX düzeyinin artması ile doğru orantılı olarak arttığını tespit etmişlerdir. Yine AOX ekspresyonu baskılanmış transgenik bitkilerin lipid peroksidasyon düzeyinin yabani tipe göre anlamlı değerde artış gösterdiği tespit edilmiştir. AOX ekspresyonu transgenik olarak artırılmış bitkilerdeki MDA seviyesinin ise yabani tip tütün bitkisine kıyasla daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

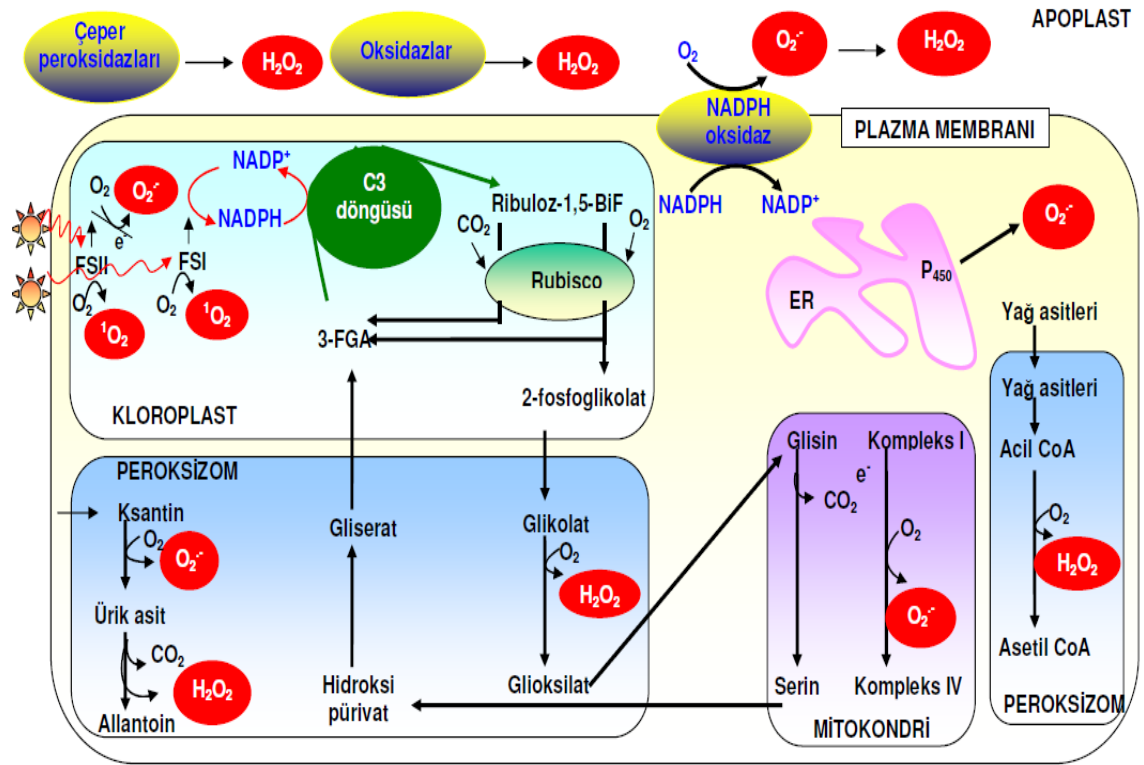
Alternatif solunum yolu üzerinde yapılan çalışmalar, enzimin antioksidant oluşumunu engelleme özelliği ve aktifleşmesi durumunda bitkideki içsel ROS oluşumunda azalmaya yol açtığı bilindiğinden dolayı, stres fizyolojisinde giderek daha fazla ilgi görmeye başlamıştır. Ancak söz konusu metabolik yolun, çeşitli stres durumlarında ve bazı bitkilerde polinasyon ve meyve olgunlaşması aşamasında aktif olduğu bilinmekle birlikte, bu metabolik yolun soğuk stresi ile ilişkisi hakkında pek fazla bilgi mevcut değildir. Kaldı ki, bu metabolik yolun, soğuğa dirençli ve dirençsiz olan bitkilerin varyeteleri arasında nasıl bir değişim gösterdiğine dair doyurucu bir bulguya rastlanmamaktadır.

Bu araştırma, literatürde eksik olan bu kısmı tamamlamak, yani alternatif solunum yolunun aktivitesinin, soğuğa dirençli ve dirençsiz bitki türleri ve bu türlere ait varyeteler arasında, tre özgü üşüme sıcaklıkları uygulandıktan sonra, nasıl bir değişim gösterdiğini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu varyetelere ait tohumlar Çimlendirilerek büyütülmüş ve elde edilen bitkilere, kontrollü düşük sıcaklık uygulamaları yapıldıktan sonra, birçok stres parametresinin yanı sıra, AOX aktivitelere bakılarak, herbir türün varyetelerine ait kontrol grupları ve bunların soğuk uygulanmış grupları arasında mukayeseler yapmak sretiyle, söz konusu olan “soğuğa dirençlilik” ile “mitokondriyal alternatif solunum yolu aktivitesi” arasındaki ilişkinin varlığı belirlenmeye çalışılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Reaktif Oksijen Türleri

Düşük sıcaklık stresini de içine alan çevresel stresler, hücrel redoks dengesini bozarak oksidatif zarara ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) fazla miktarda üretilmesine neden olurlar (Bolwell *et al.* 2002; Mittler *et al.* 2002; Asada 2006). Oksidatif stres süresince, ROT'lar bitki hücresinin mitokondri, kloroplast, peroksizom ve nükleus gibi farklı kısımlarında meydana gelerek hücrede zarara ve hatta ölüme bile neden olabilirler (Şekil 2.1.). Diğer taraftan, ROT'lar hücre içerisinde redoks sinyali ve antioksidan savunma mekanizmasını harekete geçirmede önemli rol oynarlar (Siddiqui *et al.* 2010).



Şekil 2.1. Bitki hücrelerinde AOT'lerin oluşabileceği bölgeler

(3-FGA, 3-fosfoglikolat; ER, endoplazmik retikulum; 1O_2 , singlet oksijen) (Vranova *et al.* 2003; Doğru 2006)

Reaktif oksijen türleri bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektronu olan, kısa ömürlü, kararsız, düşük molekül ağırlığına sahip ve reaktif moleküller olarak tanımlanabilirler. Başka moleküllerle kolayca elektron alış-verişine girerek onların yapısını bozan bu moleküllere ‘Serbest Radikaller, Oksidan Moleküller ya da Reaktif Oksijen Türleri’ adı da verilir. Reaktif oksijenler iki gruba ayrılırlar;

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

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

2.1.1. Singlet oksijen (1O_2)

Oksijenin yüksek enerjili formudur. Singlet oksijen, eşleşmiş iki elektron aynı orbitalde veya farklı orbitallerde zıt spinler halinde bulunduklarında oluşur. Eşleşmemiş elektronu bulunmadığı için radikal özelliği yoktur, ancak oksidan özelliği oldukça yüksektir. Singlet oksijen çok değişik yollarla kimyasal veya fotokimyasal olarak üretilir. Bitkilerde singlet oksijenin en iyi bilinen üretim yolu fotokimyasal olup, fazla miktarda ışık enerjisi absorblayan klorofilden oksijene enerji aktarılmasıyla alakalıdır. Esas kaynağı, fotosentez reaksiyonlarında elektron transport sistemindeki klorofil pigmentleridir (Foyer *et al.* 1997; Güler 2008). Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girerler. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. 1O_2 birçok organik molekülle tepkimeye girdiğinden yüksek oranda yıkıcıdır ve canlı organizmada hasara neden olan başlıca oksijen türlerindendir. (Cadenas 1989; Durmuş 2003). Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan reaksiyona girerek peroksit radikalini oluştururlar ve $\cdot OH$ kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonu başlatabilirler. Hücre zarlarının glikolipid, fosfolipid, sterol ve gliserid yapısındaki

doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, aldehitler, hidroksi yağ asitleri ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumuna yol açarlar (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003; Mutlu 2009).

2.1.2. Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$)

$O_2^{\cdot-}$ şeklinde formülize edilen ve moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle hızlıca oluşan bir anyondur. Süperoksit radikali enzimatik ya da nonenzimatik (enzimatik olmayan) reaksiyonlarla meydana gelebilir. Bu radikal oldukça reaktiftir ve lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna neden olur. Bu radikalın lipid peroksidasyonu, membran hasarı, hücresel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırıklarına sebep olduğu belirtilmiştir (Fridovich 1995; Mutlu 2009). Süperoksit radikali hidrojen peroksitle reaksiyona girerek çok daha toksik bir molekül olan hidroksil radikalini oluşturabilir. Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinen bu reaksiyon, demir ve bakır gibi metallerin katalizörlüğünde oldukça hızlı gerçekleşir. Süperoksit radikali, yüksek katalitik etkiye sahip süperoksitdismutaz (SOD) enziminin etkisiyle dismutasyona girerek konsantrasyonu azaltılır (Halliwell 1984; Halliwell and Gutteridge 1999).

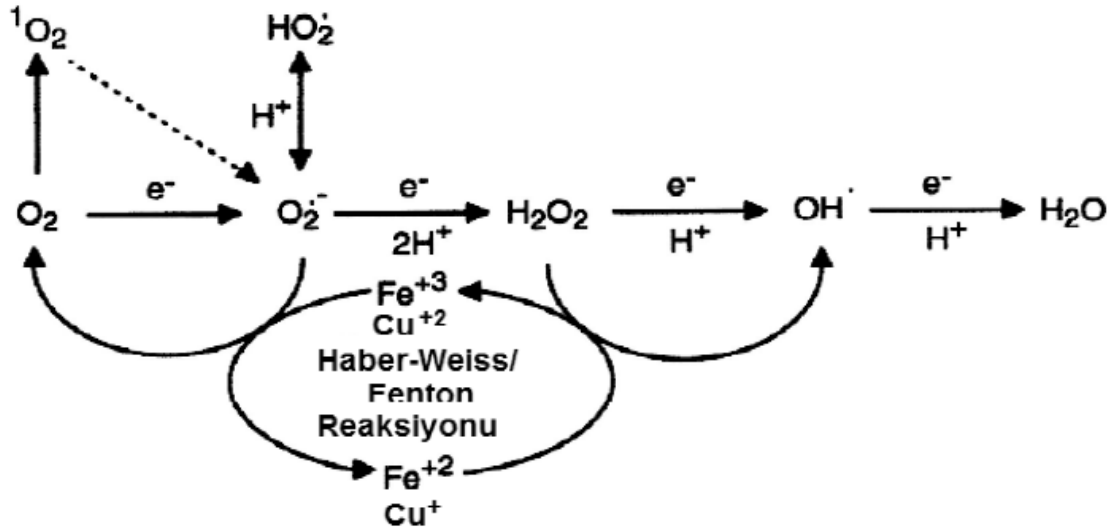
2.1.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Oksijenin enzimatik olarak iki elektron alarak indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya nonenzimatik (enzimatik olmayan) dismutasyon reaksiyonları neticesinde meydana gelirler. Süperoksitin nonenzimatik yıkımı nötral ve düşük asidik pH'da spontan, enzimatik yıkımı ise süperoksitdismutaz enzimi aracılığıyla gerçekleştirilir. Süperoksitin olduğu yerlerde (peroksizomlar, elektron taşıma zinciri, plazma membranı, ekstraselüler matriks) fazla miktarda H_2O_2 'de üretilir (Slesak *et al.* 2007). Zayıf bir asit olmasına karşın güçlü oksidasyon özelliğine sahiptir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz. Radikal olmadığı halde H_2O_2 'nin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında serbest oksijen radikalleri içinde en yüksek derecede toksisiteye

sahip olan hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır. H_2O_2 özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile reaksiyona girerek yüksek oksidasyon seviyesindeki reaktif demir formlarını meydana getirir. Bu formdaki demir güçlü oksitleyici özelliktedir ve hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin bulunduğu ortamdan uzaklaştırılması gerekir (Halliwell 1984; Güler 2008). Bunu katalaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzimler, H_2O ve O_2 gibi ürünlere dönüştürerek gerçekleştirir. Oksidatif streslere toleransda bitkilerin bu enzimlerin hücresel seviyelerini düzenlemesi oldukça önemlidir (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003).

2.1.4. Hidroksil radikali ($\cdot OH$)

Oksijen radikalleri içerisinde en aktif ve en toksik olanıdır (Elstner 1982; Baskin and Salem 1997; Sigel and Sigel 1999; Kehler 2000). Üretildiği her ortamda birçok molekül ile tepkimeye girer. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun (x ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması neticesinde oluşabileceği gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyona girerek eksik indirgenmesiyle de oluşabilir (Stahl and Sies 2002). Biyolojik sistemlerin bilinen en reaktif türü olan $\cdot OH$, su dahil karşılaştığı her molekülle reaksiyona girebilir. Tüm bu reaksiyonlar $\cdot OH$ 'ın paylaşılmamış elektron ihtiva eden dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell 1984). Lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonu, $\cdot OH$ radikalının neden olduğu en önemli hasardır. $\cdot OH$ 'ın öncelikli hedefi yağ asitleridir, zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırarak hücre ölümüne neden olabilir (Girotti 1985; Nishiyama *et al.* 1998).



Şekil 2.2. Moleküler oksijenden (O_2) kaynak alan ROT'ların kendi aralarındaki dönüşümleri

* O_2 aşırı enerjiyle eşleşmemiş elektronlardan birinin ters dönmesi sağlanarak, aktif hale gelir ve singlet oksijen oluşur (1O_2). O_2 'nin bir elektron alarak indirgenmesi süper oksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalinin oluşumuna sebep olur. Süperoksitin hidroperoksil radikali ($HO_2^{\cdot}$) şeklinde ifade edilir. Daha sonraki indirgenme aşamalarında ise hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ve su (H_2O) meydana gelir. Hücrelerde yükseltgenmiş formda mevcut olan metal iyonları (Fe^{+3} , Cu^{+2}), süper oksit varlığında indirgenirler ve dolayısıyla, Fenton ya da Haber-Weiss reaksiyonları tarafından H_2O_2 'nin $OH^{\cdot}$ 'a değişimi katalizlenebilir (Vranová *et al.* 2002).

2.2. Lipid Peroksidasyonu

Reaktif oksijen türleri (ROT) lipid, protein, karbohidrat ve nükleik asitler gibi hücrelerin temel bileşenleri üzerinde etkili olurlar. Özellikle çift bağların bulunduğu doymamış yağ asitlerini içeren lipidler, ROT'lar ile kolayca reaksiyona girmektedirler (Blokhina *et al.* 2003; Halliwell 2006; Mittler 2006). Membran yapısı ve fonksiyonu üzerinde ROT'ların etkilerinin en çok araştırılanlarından birisi, lipid peroksidasyonudur (Blokhina *et al.* 2003). Lipid peroksidasyonu (LPO), doymamış yağ asitlerinin oksidatif olarak yıkılması anlamında kullanılan bir terimdir. Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerini meydana getirirler. Yine çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır ve çok fazla zararlıdır. Çünkü reaksiyon, zincir şeklinde kendiliğinden ilerler. LPO ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Heath and Packer 1968; Girotti 1985; Akkuş

1995; Halliwell and Gutteridge 1999). Biyolojik sistemlerde LPO'yu başlatan serbest radikallerin, süperoksit anyonu ile özellikle hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidinin radikal özellikte olmasına sebep olmaktadır. Molekül içi konjuge edilen bağlarının farklı pozisyonlara gelmesi ile değişikliğe uğrayabilen kararsız lipid radikalının moleküler oksijenle tepkimesi neticesinde lipid peroksit radikali oluşur (Spiteller 2001; Kuru 2007). Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir. Lipid-hidroperoksitlerinin yıkımı ile meydana gelen ve biyolojik açıdan reaktif olan aldehitler ya hücrese düzeyde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olarak hücrenin farklı kısımlarını hasara uğratırlar. Üç ya da üçten daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehid (MDA) oluşur (Heath and Packer 1968; Girotti 1985; Yılmaz and Ozan 2003). MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir. Ancak lipid peroksidasyonunun seviyesi ile güçlü bir korelasyon gösterir. Bu nedenle organizmada oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü çok sık kullanılan bir yöntemdir. MDA, tiobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturur ve oluşan bu çözeltinin absorbans değerlerinden LPO'nun derecesi saptanmaktadır (Halliwell 2006; Ahmad *et al.* 2008).

2.3. Antioksidan Enzimler

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

2.3.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

İlk kez Mann and Keilis'in (1938) izole ettiği bu enzim, McCord and Fridovich (1969) tarafından katalitik fonksiyonu tespit edilinceye dek indofenoloksidaz,

tetrazoliumoksidaz, eritrocuprein gibi adlandırmalarla tanımlanmıştır. SOD, süperoksid radikalının ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen metal içerikli bir enzimdir (Sairam and Srivastava 2000; Eyidogan *et al.* 2003; Minibaeva and Gordon 2003).

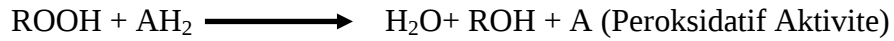
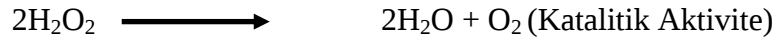


SOD, süperoksidin parçalanmasını sağlayarak metallerin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonu ile hidroksil radikalının meydana gelme riskini azaltır. ROT'a karşı antioksidan savunma mekanizmasının ilk hattı olan ve tüm aerobik organizmalarda ve aktif hale gelmiş oksijen üreten bütün hücre kısımlarında bulunabilen bu enzimin aktivitesinin değişik streslere cevapta artış gösterdiği ve bu artışların strese karşı direnç gösterme konusunda bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Bowler *et al.* 1991; Van Camp *et al.* 1994; Foyer *et al.* 1997; Apel and Hirt 2004). SOD'un üç farklı bakır/çinko (Cu/ZnSOD), mangan (MnSOD) ve demir (FeSOD) izoenzimi vardır ve KCN ve H_2O_2 'ye hassasiyetlerine bağlı olarak belirlenirler ve hücre kısımlarındaki dağılımları değişiklik gösterir. MnSOD her iki inhibitöre karşı dirençli olup prokaryot organizmalar ve ökaryot hücrelerin mitokondrisinde bulunur, Cu/ZnSOD her iki inhibitöre duyarlıdır ve yüksek yapılı bitkilerin sitoplazma ve kloroplastlarında (Scandalios 1993; Güler 2008), FeSOD ise, H_2O_2 'ye duyarlı, KCN'ye dirençli olup, bazı bitki türlerinin kloroplastlarında ve prokaryot organizmalarda bulunabilirler (Bowler *et al.* 1992; Güler 2008).

2.3.2. Katalaz (CAT)

Yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 'nin iki elektronunu kullanarak su ve oksijene indirgenmesi için katalizör olarak görev yapan demir porfirin içerikli tetramerik ve yüksek molekül ağırlığı olan bir enzimdir (McClung 1997; Chaudiere and Ferrari 1999).

Bununla beraber CAT, düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içerikli indirgenmiş bileşikleri (substratları) kullanarak peroksidatif aktivite gösterebilir (Chaudiere and Ferrari 1999). CAT'ın görev aldığı reaksiyonlar aşağıdaki gibidir.



En yüksek hızla reaksiyon veren enzimlerden biridir. Bir molekül katalaz, bir saniyede milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü su ve oksijene dönüştürür (Dhindsa *et al.* 1981; Scandalios 1994; Willekens *et al.* 1997). CAT'ın bitki dokusundan H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında önemli roller aldığı bildirilmiştir (Patykowski and Urbanek 2003). Solunum zincirinde, oksijenin eksik indirgenmesinden oluşan H_2O_2 'yi O_2 'ye indirger (Chaudiere and Ferrari 1999). CAT'ın temel fonksiyonu, moleküler O_2 varlığında metabolizmanın bazı basamaklarında sentezlenen, radikal karakterli H_2O_2 'nin ve ROOH gibi bir peroksitin radikal özelliğini yok ederek özellikle membranlarda oluşabilecek geri dönüşümü mümkün olmayan hasarları engellemektedir. Zira H_2O_2 , singlet oksijen (1O_2) ve hidroksil radikallerinin ($OH^\cdot$) potansiyel kaynağıdır (Scandalios 1993; Chaudiere and Ferrari 1999). CAT kararlı bir enzim olmamakla beraber yüksek ışık yoğunluğu ve strese maruz kalan bitki hücrelerinde oluşan H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarıyla inhibe edilebilir (Streb *et al.* 1993). H_2O_2 'ye olan zayıf afinitesi ve sadece peroksizomlarda bulunması (çok az miktarda mitokondri matriksinde bulunurlar) CAT'ın etkinliğini azaltmaktadır (Asada 1992; Scandalios 1993).

2.3.3. Peroksidaz (POD)

Peroksidazların pek çok fizyolojik olayla ilişkili olduğu ve metabolizmada aktif rol oynadığı belirlenmiştir (Bunkelmann and Trelease 1996; Laloue *et al.* 1997; Erdei *et al.* 2002; Durmuş 2003). Stres altındaki bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Asada 1992). POD, elverişsiz çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve bitki hücresinin en önemli koruyucu

enzimlerinden birisidir (Bakardjieva and Christov 1996; Dehon *et al.* 2002). Molekül ağırlıkları 35-100 kDa arasında değişmektedir. Peroksidazlar, ROT'ların ortamdan uzaklaştırılmasında SOD ve CAT ile koordineli bir şekilde önemli rol oynayan, çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahip, hem grubu ihtiva eden oksidaz grubu enzimlerdir. H_2O_2 'yi kullanarak fenoller ve hidrokinonlar gibi çok sayıda aromatik bileşenlerin dehidrojenasyonunu katalizleyen (Bergmeyer and Grabl 1983) ve hem(demir) prostetik grubuna sahip bir proteindir (Banci 1997; Kim *et al.* 2000). POD'lar hidrojen vericisi olarak birçok organik ve inorganik substratı (AH_2) kullanarak H_2O_2 'nin zararlı etkisini ortadan kaldırırlar. Aşağıdaki reaksiyonu katalizlerler.



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

2.3.4. Askorbat peroksidaz (APX)

İki molekül askorbat kullanarak hidrojen peroksiti suya dönüştüren antioksidan enzim askorbat peroksidazlar (APX)'dir (Noctor and Foyer 1998). Bu reaksiyon sonucunda askorbat iki molekül monodehidroaskorbata (MDHA) dönüşür. MDHA monodehidroaskorbat redüktaz tarafından tekrar askorbata dönüştürülür (Kumar *et al.* 2011). APX bitki hücrelerinde tilakoid ve mikrozomal mebranlara bağlı formlara, sitoplazmada ve stromada çözünmüş formlarda ve apoplast da olmak üzere en az beş izoformu vardır (Yamaguchi 1995; Noctor and Foyer 1998). APX'in izoformları elektron verici olarak askorbat için spesifik olup, askorbatın yokluğunda aşırı derecede kararsızdırlar (Miyake ve Asada 1996). Sitoplazmada bulunan askorbat peroksidazlar, kloroplastakine benzer ancak askorbat yokluğunda daha fazla kararlı olup askorbattan başka elektron vericilerini de kullanabilir (Ranieri *et al.* 1996; Vanacker *et al.* 1998;

Güler 2008). Askorbat peroksidazlar yaygın şekilde çalışılan guaiakol peroksidazlara benzemesine rağmen H^+ vericisi olarak askorbata olan yüksek spesifikliklerinden dolayı aralarında farklılıklar vardır (Nakano and Asada 1987).

2.3.5. Glutasyon Redüktaz (GR)

NADPH'ı elektron verici olarak kullanan oksitlenmiş glutasyonun (GSSG), glutatyon (GSH) indirgenmesini katalizleyen enzim glutasyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) enzimidir (Ranieri *et al.* 2005; Yannarelli *et al.* 2007).



GSH'nin antioksidan özelliğinden dolayı, glutasyon redüktaz hücrenin antioksidan kapasitesinin devamlılığı için önemlidir (Meister 1983; Creissen *et al.* 1994). GR askorbat glutasyon döngüsünde GSH/GSSG oranını yüksek tutarak hücreleri oksidatif hasara karşı korumada görevli anahtar enzimlerden biridir (Foyer and Noctor 2005). GR diğer enzimlerle birlikte H_2O_2 'nin radikal özelliğinin ortadan kaldırılmasında görev alır. Oksitlenmiş askorbik asiti (dehidroaskorbat) tekrardan askorbik asite indirgeyen dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzimi sustrat olarak GSH'ı kullanmakta ve reaksiyon sonucu GSSG oluşmaktadır. Oluşan GSSG, GR enzimiyle tekrardan GSH'a indirgenir ve böylece dehidroaskorbat redüktaz enziminin substratı yeniden oluşur. Ayrıca GR enzimi GSSG'yi GSH'a indirgerken, NADPH'ı kullanmakta ve böylece CO_2 fiksasyonu sınırlandığı durumlarda, NADPH/NADP⁺ oranının dengelenmesine yardımcı olmaktadır. Bu nedenle GSSG'nin GSH'a indirgenmesi, oksidan temizlenmesinde önemli bir basamaktır ve oksidatif strese karşı savunmada GR'nin önemini ortaya çıkarmaktadır (Aono *et al.* 1995; Creissen *et al.* 1996).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışma esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanıldı:

Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-30°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	: Harris, İngiltere
Elektroforez	: Owl Separation Systems P10DS
Hassas terazi	: Shimadzu AY220
Homojenizatör	: Wiggen Hauser D- 500
İklim dolabı	: Sanyo, Japonya ve Jeno Tech, Kore
Karıştırıcı	: Fisons Whirlimixer
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Otomatik pipetler	: Ependhof
pH metre	: WTW unilab pH metre
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1
Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini-1240
Western blot cihazı	: Bio-Rad Semi Dry Blotting
Western blot görüntileme cihazı	: Fusion Fx Vilber Lourmat
Otoklav	:Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253
Soğutmalı Santrifüj	:Hettich, Mikro 22R, M10, SN 0001279-03-00
Elektroforez Akım Sağlayıcı	:OWL OSP300-2Q, U.S.A.
Su Banyosu	:Memmert WNB14, GERMANY
Buzdolabı	:Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF)
Saf Su Cihazı	:GFL 2004, GERMANY

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Araştırma suresince kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış biçimleri aşağıda belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Fluka şirketlerinden temin edilmiştir.

- 1) 0.05 M KH_2PO_4 (pH: 6.5) (Protein tayini için): 1.7 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH 6.5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
- 2) Coomassie reaktifi (protein tayini için): 10 mg Coomassie Blue G-250, 5 ml etanolde çözülür, üzerine 10 ml %85'lik fosforik asit ilave edilir ve hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlanır.
- 3) %5 lik TCA - trikloroasetik asit (Lipid peroksidasyon için homojenizasyon çözeltisi): 100 mL saf su içerisine 5 g TCA ilave edilerek çözülür.
- 4) %0.5 lik TBA-tiobarbutirik asit (Lipid peroksidasyon için reaksiyon çözeltisi): 100 mL saf su içine 20 gram TCA çözülür ve daha sonra içerisine %0.5 g TBA ilave edilerek iyice çözünmesi sağlanır.
- 5) 0.1 M KH_2PO_4 (pH: 7.0), %1 PVP, 1mM EDTA (hücresel antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu): 2.72 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH 7.0'ye ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlanmış ve üzerine 0.5 g PVP ve 0.04 g EDTA ilave edilmiştir.
- 6) 103.5 mM KH_2PO_4 , pH: 7.5 (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 1.4 g KH_2PO_4 , 80 mL saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e ayarlanmış ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- 7) 40 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 408 μL %30'luk H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 100mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 8) 5 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan): 41 μL %30'luk H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 100mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 9) %5'lik $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ - titanyum disülfat çözeltisi (H_2O_2 miktarı için): 1 gram $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ 20 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

- 10)** %19'luk NH_4OH – amonyum hidroksit (H_2O_2 miktarı için): 20 mL saf su üzerine 4.16 mL NH_3 iave edilerek çözünmesi sağlanır.
- 11)** 2 M'lık H_2SO_4 – sülfürik asit (H_2O_2 miktarı için): 40 mL %98'lik H_2SO_4 alınmış, üzerine 160 mL saf su ilave edilerek hacmi 200 mL'ye tamamlanmıştır.
- 12)** 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8) (SOD için tampon çözelti): 1.7 g KH_2PO_4 200 mL saf suda çözülmüş, pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra ve hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.
- 13)** 13 mM metionin çözeltisi (SOD reaksiyon karışımı için): 0.586 g metionin alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250 mL 50mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 14)** 63 μM NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür (SOD reaksiyon karışımı için): 0.0128 g NBT alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250 mL 50mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 15)** 0.1 mM EDTA-Etilen Diamin Tetra Asetik asit (SOD reaksiyon karışımı için): 0.073 g EDTA alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250mL 50mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 16)** 13 μM riboflavin (SOD aktivitesi için 2. çözelti): 0.019 g riboflavin, 500 mL saf suda çözülmüş, 3 mL'lik reaksiyon karışımının 13 μM riboflavin içermesi için 390 μL riboflavin alınmıştır.
- 17)** 0.1 M Na_2HPO_4 , pH: 5.5 (Peroksidazın aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3.55 g Na_2HPO_4 alınarak 200 mL saf suda çözülmüş ve pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.
- 18)** Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi (5mM guaikol + 5mM H_2O_2): 54 μL quaikol ve 15 μL H_2O_2 'dan ($d=1.13$ g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 mL 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözülerek hazırlanmıştır.
- 19)** 50 mM K_2HPO_4 , 1 mM EDTA pH 7,0, %1 PVPP (GR homojenizasyon tamponu) 0,5 g doku sıvı azot ve 5ml ekstraksiyon tamponunda homojenize edilir.
- 20)** 200 μL 0,5 mM EDTA içerisinde hazırlanmış 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) ve 250 μL 1 mM oksitlenmiş glutatyon (GSSG) ve 500 μL 0,25 mM NADPH ihtiva eden karışım.(GR ölçümünde kullanılan tampon).

- 21)** 1 M Tris-HCl (pH:6.8) (Elektroforezde jel hazırlamak için kullanılan tampon): 12.1 g Tris bir miktar saf suda çözüldükten sonra pH'sı 6.8'e ayarlanmış ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 22)** 1 M Tris-HCl (pH: 8.8) (Elektroforezde jel hazırlamak için kullanılan tampon): 12.1 g Tris bir miktar saf suda çözüldükten sonra pH'sı 8.8'e ayarlanmış ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 23)** %10'luk SDS (Elektroforezde jel hazırlamak için kullanılan çözelti): 1 g SDS üzerine 9 ml saf su ilave edilerek çok hafif ısıtmak suretiyle, şeffaflaşmaya kadar karıştırılmıştır.
- 24)** %30'luk akrilamid çözeltisi (Elektroforez ayırma jelinin hazırlanmasında kullanılan): 30 g akrilamid ve 0.8 g bis-akrilamid saf su ile iyice çözüldükten toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmış, kullanım dışında renkli şişede 4°C'de saklanmıştır.
- 25)** %10'luk akrilamid çözeltisi (Elektroforez yığma jelinin hazırlanmasında kullanılan): 10 g akrilamid ve 2.5 g bis-akrilamid saf su ile iyice çözüldükten sonra üzerine 87.5 ml saf su ilave edilmiş, kullanım dışında renkli şişede 4°C'de saklanmıştır.
- 26)** SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu: 1.5 g Tris ile 7.2 g glisin yaklaşık 50 mL saf suda iyice çözülmüş ve üzerine 5 mL %10'luk SDS ilave edilerek hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.
- 27)** %0.1'lik brom timol mavisi: 0.1 g indikatör boya, 16 ml 0.1 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra su ile hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 28)** SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu: 0.65 mL 1 M Tris-HCl pH: 6.8, 3 mL %10'luk SDS, 1mL %100'lük gliserin ve 1 mL %0.1'lik brom timol mavisinden karıştırılarak toplam hacimleri 10 mL'ye tamamlanarak hazırlanmış ve bu tampona kullanmadan hemen önce 50 µL β-merkaptoetanol ilave edilmiştir.
- 29)** 0,4 M mannitol, 50 mM MOPS, 2mM EGTA, 4 mM L-sistein, %0,6 PVP, 20 mM β-merkaptoetanol, %0,5 BSA (Mitokondri izolasyonu için homojenat tamponu): 3,64 g mannitol, 0,5225 g MOPS 40 ml saf suda çözülüp pH: 7,2'ye ayarlandıktan sonra 0,0388 g EGTA, 0,0242 g L- sistein, 0,3 g PVP, 0,25 g BSA ve 70 µl β-merkaptoetanol, aynı çözeltide çözüldükten sonra son hacim 50 ml'ye ayarlanır.
- 30)** 0,3 M mannitol, 20 mM MOPS, 1 mM EGTA, %0,1 BSA (Mitokondri yıkama tamponu): 2,73 g mannitol, 0,209 g MOPS 40 ml saf suda çözülüp pH: 7,2'ye

ayarlandıktan sonra 0,0194 g EGTA ve 0,05 g BSA aynı çözeltide çözülür. Son Hacim 50 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi

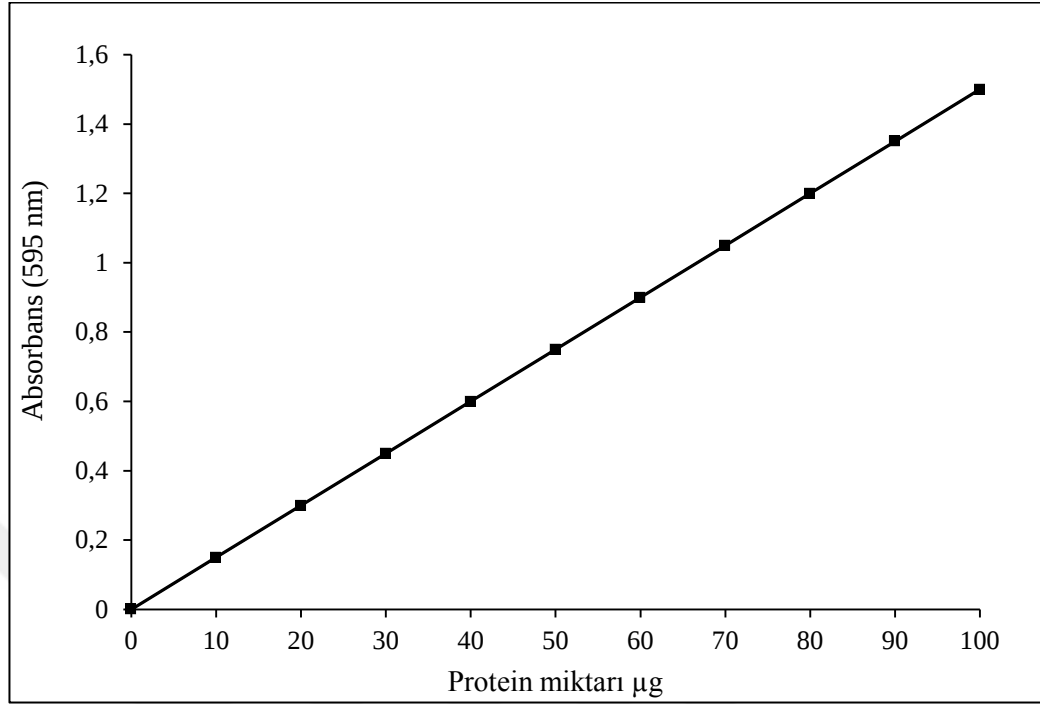
Yapılan çalışmalarda düşük sıcaklığa tolerans yetenekleri farklı olan buğdayın (*Triticum aestivum* cv. Yıldırım, Doğu-88, Ayyıldız, Alparslan) dört ayrı varyetesi, mısırın (*Zea mays* cv. SZE-TC-913, LG, Antisis) üç ayrı varyetesi, fasulye (*phaseolus vulgaris* cv. Elkoca) ve düşük sıcaklığa dayanıklı kara lahana (*Brassica oleracea*) bitkileri kullanılmıştır. Tohumlar Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden ve Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nden temin edilmiştir. Tohumlar ekilmenden 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 5 saat şişmeye bırakılmıştır. Her saksıya saf su ile şişirilmiş tohumlar eşit miktarda ekilmiştir. Bitkiler iklim dolabında kontrol şartlarında (25/20°C sıcaklık ve 14/10 saat ışık-karanlık periyodunda 20.000 lüks, %70 nem) büyütülmüştür. Her saksı, kesileceği güne kadar, günlük eşit miktarda saf su ile sulanmıştır. Buğday bitkisi için 5/2°C, mısır bitkisi için 10/7°C, fasulye bitkisi için 8/5°C, lahana bitkisi için ise 5/2°C sıcaklık değerlerine sahip iklim dolabına aktarılan bitkiler 48 saat sonra hasat edilerek moleküler ve biyokimyasal parametrelerindeki değişimler belirlenmeye çalışılmıştır. Parametre sonuçlarının daha anlaşılır olabilmesi açısından her bir tür aşağıdaki gibi kodlanmıştır.

Çizelge 3.1. Bitkilere ait varyeteler ve kodlamaları

İRK			KOD		
BUĞDAY	Yıldırım	B1	MISIR	SZE-TC-513	M1
	Doğu-88	B2		LG	M2
	Ayyıldız	B3		Antisis	M3
	Alparslan	B4	LAHANA		
FASULYE	Elkoca	F			L

3.3.2. Çözünebilir protein miktarının tayini

Bitkilerin yapraklardan alınan 0,5g'lık örnekler kullanılarak Bradford (1976) metoduna göre protein tayini yapılır. Sonuçlar “mg protein/g taze doku cinsinden hesap edilir. Her bir bitkiye ait yaprak organından 0.5g numune alınarak 10 misli hacimdeki 0.05 M fosfat tamponunda (pH:6.5) havanda ezilerek homojenizasyon yapılır. Homojenat dört katlı tülbentten süzülür ve süzüntü santrifüj tüplerine alınıp, 15.000 rpm'de 20dk. boyunca santrifüj edilir. Protein tayini için tüplerin üst kısmındaki sıvı faz (süpernatant) kullanılır. Protein miktarı spektrofotometrik yolla tayin edilir. Metot için gerekli standart grafik şu şekilde hazırlanır; 1ml'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albumin çözeltisinden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg protein içeren hacimler tüplere aktarılıp, saf su ile bütün tüplerin hacimleri 0.2ml'ye tamamlanır. Bu tüplere 3'er ml de Coomassie reaktifi ilave edilip vorteks ile karıştırılır. Kör numune olarak 0.2 ml aynı tampondan ve 3 ml Coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanılır. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, 595nm'deki absorbans değerlerine karşılık gelen protein değerlerinden yararlanarak standart grafik elde edilir. Standart grafik hazırlama çalışmasında olduğu gibi, bitki organlarından elde edilen özütlerden 0.2 ml alınıp, 3 ml Coomassie reaktifiyle karıştırılır ve 595 nm'de absorbansları ölçülerek, standart grafikten yararlanılıp, 0.2 ml özütteki protein miktarları belirlenir. Daha sonra, gerekli hesaplamalar yapılarak protein miktarları µg protein/g doku olarak tayin edilir.



Şekil 3.1. Protein tayini için kullanılan standart grafik

3.3.3. Lipid peroksidasyon miktarının belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu için 0.5 g yaprak alınarak 5 mL %5'lik TCA içinde homojenize edildikten sonra elde edilen homojenat $10.000 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj edilir. Tüpün süpernatant kısmından 4 mL alınarak üzerine 1 mL %0.5 lik TBA çözeltisi ilave edilir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika inkübe edilir ve reaksiyon tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durdurulur. Örnekler tekrar $10000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısmı alınarak absorbansı 532 nm de okunur ve daha sonra 600 nm deki nonspesifik absorpsiyon için absorbans değeri belirlenir. Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm'de belirlenen değeri çıkarılır ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/g): $[(A_{532} - A_{600})/155000] \times 106$ formülüyle hesaplanır. Sonuçlar MDA(nmol/gram doku) şeklinde verilir (Ananieva *et al.* 2002).

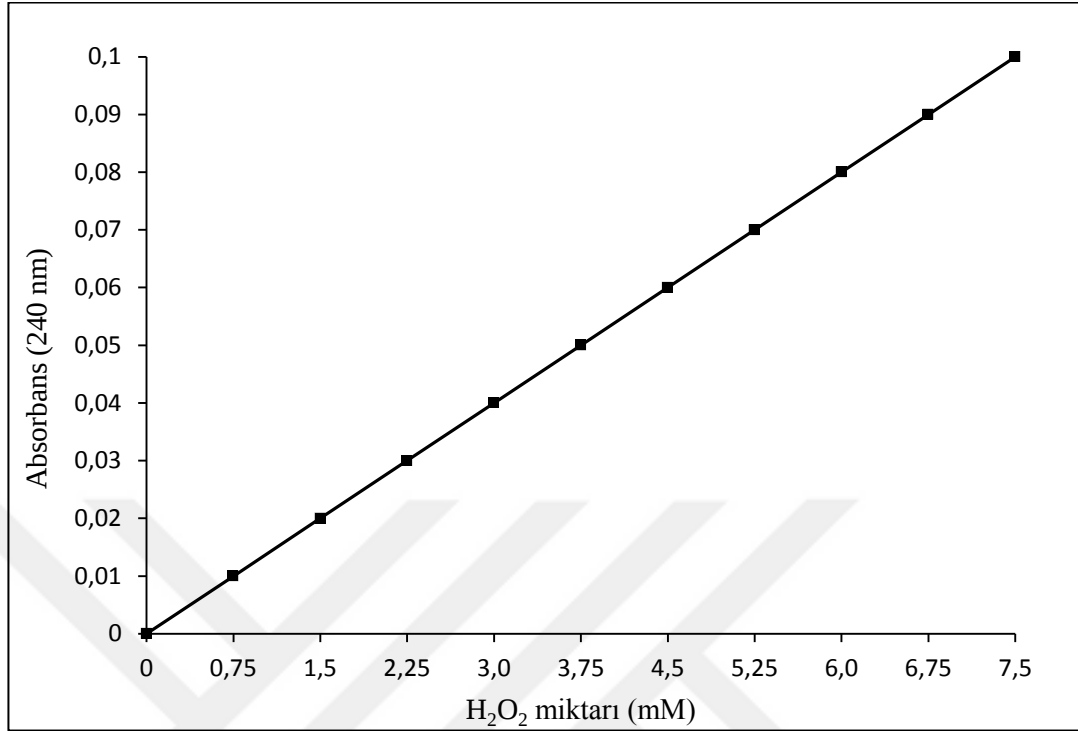
3.3.4. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Kontrol ve soğuk gruplarına ait 0.5 gram yaprak örnekleri 5 ml 0.1 M fosfat tamponunda homojenize edilerek 15000 rpm’de 15 dk santrifüj edilir. Süpernatant kısmı alınarak enzim kaynağı olarak kullanılır.

3.3.4.a. Katalaz (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 konulur, tüplerin hacimleri saf su ile 1.5 mL’ye tamamlanır ve her tüpe 1.47 mL 103.5 mM KH_2PO_4 ve 30 μ L su ilave edilir. Spektrofotometrede 240 nm’de absorbans köre karşı okunur ve absorbans değerlerine karşılık gelen μ M H_2O_2 değerleri kullanarak standart grafik elde edilir. 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 edilir. Spektrofotometrede 240 nm’de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okunur ve absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanır. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla μ mol cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürülür. 25°C’de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 μ mol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilir ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulur.



Şekil 3.2. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik

3.3.4.b. 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 10 µL enzim ekstraktı ilave edilir. 470 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedilir ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanır. 25°C'de 1 dakikada, absorbansı 0.01 artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilir ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulur (Yee *et al.* 2002).

3.3.4.c. Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanır.

Reaksiyon karışımı (3 mL); 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8), 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 2,58 ml alınmış ve üzerine 30 μL enzim ekstraktı pipetlenmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 13 μM 'lık riboflavin çözeltisinden 390 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).

3.3.4.d. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayini

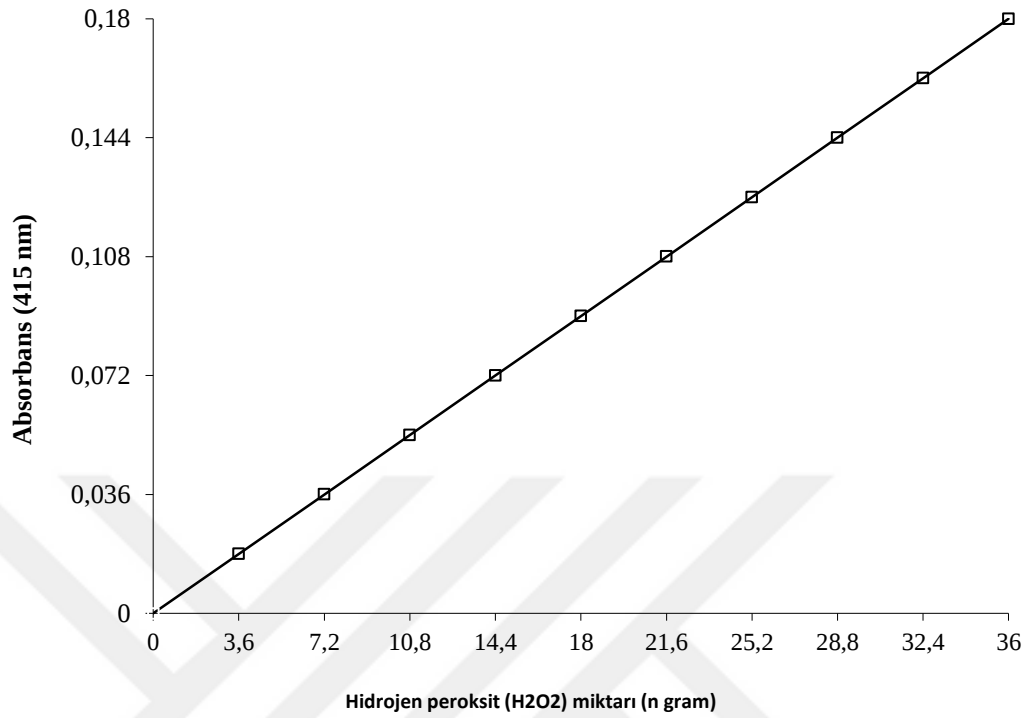
Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de absorbansdaki azalışa bağlı olarak belirlenir (Nakano ve Asada; 1981). Enzim aktivitesi, 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 250 μM askorbik asid (ASC), 5 mM H_2O_2 ve 20 μl enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlenir. Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de ASC için $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplanır. Sonuçlar g taze ağırlık başına ifade edilir.

3.3.4.e. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tayini

Glutasyon redüktaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Foyer ve Halliwell (1976)'e göre belirlenir. Substrat olarak 0,25 mM NADPH ve 1 mM oksitlenmiş glutasyon (GSSG) kullanılır. Yükseltgenmiş glutasyonun enzim tarafından indirgenmesi için indirgeyici faktör olarak NADPH kullanılır. Aktivite tayini için, 200 µl 0,5 mM EDTA içerisinde hazırlanmış 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 250 µl GSSG ve 500 µl NADPH ihtiva eden karışıma 50 µl enzim ekstraktı ilave edilir. NADPH'ın oksidasyonu 340 nm'de 5 dakika boyunca azalmanın ölçülmesiyle belirlenir. GR aktivitesi mU/ml olarak ifade edilir.

3.3.5. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi

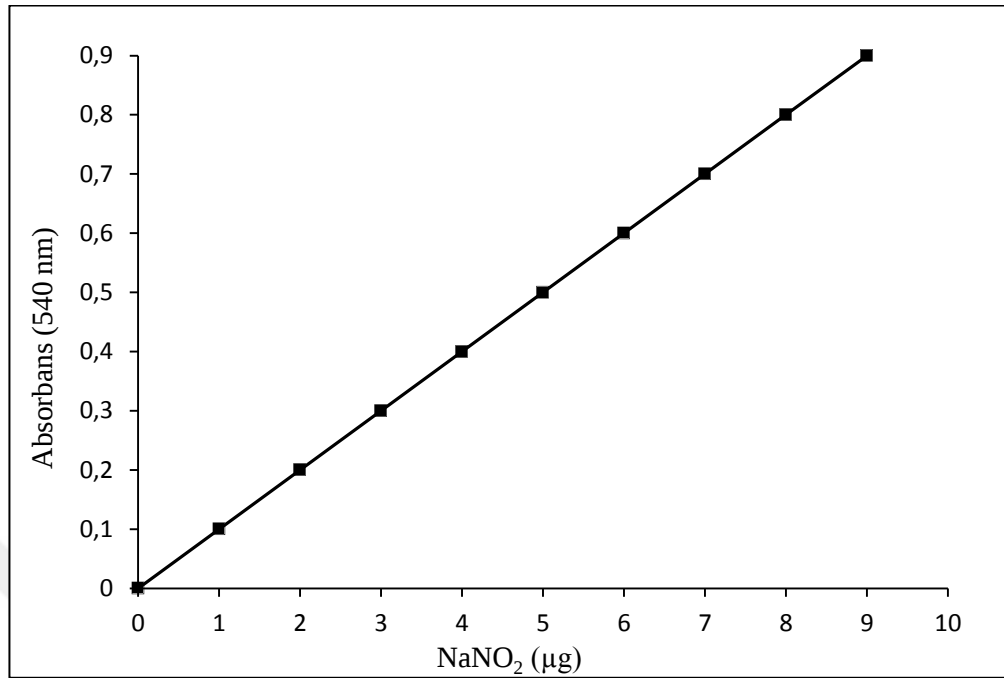
Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi için; 0.5 gram yaprak alınarak 10 mL soğuk aseton içinde homojenize edildikten sonra homojenat 10.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilir. Daha sonra elde edilen süpernatantın 1.5 mL'si, sırasıyla 0.15 mL %5'lik Ti(SO₄)₂ (titanyum disülfat) ve 0.3 mL %19'luk NH₄OH (amonyum hidroksit) ile karıştırılır. Çökelek oluşuktan sonra karışım 10.000 x g'de 10 dakika daha santrifüj edilir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet 3 mL 2 M'lık H₂SO₄ (sülfürik asit) içinde çözülür ve 415 nm'de absorbansı ölçülerek kaydedilir. Bu ortalama absorbans değerleri, daha önceden hazırlanmış standart grafik yardımıyla nanogram cinsinden H₂O₂ miktarına dönüştürülür. Sonuçlar g yaprak başına düşen H₂O₂ miktarı (ngram /g yaprak) olarak sunulur (He *et al.* 2005). H₂O₂ miktarını belirlemede kullanılan H₂O₂ standardı için, %35'lik H₂O₂ çözeltisinden hazırlanan 3 mM'lık stok çözeltiden eppendorff tüplerine sırasıyla; 3.6, 7.2, 10.8, 14.4, 18, 21.6, 25.2, 28.8, 32.4 ve 36 nanogram olacak şekilde konulur. Tüpün hacmi aseton ile 1.5 mL'ye tamamlanır ve her tüpe 0.15 mL %5'lik Ti(SO₄)₂ ve 0.3mL %19'luk NH₄OH ilave edilir. Çökelek oluşuktan sonra karışım 10.000 x g'de 5 dakika daha santrifüj edilir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet 3 mL 2 M'lık H₂SO₄ içinde çözülür ve küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 415 nm'de absorbans köre karşı okunur. Absorbans değerlerine karşılık gelen nanogram H₂O₂ değerleri kullanarak standart grafik elde edilir.



Şekil 3.3. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.6. Süperoksit (O₂⁻) içeriğinin belirlenmesi

Süperoksit içeriği Elstner and Heupel (1976) tarafından tanımlanan metoda göre ölçüldü. Bitki yapraklarından 0,4 g alınarak 2 ml 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH: 7,8) homojenize edildi. Homojenat 10 dakika 10000 *g*'de sentrifüj edildikten sonra süpernatanttan 0,5 ml alınarak üzerine 0,5 ml 50 mM potasyum fosfat (pH: 7,8) tamponundan eklendi. Daha sonra karışıma 0,1 ml 10 mM hidroksilamin hidroklorid eklenerek karıştırıldı. Karışım 1 saat 25°C'de inkibe edildikten sonra üzerine 1 ml 17 mM sülfonamid ve 1 ml 7 mM α -naftilamin eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra 530 nm'de spesifik absorbans değerleri belirlendi. Süperoksit anyonu içeriğini hesaplamak için sodyum nitrit kullanılarak yapılan standart grafik kullanıldı.



Şekil 3.4. Süperoksit içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.7. Mitokondri izolasyonu

Bitki yaprakları sıvı azotta homojenize edildi. Daha sonra ağırlığının 4 katı kadar hacimde 0,4 M mannitol, 50 mM MOPS (pH 7,2), 2mM etilen glikol tetra asetik asid (EGTA), 4 mM L-sistein, %0,6 polivilprolidin (PVP), 20 mM β- merkaptotanol ve %0,5 bovine serum albumin (BSA) içeren ekstraksiyon tamponunda 4°C de homojenize edildi. Karışım 5 dakika 400 g'de santifüj edildi. Süpernatant kısmı alınıp 15 dakika 2000 g'de santifüj edildi. Santifüj işleminden sonra süpernatant alınıp 30 dakika 10000 g'de tekrar santifüj edildi. Oluşan pelet alınıp 0,3 M mannitol, 20 mM MOPS (pH 7,2), 1mM EGTA ve %0,1 BSA içeren tamponda homojenize edildi. Elde edilen karışım 2000 g'de 10 dakika santifüj edildi. Süpernatant alınıp 15 dakika 15000 g'de santifüj edildi. Elde edilen saf mitokondri peleti az miktarda yıkama tamponunda homojenize edilip oksijen tüketimi ve Western blot analizleri için -80°C'de muhafaza edildi (Plummer 1980; Chien 2011).

3.3.8. Sodyum dodesil sülfat -Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)

Western blot analizi için mitokondrial proteinler %4–10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) Laemmli (1970) yöntemi ile yürütüldü. Bunun için elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkanır. İki cam plaka birbirini üstüne konulur ve kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konulur. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına pastör pipetleri yardımıyla aktarılır. Bu işlemler yapılırken hava almamasına dikkat edilir. Jel yüzeyinin düzgün olması için izopropil alkol ile ince bir tabaka oluşturulur. Polimerleşinceye kadar yaklaşık yarım saat beklenir. Polimerizasyon bittikten sonra üzerindeki izopropil alkol dökülür. Daha sonra yığma jel üst yüzeye kadar ilave edilir. Yaklaşık 45 dakika sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirilir. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkanır. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konulur. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlanır. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katılır. beş dakika boyunca kaynar su banyosunda inkübe edilir. Numuneler soğutulur, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulanır. Tank kapağı kapatılarak (+) kablo (Anot) ve (-) kablo (katot) yerleştirilir. Önce 80 voltluk akım yarım saat geçirilir. Daha sonra akım 120 volta ayarlanarak 2-4 saat oda sıcaklığında tatbik edilir. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarılır.

Yığma jeli hazırlanması sırasında 1 M'lık Tris-HCl (pH: 6,8)'den 500 µl, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 670 µl, %10'luk SDS'den 40 µl, %5'lik TEMED'den 4 µl, ve saf sudan 2,7 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %10'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER)'den 40 µl ilave edilir.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 2,03 ml 1M Tris-HCl (pH: 8,8), 2,67 ml %30'luk akrilamid, %0,8'lik bisakrilamid, 80 µl %10 SDS, 3,2 µl %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen daimin) ve 3,15 ml su karıştırılır. Bu karışımın üzerine en son olarak 80 µl %10'luk PER ilave edilir. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanır.

3.3.9. AOX proteini ifadesi analizi (Western Blot)

Bitki dokularından izole edilen mitokondrial protein ekstraktları %4-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) Laemmli (1970) yöntemi ile molekül büyüklüğüne göre ayrımı yapılacaktır. Daha sonra molekül büyüklüğüne göre ayrılmış proteinler Towbin et al (1979) tarafından tanımlanan metodla 13mM tris (pH: 7,2), %10 metanol ve 190 mM glisin içeren tamponda nitrocelüloz memrana (0,45 mm por büyüklüğüne sahip) 60 mA akım ile bir saat süreyle (semi-dry) blotlama cihazında transfer gerçekleştirilir. %0,1 Tween-20, 140 mM NaCl içeren 20 mM Tris tamponunun (pH: 7,6) hacmine oranla %3 BSA (sığır serum albumini) ve %5 süt tozu katılır ve membranlar bu çözeltide 4°C’de bir gece inkübe edilir. Membran %0,1 Tween-20’de yıkandıktan sonra AOX’e karşı *Sauromatum guttatum*dan elde edilen monoklonal antikorlar (Elthon *et al.* 1989) (1: 100 oranında seyreltilmiş) içeren tween-20 de %5 süt tozuyla bir saat oda sıcaklığında inkübe edilir. 4 kez 5’er dakika %0,1 Tween-20’de yıkanan membran, yabancur peroksidazına bağlanmış anti-mouse sekonder antikorlarını (1:10000 oranında seyreltilen) içeren %0,1 Tween-20 ve %2 süt tozunda iki saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Membran 6 kez 5’er dakika %0,1 Tween-20 ile yıkanır. Cross-reacted antikor SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Perbio Science UK) kullanılarak AOX protein bantları saptanır.

Western blot ile AOX ifade analizinin değerlendirilmesinde TotalLab TL-120 programı kullanılmıştır.

3.3.10. İstatistiksel analiz

Tez içerisinde sunulan sonuçlar, her bir uygulamadan en az iki biyolojik tekrar ve her bir biyolojik tekrar için en az üç tekerrür yapıldıktan sonra elde edilen en az altı değerin ortalamasıdır. Analizler “(iki kuyruklu) Student *t* test” programı kullanılarak yapılmış ve 0.05 hata seviyesinde önemli bulunan değerler istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Western blot ile AOX ifade analizinin değerlendirilmesinde TotalLab TL-120 kullanılmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yapılan çalışmalarda soğuğa tolerans yetenekleri farklı olan buğdayın (*Triticum aestivum* cv. Yıldırım Doğu-88, Ayyıldız, Alparslan) dört ayrı varyetesi, mısırın (*Zea mays* cv. SZE-TC-513, LG, Antisis) üç ayrı varyetesi, fasulye (*phaseolus vulgaris* cv. Elkoca) ve kara lahana (*Brassica oleracea*) bitkilerinin yaprakları kullanılmıştır. Araştırma için kullanılan buğday bitkisi varyetelerinden Alparslan'nın -19°C'ye, Doğu-88 ve Ayyıldız'ın -15°C'ye ve Yıldırım'ın -15°C'nin altındaki sıcaklıklara dayanıklı olduğu bilinmektedir. Bitkiler iklim dolabında kontrol şartlarında (25/20°C sıcaklık ve 14/10 saat ışık-karanlık periyodunda 20.000 lüks, %70 nem) büyütülmüştür. Her saksı, kesileceği güne kadar, günlük eşit miktarda saf su ile sulanmıştır. Buğday bitkisi için 5/2°C, mısır bitkisi için 10/7°C, fasulye bitkisi için 8/5°C, lahana bitkisi için ise 5/2°C sıcaklık değerlerine sahip iklim dolabına aktarılan bitkiler 48 saat sonra hasat edilerek MDA düzeyleri, total protein miktarı, antioksidan enzim aktiviteleri, Antioksidan madde içeriği (Süperoksit O_2^- içeriği, H_2O_2 içeriği), AOX aktivitesi ve AOX proteinin ifade düzeylerindeki değişimler belirlenmeye çalışılmıştır. Parametre sonuçlarının daha anlaşılır olabilmesi açısından her bir tür aşağıdaki gibi kodlanmıştır.

Çizelge 4.1. Buğday, mısır, fasulye ve lahana bitkisine ait kodlamalar

	Yıldırım	B1		SZE-TC-513	M1
BUĞDAY	Doğu-88	B2	MISIR	LG	M2
	Ayyıldız	B3		Antisis	M3
	Alparslan	B4			
FASULYE	Elkoca	F	LAHANA		L

4.1. Çözünabilir Protein Tayini Sonuçları

Çözünabilir protein miktarı soğuk uygulanan gruplarda buğday ve mısır bitkisinin tüm varyetelerinde, fasulye ve lahana bitkisinde kontrol gruplarına göre artış göstermiştir.

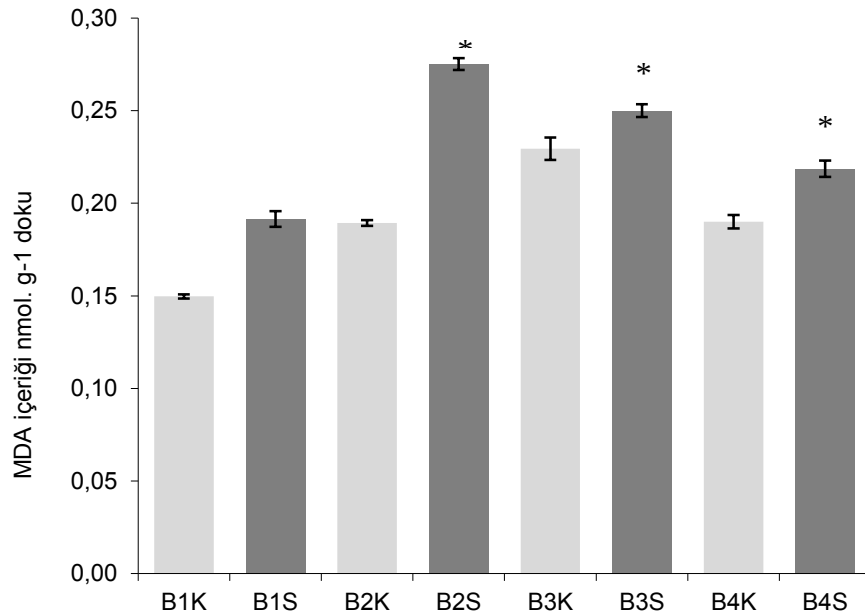
Çizelge 4.2. Bitkilerin mg/g protein doku miktarları

Tür	Kod *	mg/g protein doku
Yıldırım knt	B1	4.485 mg
Yıldırım sğk	B1	6.66 mg
Doğu-88 knt	B2	6.39 mg
Doğu88 sğk	B2	7.465 mg
Ayyıldız knt	B3	5.155 mg
Ayyıldızsğk	B3	6.755 mg
Alparslan knt	B4	4.710 mg
Alparslan sğk	B4	7.35 mg
SZE-TC-513 knt	M1	2.4 mg
SZE-TC-513sğk	M1	3.93 mg
Lg knt	M2	4.015 mg
Lg sğk	M2	5.385 mg
Antisis knt	M3	4.38 mg
Antisis sğk	M3	5.43 mg
Fasulye knt	F	4.985 mg
Fasulye sğk	F	6.57 mg
Lahana knt	L	2.2 mg
Lahana sğk	L	3.41 mg

*B= Buğday, M= Mısır, F= Fasulye, L= Lahana

4.2. Lipid Peroksidasyon Seviyesi (MDA İçeriği) Sonuçları

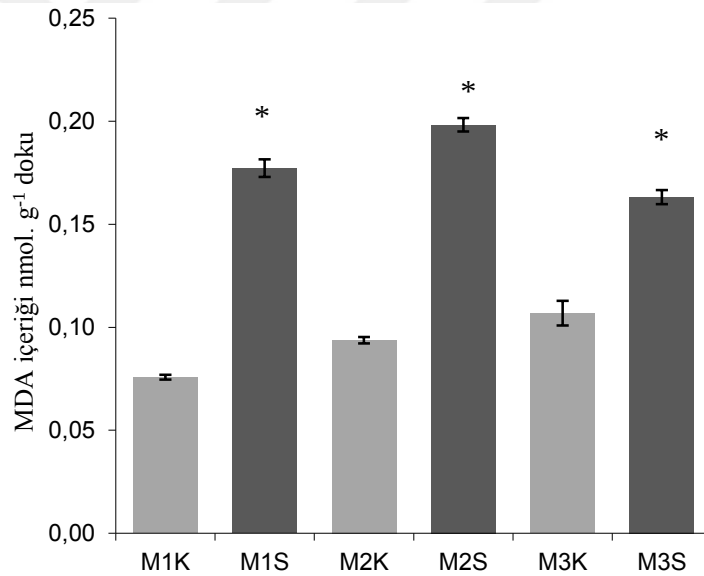
Düşük sıcaklık uygulamasının buğday bitkisinin dört varyetesinde, MDA içeriğini kontrol gruplarına oranla artırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.1). MDA içeriği B1 kontrol bitki yapraklarında 0.15 nmol.g^{-1} değerinde ölçülmüştür. Soğuk uygulaması ise B1 bitkisinin MDA içeriğini kontrol grubuna göre %26.6 oranında artırarak 0.19 nmol.g^{-1} değerine yükselttiği tespit edilmiştir. MDA içeriği B2 kontrol bitki yapraklarında 0.19 nmol.g^{-1} değerinde ölçülmüştür. Soğuk uygulaması ise B1 bitkisinin MDA içeriğini kontrol grubuna göre %47.3 oranında artırarak 0.28 nmol.g^{-1} değerine yükselttiği tespit edilmiştir. MDA içeriği B3 kontrol bitki yapraklarında 0.23 nmol.g^{-1} değerinde ölçülmüştür. Soğuk uygulaması ise B1 bitkisinin MDA içeriğini kontrol grubuna göre %8.7 oranında artırarak 0.25 nmol.g^{-1} değerine yükselttiği tespit edilmiştir. MDA içeriği B4 kontrol bitki yapraklarında 0.19 nmol.g^{-1} değerinde ölçülmüştür. Soğuk uygulaması ise B1 bitkisinin MDA içeriğini kontrol grubuna göre %4.7 oranında artırarak 0.22 nmol.g^{-1} değerine yükselttiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Buğday bitkisi varyetelerinde (B1, B2, B3, B4) soğuk uygulamasına göre MDA içeriğinin değişimi

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır.

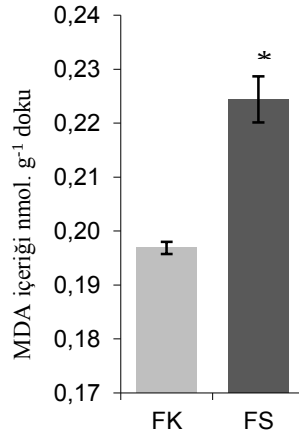
Düşük sıcaklık uygulamasının mısır bitkisinin dört varyetesinde, MDA içeriğini kontrol gruplarına oranla artırdığı belirlenmiştir (Şekil.4.2.). MDA içeriği M1 kontrol bitki yapraklarında 0.08 nmol.g^{-1} değerinde ölçülmüştür. Soğuk uygulaması ise B1 bitkisinin MDA içeriğini kontrol grubuna göre %125 oranında artırarak 0.18 nmol.g^{-1} değerine yükselttiği tespit edilmiştir. MDA içeriği M2 kontrol bitki yapraklarında 0.09 nmol.g^{-1} değerinde ölçülmüştür. Soğuk uygulaması ise B1 bitkisinin MDA içeriğini kontrol grubuna göre %122 oranında artırarak 0.20 nmol.g^{-1} değerine yükselttiği tespit edilmiştir. MDA içeriği M3 kontrol bitki yapraklarında 0.11 nmol.g^{-1} değerinde ölçülmüştür. Soğuk uygulaması ise B1 bitkisinin MDA içeriğini kontrol grubuna göre %45 oranında artırarak 0.16 nmol.g^{-1} değerine yükselttiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Mısır bitkisi çeşitlerinde (M1, M2, M3) soğuk uygulamasına göre MDA içeriğinin değişimi

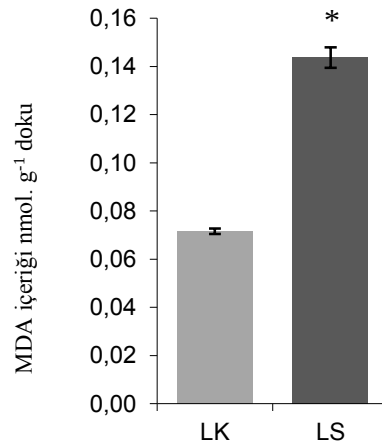
* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

Düşük sıcaklık uygulamasının fasulye bitkisinde MDA içeriğini kontrol grubuna oranla artırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.3). MDA içeriği F kontrol bitki yapraklarında 0.20 nmol.g^{-1} değerinde ölçülmüştür. Soğuk uygulaması ise B1 bitkisinin MDA içeriğini kontrol grubuna göre %10 oranında artırarak 0.22 nmol.g^{-1} değerine yükselttiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Fasulye bitkisi(F) soğuk uygulamasında MDA içeriğinin değişimi
**P* < 0.05 önem seviyesine göre fark anlamlıdır

Düşük sıcaklık uygulamasının lahanada bitkisinde MDA içeriğini kontrol grubuna oranla artırdığı belirlenmiştir (Şekil.4.4.). MDA içeriği L kontrol bitki yapraklarında 0.07 nmol.g⁻¹ değerinde ölçülmüştür. Soğuk uygulaması ise B1 bitkisinin MDA içeriğini kontrol grubuna göre %10 oranında artırarak 0.14 nmol.g⁻¹ değerine yükselttiği tespit edilmiştir.

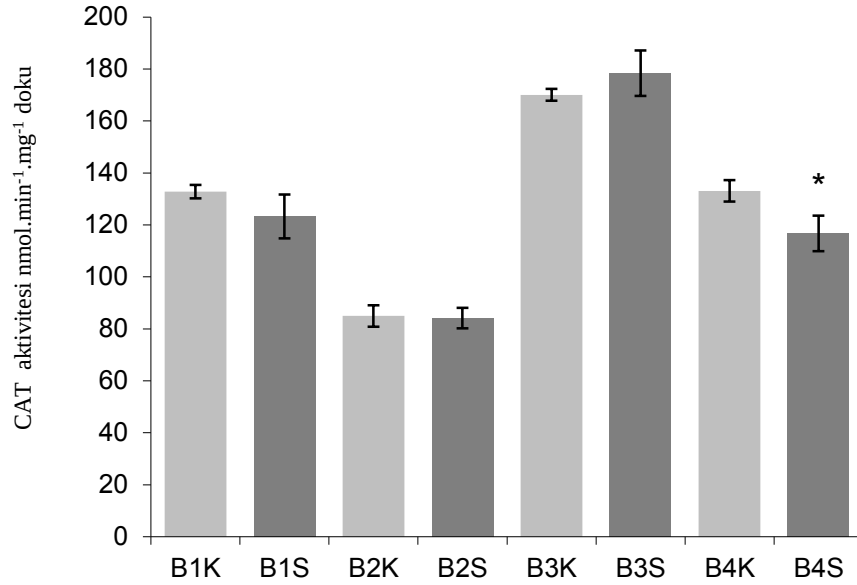


Şekil 4.4. Lahana bitkisi(L) soğuk uygulamasında MDA içeriğinin değişimi
**P* < 0.05 önem seviyesine göre fark anlamlıdır

4.3. Antioksidan Enzim Aktiviteleri Sonuçları

4.3.1. Katalaz (CAT) aktivitesi sonuçları

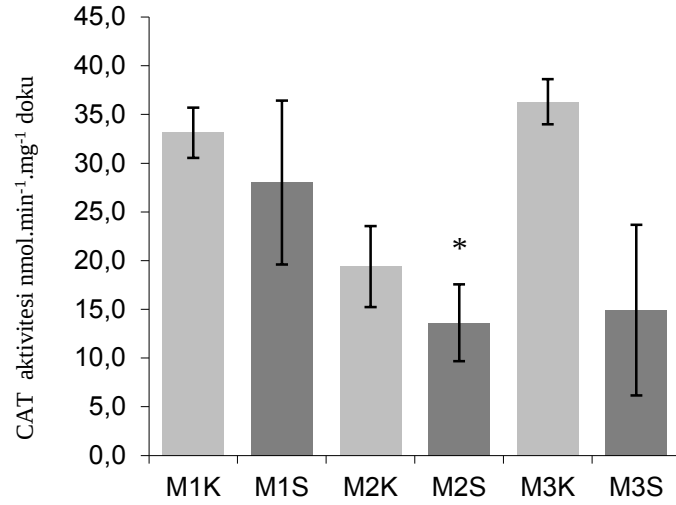
Buğday bitkisi yapraklarında soğuk uygulamasının CAT aktivitesini B3 ile kodlanan varyetede artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5). CAT aktivitesi B1 varyetesi kontrol grubunda $133 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku değeri elde edilirken soğuk grubunda $123 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku aktivite değerleri elde edilmiştir. Düşük sıcaklık uygulamasının CAT aktivitesi doku değeri kontrol grubuna oranla %-7.51 azalttığı tespit edilmiştir. CAT aktivitesi B2 varyetesi kontrol grubunda $85 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku değeri elde edilirken soğuk grubunda $84 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku aktivite değerleri elde edilmiştir. Düşük sıcaklık uygulamasının CAT aktivitesi doku değerini kontrol grubuna oranla %-1.17 azalttığı tespit edilmiştir. CAT aktivitesi B3 varyetesi kontrol grubunda $170 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku değeri elde edilirken soğuk grubunda $178.5 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku aktivite değerleri elde edilmiştir. Düşük sıcaklık uygulamasının CAT aktivitesi doku değerini kontrol grubuna oranla %4.7 artırdığı tespit edildi. CAT aktivitesi B4 varyetesi kontrol grubunda $133 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku değeri elde edilirken soğuk grubunda $116 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku aktivite değerleri elde edilmiştir. Düşük sıcaklık uygulamasının CAT aktivitesi doku değerini kontrol grubuna oranla %-12.7 azalttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Buğday bitkisi çeşitlerinde (B1, B2, B3, B4) düşük sıcaklığın CAT aktivitesi üzerine etkileri

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

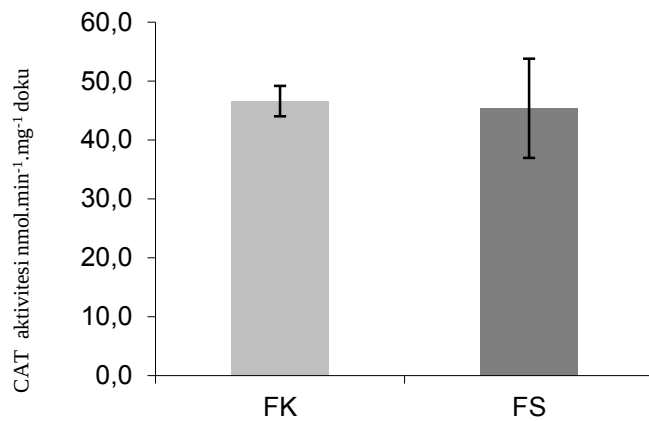
Mısır bitkisi yapraklarında soğuk uygulamasının CAT aktivitesini M1, M2, M3 ile kodlanan varyetelerde azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6). CAT aktivitesi M1 varyetesi kontrol grubunda $33.1 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku değeri elde edilirken soğuk grubunda $28 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku aktivite değerleri elde edilmiştir. Düşük sıcaklık uygulamasının CAT aktivitesi doku değerini kontrol grubuna oranla %15 azalttığı tespit edilmiştir. CAT aktivitesi M2 varyetesi kontrol grubunda $19.4 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku değeri elde edilirken soğuk grubunda $13.6 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku aktivite değerleri elde edilmiştir. Düşük sıcaklık uygulamasının CAT aktivitesi doku değerini kontrol grubuna oranla %-31.7 azalttığı tespit edilmiştir. CAT aktivitesi M3 varyetesi kontrol grubunda $36.3 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku değeri elde edilirken soğuk grubunda $14.9 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku aktivite değerleri elde edilmiştir. Düşük sıcaklık uygulamasının CAT aktivitesi doku değerini kontrol grubuna oranla %-27 azalttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. Mısır bitkisi çeşitlerinde (M1, M2, M3) düşük sıcaklığın CAT aktivitesi üzerine etkileri

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

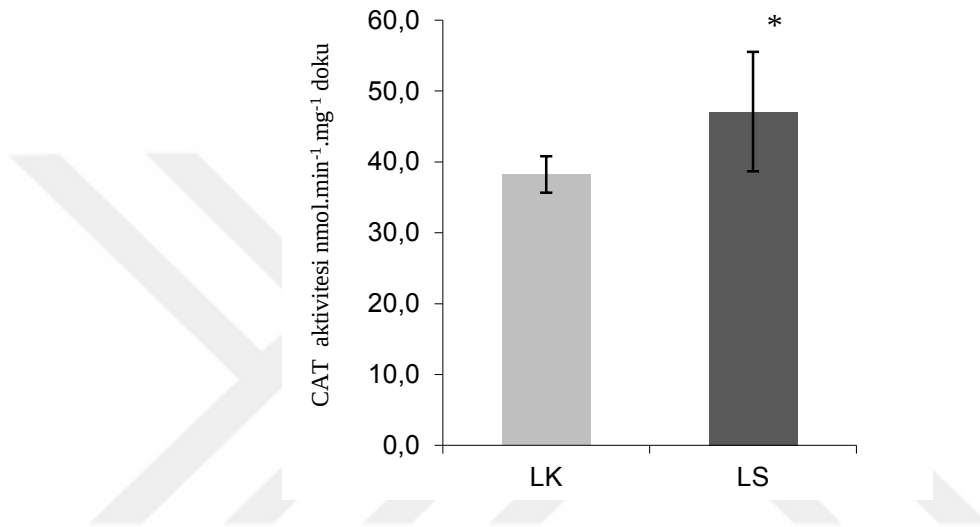
Fasulye bitkisi yapraklarında soğuk uygulamasının CAT aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7). CAT aktivitesi fasulye bitkisi yapraklarında kontrol grubunda $46.6 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku değeri elde edilirken soğuk grubunda $45.4 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku aktivite değerleri elde edilmiştir. Düşük sıcaklık uygulamasının CAT aktivitesi doku değerini kontrol grubuna oranla %-2.1 azalttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Fasulye bitkisinde düşük sıcaklığın CAT aktivitesi üzerine etkisi

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

Lahana bitkisi yapraklarında soğuk uygulamasının CAT aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.8). CAT aktivitesi lahana bitkisi yapraklarında kontrol grubunda $38.2 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku değeri elde edilirken soğuk grubunda $47.1 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku aktivite değerleri elde edilmiştir. Düşük sıcaklık uygulamasının CAT aktivitesi doku değerini kontrol grubuna oranla %23 artırdığı tespit edilmiştir.



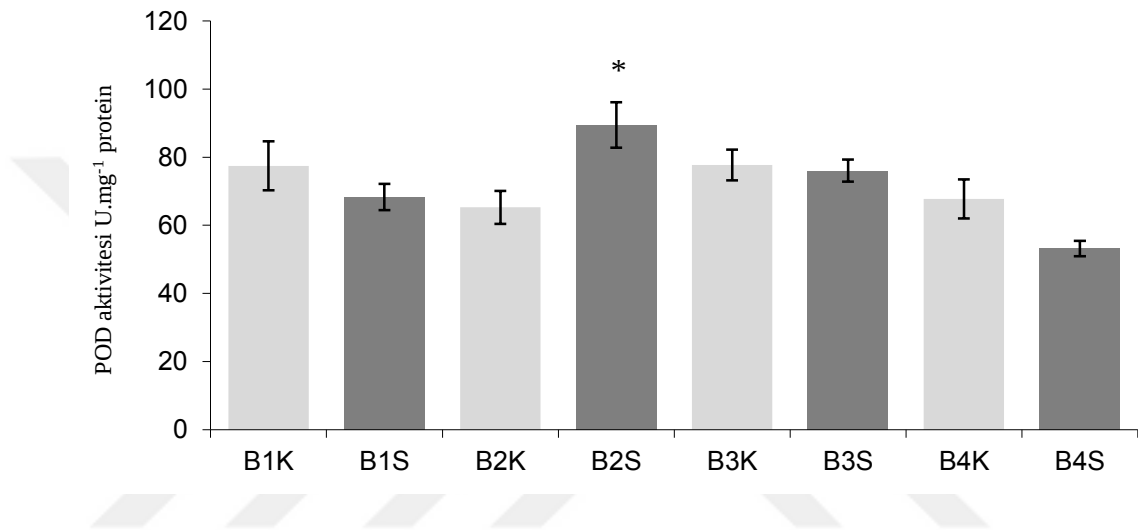
Şekil 4.8. Lahana bitkisinde düşük sıcaklığın CAT aktivitesi üzerine etkisi

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

4.3.2. Peroksidaz aktivitesi sonuçları

Buğday bitkisinde soğuk uygulaması, kontrol grubu bitkilerine göre B1, B3 ,B4 varyetelerinin POD aktivitesinde düşüşe neden olduğu saptanırken B4 varyetesinde artırdığı saptanmıştır (Şekil 4.9) B1 varyetesinin kontrol grubunda POD enzim aktivitesi 77 U.mg^{-1} protein olarak ölçülürken soğuk uygulamasında bu değer 68 U.mg^{-1} protein'e gerilemiştir.B1 varyetesinde soğuk uygulaması POD enzim aktivitesi kontrol grubuna %-11.6 oranında düşüş göstermiştir. B2 varyetesinin kontrol grubunda POD enzim aktivitesi 65 U.mg^{-1} protein olarak ölçülürken soğuk uygulamasında bu değer 89 U.mg^{-1} protein'e yükselmiştir.B2 varyetesinde soğuk uygulaması POD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre %36.9 oranında artış göstermiştir.B3 varyetesinin kontrol grubunda POD enzim aktivitesi 76 U.mg^{-1} protein olarak ölçülürken soğuk uygulamasında bu değer 67.8 U.mg^{-1} protein'e gerilemiştir.B3 varyetesinde soğuk uygulaması POD enzim

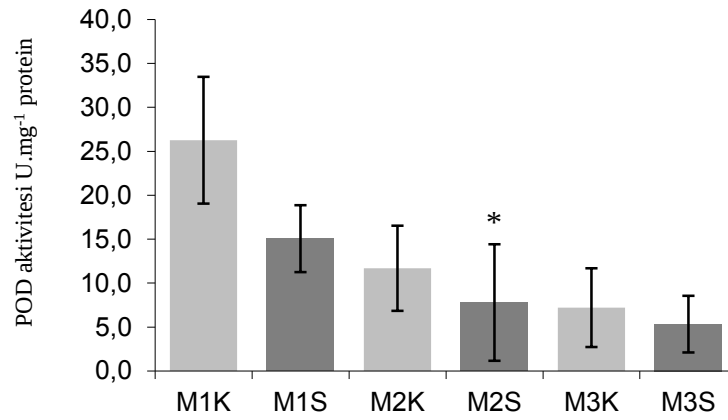
aktivitesi kontrol grubuna göre %-2.5 oranında düşüş göstermiştir. B4 varyetesinin kontrol grubunda POD enzim aktivitesi 67.8 U.mg^{-1} protein olarak ölçülürken soğuk uygulamasında bu değer 53 U.mg^{-1} protein'e gerilemiştir. B3 varyetesinde soğuk uygulaması POD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre %-20 oranında düşüş göstermiştir.



Şekil 4.9. Buğday bitkisi çeşitlerinde (B1, B2, B3, B4) düşük sıcaklığın POD aktivitesi üzerine etkileri

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

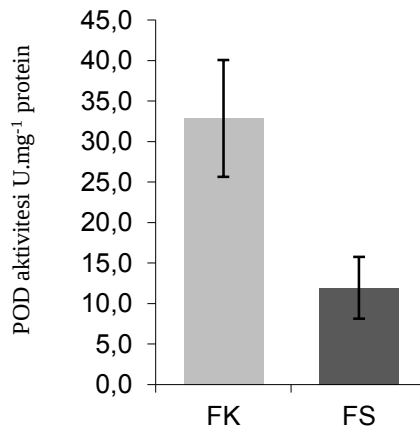
Mısır bitkisinde soğuk uygulaması, kontrol grubu bitkilerine göre M1, M2, M3 varyetelerinin POD aktivitelerini düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.10). M1 varyetesinin kontrol grubunda POD enzim aktivitesi 26 U.mg^{-1} protein olarak ölçülürken soğuk uygulamasında bu değer 15 U.mg^{-1} protein'e gerilemiştir. M1 varyetesinde soğuk uygulaması POD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre %-42 oranında düşüş göstermiştir. M2 varyetesinin kontrol grubunda POD enzim aktivitesi 11.7 U.mg^{-1} protein olarak ölçülürken soğuk uygulamasında bu değer 7.8 U.mg^{-1} protein'e gerilemiştir. M2 varyetesinde soğuk uygulaması POD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre %-36 oranında düşüş göstermiştir. M3 varyetesinin kontrol grubunda POD enzim aktivitesi 7.2 U.mg^{-1} protein olarak ölçülürken soğuk uygulamasında bu değer 5.3 U.mg^{-1} protein'e gerilemiştir. M3 varyetesinde soğuk uygulaması POD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre %-28 oranında düşüş göstermiştir.



Şekil 4.10. Mısır bitkisi çeşitlerinde(M1, M2, M3) düşük sıcaklığın POD aktivitesi üzerine etkileri

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

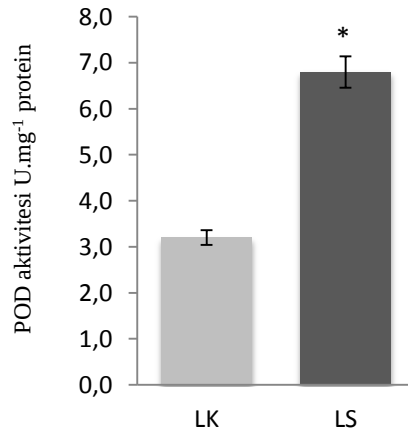
Fasulye bitkisi yapraklarında soğuk uygulamasının POD aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11) Fasulye bitkisi. kontrol grubunda POD enzim aktivitesi 32.9 U.mg⁻¹ protein olarak ölçülürken soğuk uygulamasında bu değer 11.9 U.mg⁻¹ protein'e düşürmüştür. Fasulye bitkisi soğuk uygulaması POD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre %-65 oranında azaltmıştır.



Şekil 4.11. Fasulye bitkisinde düşük sıcaklığın POD aktivitesi üzerine etkisi

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

Lahana bitkisi yapraklarında soğuk uygulamasının POD aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.12). Lahana bitkisi kontrol grubunda POD enzim aktivitesi 3.2 U.mg^{-1} protein olarak ölçülürken soğuk uygulamasında bu değer 6.8 U.mg^{-1} protein'e yükselmiştir. Lahana bitkisi soğuk uygulaması POD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre %50 oranında artırmıştır.

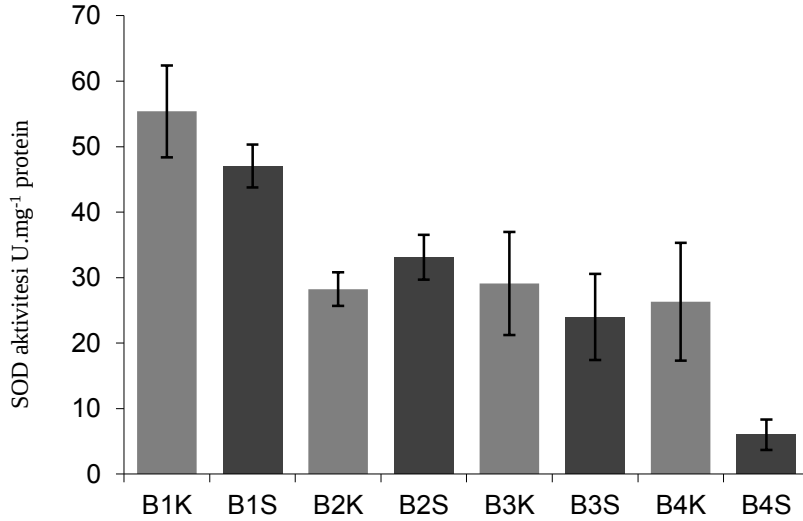


Şekil 4.12. Lahana bitkisinde düşük sıcaklığın POD aktivitesi üzerine etkisi
**P < 0.05* önem seviyesine göre fark anlamlıdır

4.3.3. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları

Buğday bitkisinin B1, B3 ve B4 varyetelerinin soğuk gruplarında SOD aktivitesi kontrol gruplarına göre düşüş gösterirken B2 varyetesinde artışın olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.13). B1 varyetesinin kontrol grubunda SOD aktivitesi 55 U.mg^{-1} protein değeri kaydedilirken soğuk grubunda 47 U.mg^{-1} protein olarak kaydedilmiştir. B1 varyetesinde soğuk uygulaması SOD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre %-14 oranında düşüş göstermiştir. B2 varyetesinin kontrol grubunda SOD aktivitesi 28 U.mg^{-1} protein değeri kaydedilirken soğuk grubunda 33 U.mg^{-1} protein olarak kaydedilmiştir. B2 varyetesinde soğuk uygulaması SOD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre %17 oranında artış göstermiştir. B3 varyetesinin kontrol grubunda SOD aktivitesi 24 U.mg^{-1} protein değeri kaydedilirken soğuk grubunda 26 U.mg^{-1} protein olarak kaydedilmiştir. B3 varyetesinde soğuk uygulaması SOD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre %-17 oranında azalma göstermiştir. B4 varyetesinin kontrol grubunda SOD aktivitesi 26 U.mg^{-1} protein değeri

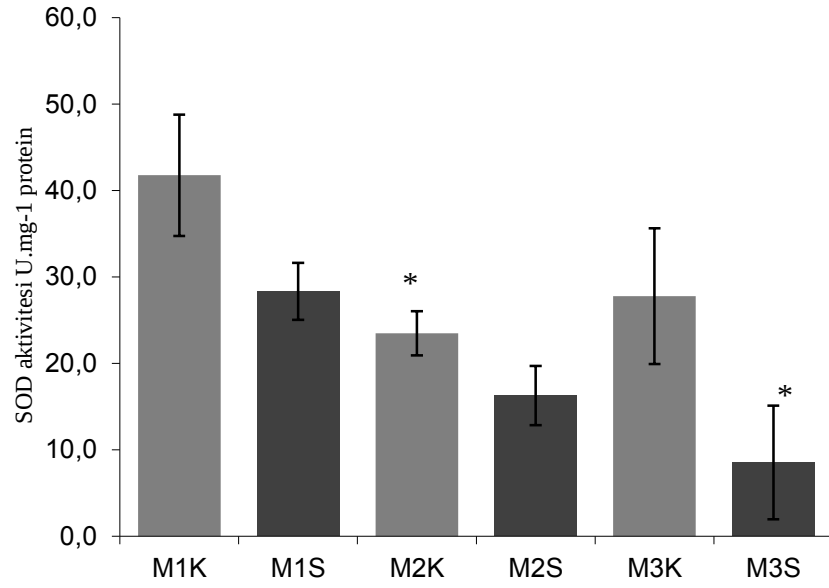
kaydedilirken soğuk grubunda 6 U.mg^{-1} protein olarak kaydedilmiştir. B4 varyetesinde soğuk uygulaması SOD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre %-76 oranında azalma göstermiştir.



Şekil 4.13. Buğday bitkisi çeşitlerinde (B1, B2, B3, B4) düşük sıcaklığın SOD aktivitesi üzerine etkileri

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

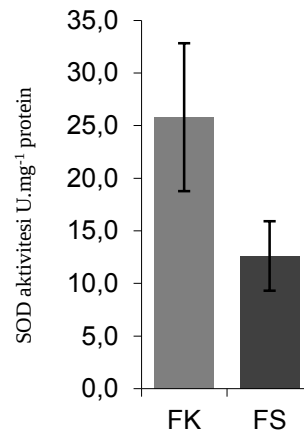
Düşük uygulamasının mısır bitkisinin M1,M2,M3 varyetelerinin tamamında SOD aktivitesini düşürdüğü kaydedilmiştir (Şekil 4.14). M1, M2, M3 varyetelerinin kontrol grublarında SOD aktivitesi sırasıyla 41.8 U.mg^{-1} protein, 23.5 U.mg^{-1} protein ve 27.8 U.mg^{-1} protein değerleri kaydedilirken; soğuk gruplarında sırasıyla 28.3 U.mg^{-1} protein, 16.3 U.mg^{-1} protein ve 8.5 U.mg^{-1} protein olarak kaydedilmiştir. M1, M2 ve M3 varyetelerinde soğuk uygulaması SOD enzim aktivitelerini kontrol gruplarına göre sırasıyla %-31, %-30 ve %-70 oranında düşürdüğü kaydedilmiştir.



Şekil 4.14. Mısır bitkisi çeşitlerinde(M1, M2, M3) düşük sıcaklığın SOD aktivitesi üzerine etkileri

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

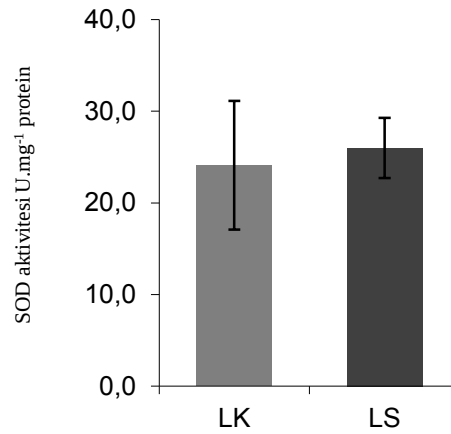
Fasulye bitkisi yapraklarında soğuk uygulamasının SOD aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.15). Fasulye bitkisi. kontrol grubunda SOD enzim aktivitesi 25.8 U.mg⁻¹ protein olarak ölçülürken soğuk uygulamasında bu değer 12.6 U.mg⁻¹ protein'e düşürmüştür. Fasulye bitkisi soğuk uygulaması POD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre %-52 oranında azaltmıştır.



Şekil 4.15. Fasulye bitkisinde düşük sıcaklığın SOD aktivitesi üzerine etkisi

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

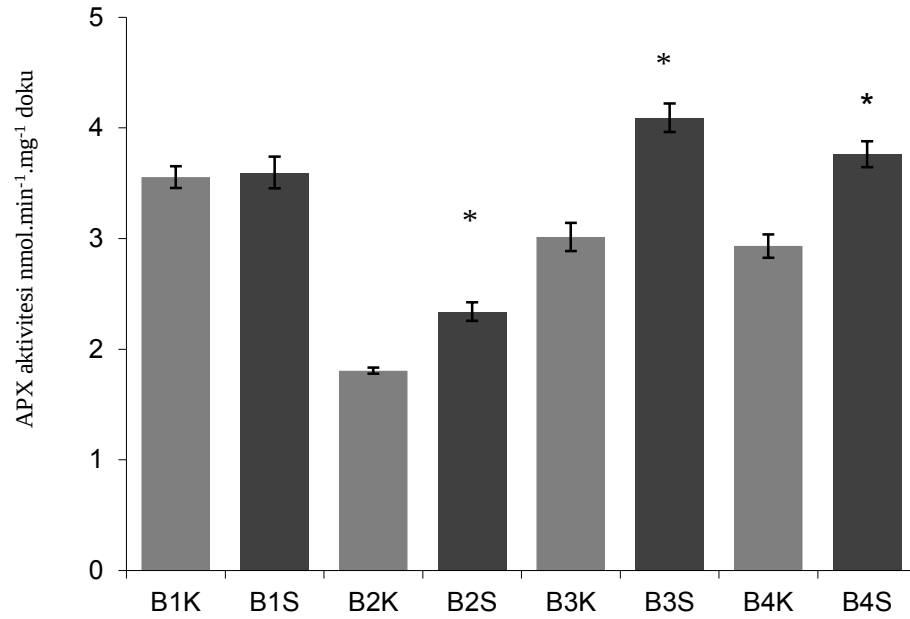
Lahana bitkisi yapraklarında soğuk uygulamasının SOD aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Lahana bitkisi kontrol grubunda SOD enzim aktivitesi 24.1 U.mg^{-1} protein olarak ölçülürken soğuk uygulamasında bu değer 26 U.mg^{-1} protein'e yükselmiştir. Lahana bitkisi soğuk uygulaması POD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre %8 oranında artırmıştır.



Şekil 4.16. Lahana bitkisinde düşük sıcaklığın SOD aktivitesi üzerine etkisi
**P < 0.05* önem seviyesine göre fark anlamlıdır

4.3.4. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi sonuçları

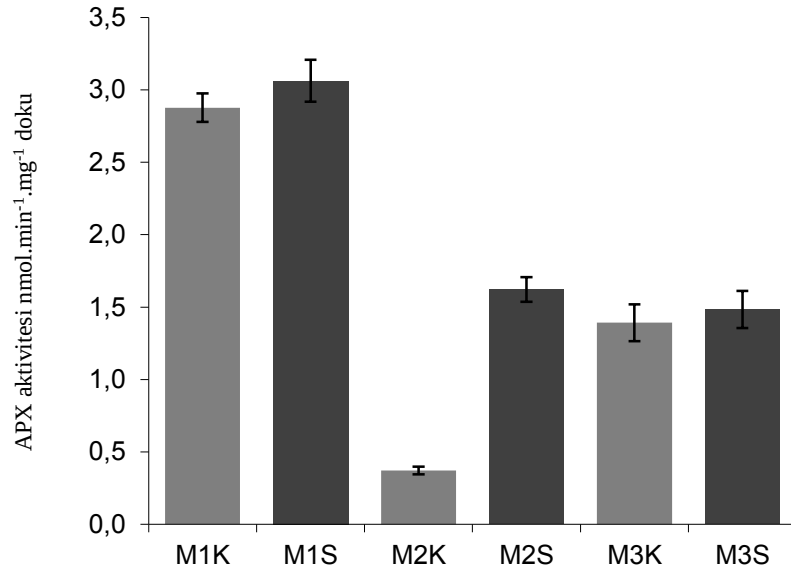
Buğday bitkisinin çalışılan tüm varyetelerinde, soğuk grupların APX enzim aktiviteleri sonuçlarının kontrol gruplara göre yükseldiği kaydedilmiştir (Şekil 4.17). B1, B2, B3, B4 varyetelerinde enzim aktivitesi değerleri kontrol gruplarında sırasıyla $3.55 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, $1.8 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, $3.01 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku ve $2.9 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku olarak ölçülürken, soğuk gruplarında sırasıyla $3.59 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku, $2.34 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku, $4.1 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku, $3.8 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku olarak ölçülmüştür. Her bir çeşitteki APX enzim aktivitesi değişimi artış göstererek sırasıyla %1, %30, %36 ve %45 oranlarına ulaşmıştır.



Şekil 4.17. Buğday bitkisi çeşitlerinde(B1,B2,B3,B4) düşük sıcaklığın APX aktivitesi üzerine etkileri

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

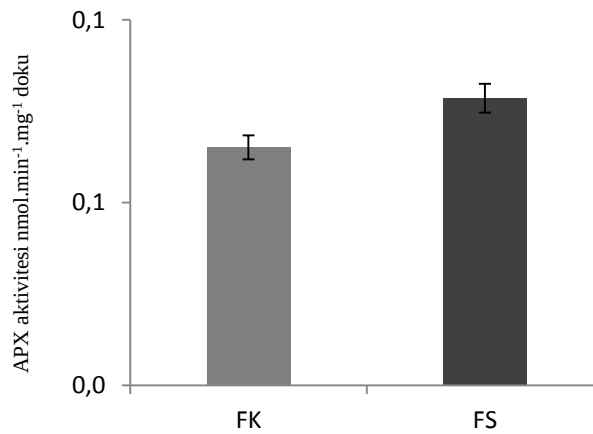
Mısır bitkisinin çalışılan varyetelerinde, soğuk uygulamasının APX enzim aktiviteleri sonuçlarını kontrol gruplara göre artırdığı kaydedilmiştir (Şekil 4.18). M1, M2, M3 varyetelerinde enzim aktivitesi değerleri kontrol gruplarında sırasıyla 2.9 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ doku, 0.4 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ doku, 1.4 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ doku olarak ölçülürken, soğuk gruplarında sırasıyla 3.1 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ doku, 1.6 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ doku, 1.5 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ doku olarak ölçülmüştür. Her bir çeşitteki APX enzim aktivitesi değişimi artış göstererek sırasıyla %1, %30, %36 ve %45 oranlarına ulaşmıştır.



Şekil 4.18. Mısır bitkisi çeşitlerinde(M1,M2,M3) düşük sıcaklığın APX aktivitesi üzerine etkileri

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

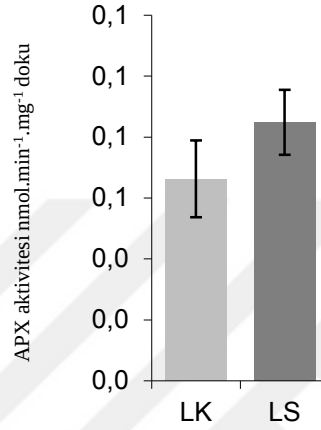
Fasulye bitkisinde APX enzim aktivitesi sonucu kontrol grubunda $0.06 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku kaydedilirken soğuk uygulaması sonucunda enzim aktivitesi değeri $0.07 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku olarak kaydedilmiştir ve bu artış kontrol grubuna göre soğuk grubunda APX enzim aktivitesi değerini %16 oranında artırmıştır (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Fasulye bitkisinde düşük sıcaklığın APX aktivitesi üzerine etkisi

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

Lahana bitkisinde APX enzim aktivitesi sonucu kontrol grubunda $0.06 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku kaydedilirken soğuk uygulaması sonucunda enzim aktivitesi değeri $0.08 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku olarak kaydedilmiştir ve bu artış kontrol grubuna göre soğuk grubunda APX enzim aktivitesi değerini %33 oranında artırmıştır (Şekil 4.20).

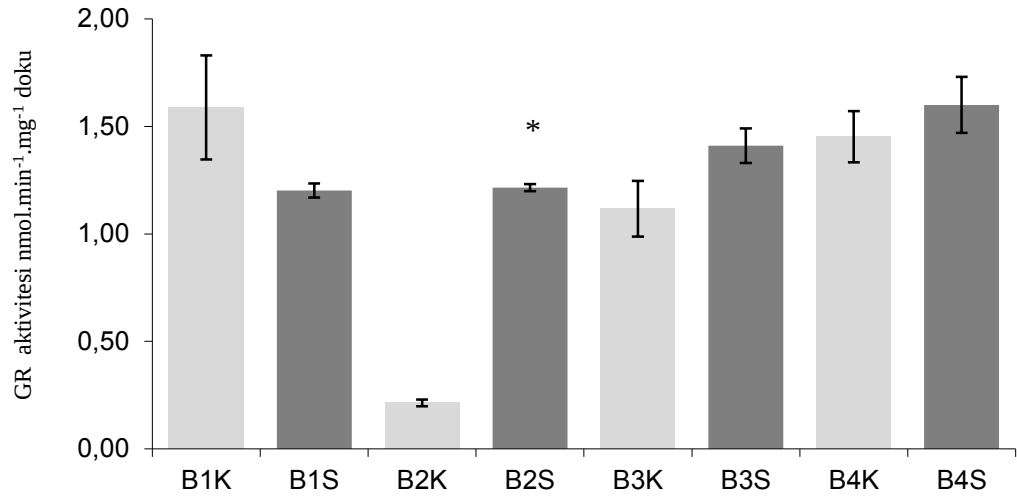


Şekil 4.20. Lahana bitkisinde düşük sıcaklığın APX aktivitesi üzerine etkisi

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

4.3.5. Glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi sonuçları

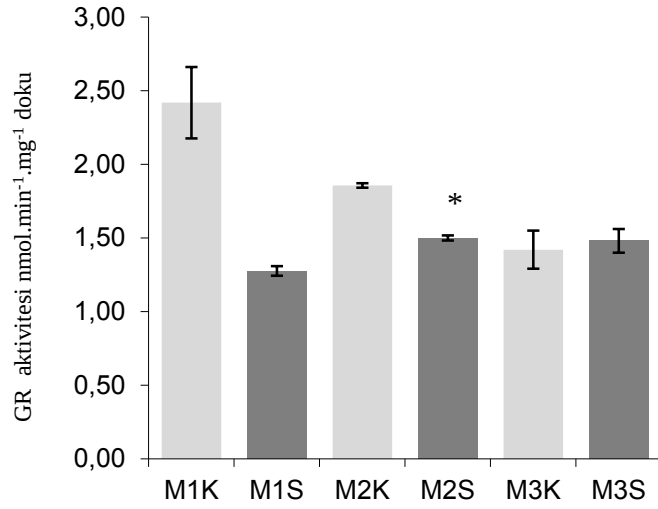
Buğday bitkisi varyetelerinden B1 ile kodlanmış bitkide kontrol grubuna göre soğuk uygulaması GR aktivesinde azalmaya sebep olurken, B2, B3 ve B4 ile kodlanan varyetelerde soğuk uygulaması GR aktivitesini artırmıştır (Şekil 4.21). B1, B2, B3, B4 varyetelerinde GR aktvitesi kontrol bitkilerinde sırasıyla $1.59 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku, $0.21 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku, $1.12 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku, $1.45 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku değerleri kaydedilirken aynı gruplara soğuk uygulaması ardından GR aktvitesi değerleri $1.2 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku, $1.22 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku, $1.41 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku, $1.6 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku şeklinde kaydedilmiştir. Soğuk uygulaması buğday bitkisinin B1 kodlu varyetesinde kontrol grubuna oranla GR aktvitesini %-24 oranında azaltırken, B2, B3, B4 varyetelerinin GR aktvitelerini sırasıyla %476, %25 ve %79 oranında artırmıştır.



Şekil 4.21. Buğday bitkisi çeşitlerinde (B1, B2, B3, B4) düşük sıcaklığın GR aktivitesi üzerine etkileri

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

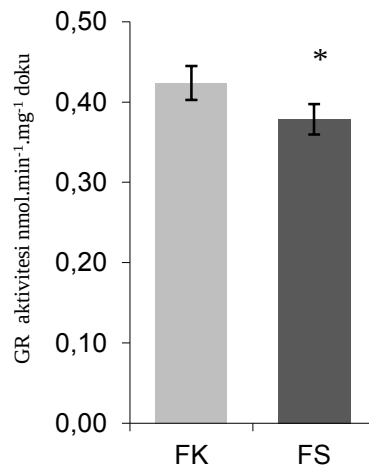
Mısır bitkisinin M1, M2 ile kodlanan varyetelerinde soğuk uygulaması kontrol gruplara göre GR aktivitesinde düşüşe sebep olurken, M3 ile kodlanan varyetesinde artışa sebep olmuştur (Şekil 4.22). M1 ve M2 ile kodlanan varyetelerin kontrol gruplarında GR aktivitesi sırasıyla $2.42 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ doku}$, $1.86 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ doku}$ olarak ölçülürken soğuk uygulaması yapılan gruplarda değerler sırasıya $1.28 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ doku}$, $1.50 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ doku}$ olarak ölçülmüştür. M3 varyetesinde ise kontrol grubu GR aktivitesi $1.42 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ doku}$ olarak kaydedilmiş soğuk uygulaması sonrasında GR aktivitesi $1.50 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ doku}$ ölçülerek artış göstermiştir. M1, M2 kodlu varyetelerin soğuk uygulamasında kontrol gruplarına kıyasla GR enzim aktivitesi sırasıyla %47, %19 oranında azalma gösterirken M3 kodlu varyetenin soğuk uygulamasında kontrol gruplarına oranla %4 artış gösterdiği kaydedilmiştir.



Şekil 4.22. Mısır bitkisi çeşitlerinde(M1,M2,M3) düşük sıcaklığın GR aktivitesi üzerine etkileri

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

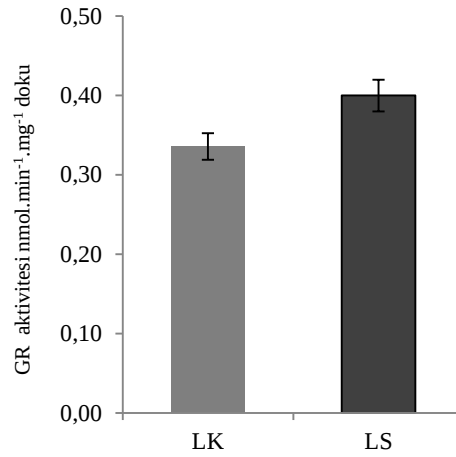
Fasulye bitkisinde soğuk uygulaması kontrol grubuna göre GR enzim aktivitesini düşürmüştür (Şekil 4.23). Kontrol grubunda GR enzim aktivitesi $0.42 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku değerindeyken soğuk uygulaması neticesinde GR enzim aktivitesi değeri $0.38 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku değerine gerilemiştir. Soğuk uygulaması kontrol grubuna göre GR enzim aktivitesini %-9 oranında düşürmüştür.



Şekil 4.23. Fasulye bitkisinde düşük sıcaklığın GR aktivitesi üzerine etkisi

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

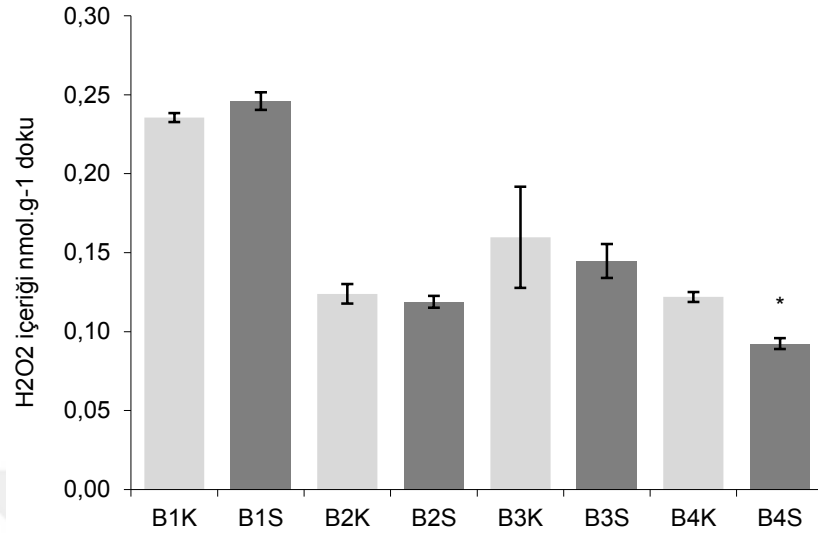
Lahana bitkisinin kontrol grubunda GR enzim aktivitesi değeri $0.34 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku şeklinde kaydedilirken soğuk uygulaması sonrasında GR enzim aktivitesi değeri yükselerek $0.40 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ doku olmuştur (Şekil 4.24). Bitkinin kontrol grubuna kıyasla soğuk uygulaması GR enzim aktivitesini %17.6 oranında artırmıştır.



Şekil 4.24. Lahana bitkisinde düşük sıcaklığın GR aktivitesi üzerine etkisi
**P < 0.05* önem seviyesine göre fark anlamlıdır

4.4. Hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriği sonuçları

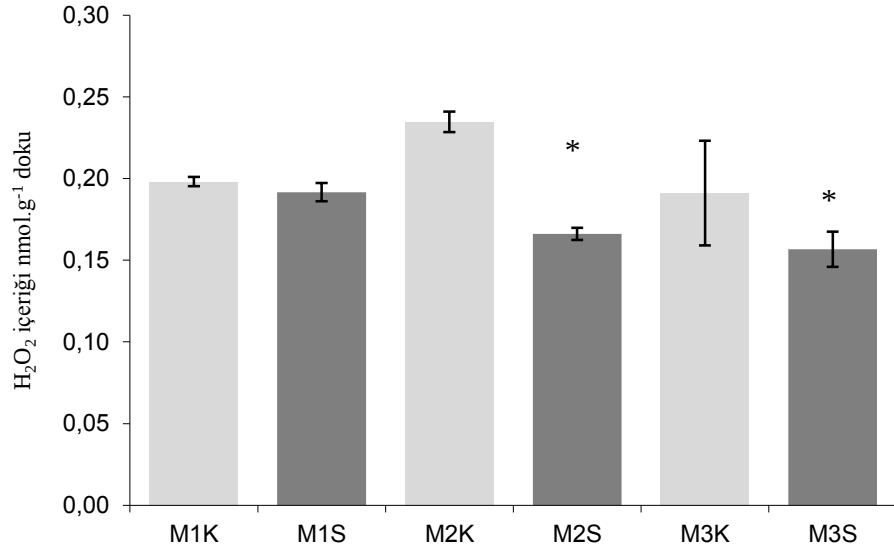
Buğday bitkisinin B1 ile kodlanan varyetesinin yaprak dokularında kontrol grubunda 0.24 nmol.g^{-1} değerinde ölçülen H_2O_2 içeriğini soğuk uygulaması ile %4 oranının da artarak 0.25 nmol.g^{-1} değerine ulaştığı saptanmıştır. B2, B3, B4 varyetelerinin kontrol gruplarının yaprak dokularındaki H_2O_2 içeriği sırasıyla $0.123 \text{ nmol.g}^{-1}$, 0.16 nmol.g^{-1} , 0.12 nmol.g^{-1} değerlerinde ölçülürken aynı varyetelerin soğuk uygulaması sonucunda yaprak dokularındaki H_2O_2 içeriği 0.11 nmol.g^{-1} , 0.14 nmol.g^{-1} , 0.09 nmol.g^{-1} değerlerinde ölçülerek, %-4, %-12, %-25 oranında azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Buğday bitkisi çeşitlerinde(B1, B2, B3, B4) düşük sıcaklığın H₂O₂ aktivitesi üzerine etkileri

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

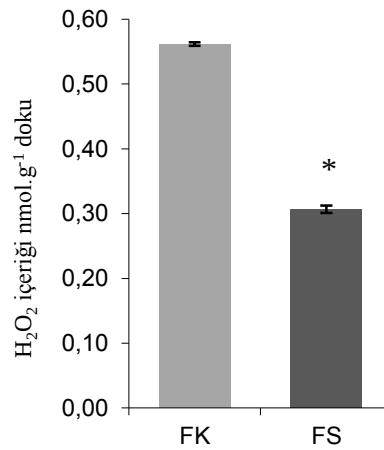
Mısır bitkisinin M1, M2, M3 ifadeleriyle kodlanan varyetelerinin H₂O₂ içeriğinde soğuk uygulamasıyla kontrol gruplarına göre azalma olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.26). M1, M2, M3 bitkilerinin yaprak dokularında kontrol gruplarında H₂O₂ içeriği sırasıyla 0.2 nmol.g⁻¹, 0.23 nmol.g⁻¹, 0.19 nmol.g⁻¹ ; soğuk uygulamasıyla bu değerler 0.19 nmol.g⁻¹, 0.17 nmol.g⁻¹, 0.16 nmol.g⁻¹ olarak ölçülmüştür. H₂O₂ içeriğini soğuk uygulaması M1 bitkisinde %-5, M2 bitkisinde %-26, M3 bitkisinde ise %-15 oranında azalttığı saptanmıştır.



Şekil 4.26. Mısır bitkisi çeşitlerinde(M1, M2, M3) düşük sıcaklığın H₂O₂ aktivitesi üzerine etkileri

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

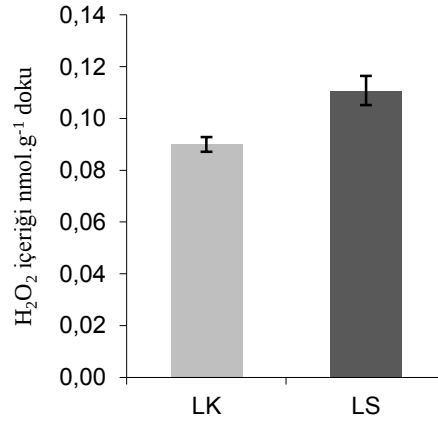
Fasulye bitkisinde de soğuk uygulaması H₂O₂ içeriğini azaltmıştır. Kontrol bitkisinde H₂O₂ içeriği 0.56 nmol.g⁻¹ değerinde ölçülürken soğuk uygulamasıyla bu değer %-44 oranında azalarak 0.31 nmol.g⁻¹ değerine ulaştırmıştır (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Fasulye bitkisinde düşük sıcaklığın H₂O₂ aktivitesi üzerine etkisi

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

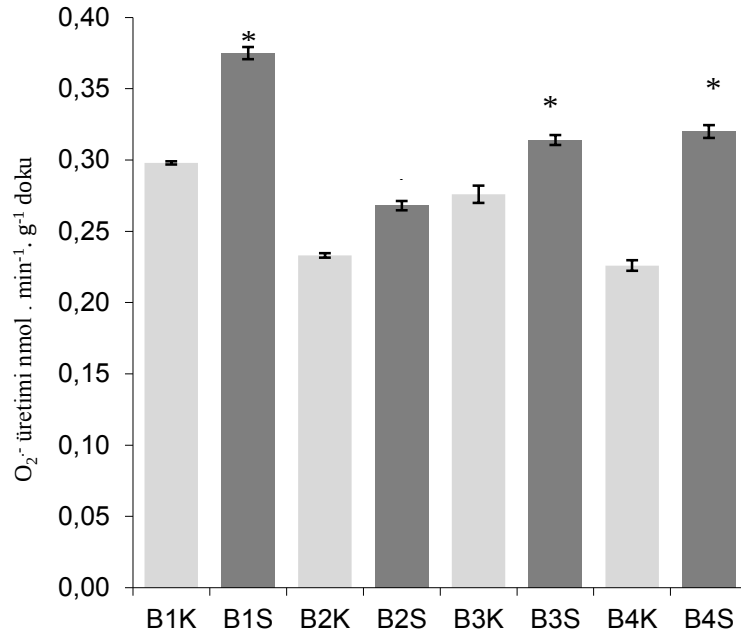
Lahana bitkisinde soğuk uygulaması H_2O_2 içeriğini artırmıştır. Kontrol bitkisinde H_2O_2 içeriği 0.09 nmol.g^{-1} değerinde ölçülmesine rağmen soğuk uygulaması bu değeri %22 oranında artırmış ve 0.11 nmol.g^{-1} değerine ulaştırmıştır (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Lahana bitkisinde düşük sıcaklığın H_2O_2 aktivitesi üzerine etkisi
**P < 0.05* önem seviyesine göre fark anlamlıdır

4.5. Süperoksit O_2^- İçeriği Sonuçları

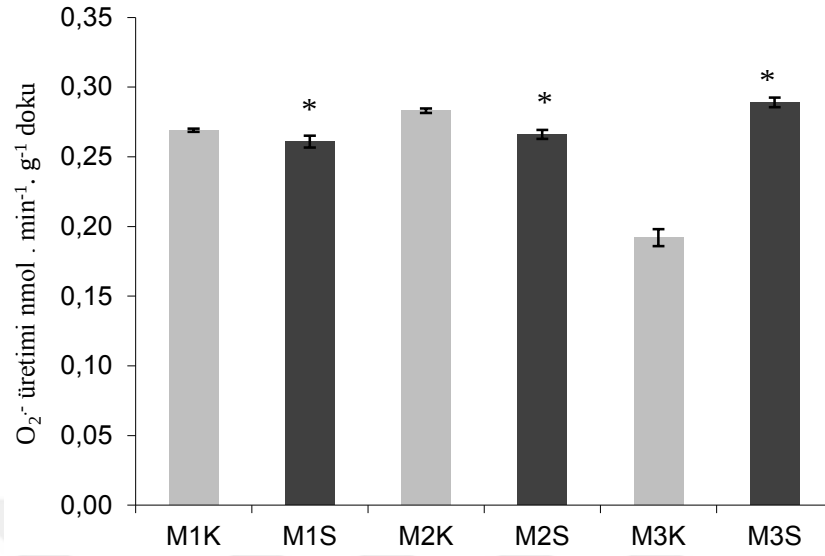
Buğday varyetelerinin yaprak dokusunda süperoksit anyonu içeriği soğuk uygulaması ile yükseldiği belirlenmiştir (Şekil 4.29). B1, B2, B3, B4 ifadeleriyle kodlanan varyetelerin kontrol gruplarında süperoksit anyonu içeriği sırasıyla $0.30 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$, $0.23 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$, $0.28 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$, $0.23 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ değerleri kaydedilmiş soğuk uygulaması sonrasında bu değerler sırasıyla $0.38 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$, $0.27 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$, $0.31 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$, $0.32 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ değerlerine ulaşarak artış göstermiştir. B1, B2, B3 ve B4 bitkilerinin süperoksit anyonu içeriğiklerinde kontrol gruplarına oranla %26, %17, %10, %39 artış kaydedilmiştir.



Şekil 4.29. Buğday bitkisi çeşitlerinde(B1, B2, B3, B4) düşük sıcaklığın Süperoksit aktivitesi üzerine etkileri

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

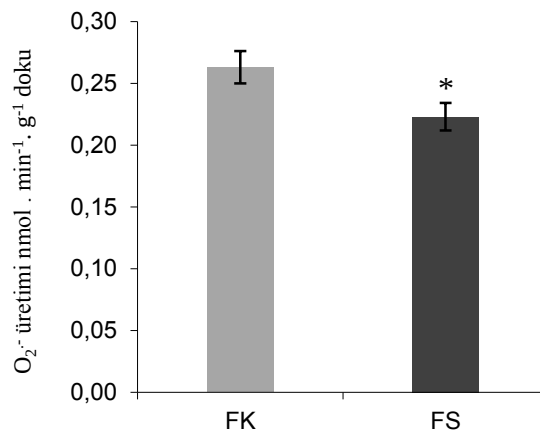
Mısır varyetelerinin yaprak dokusunda soğuk uygulaması ile süperoksit anyonu içeriği M1 ve M2 ifadeleriyle kodlananlarda azalırken M3 varyetesinde yükseldiği belirlenmiştir (Şekil 4.30). M1, M2 bitkilerinde süperoksit anyonu içeriği değerleri sırasıyla 0.27 nmol.min⁻¹.g⁻¹, 0.28 nmol.min⁻¹.g⁻¹ kaydedilmiş soğuk uygulaması sonrasında bu değerler sırasıyla 0.26 nmol.min⁻¹.g⁻¹, 0.27 nmol.min⁻¹.g⁻¹, değerlerine inerek azalma göstermiştir. M1 ve M2 bitkilerinin her ikisinde de süperoksit anyonu içeriği soğuk uygulamasıyla %3 oranında düşüş göstermiştir. M3 bitkisinde ise kontrol grubunda 0.19 nmol.min⁻¹.g⁻¹ olarak ölçülen süperoksit anyonu miktarı soğuk uygulaması ile %52 oranında artışla 0.29 nmol.min⁻¹.g⁻¹ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.30. Mısır bitkisi çeşitlerinde (M1, M2, M3) düşük sıcaklığın Süperoksit aktivitesi üzerine etkileri

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

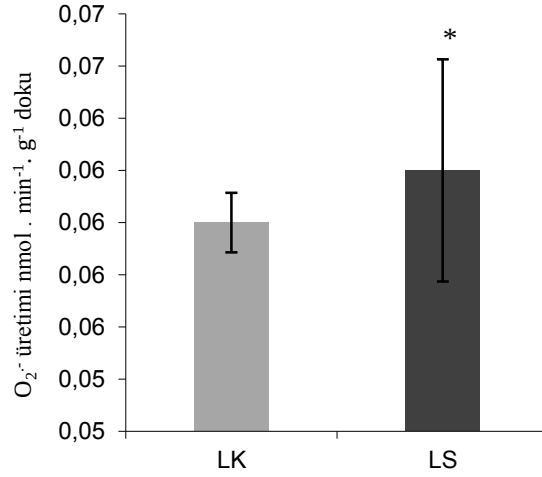
Fasulye yaprak dokusunda süperoksit anyonu içeriği soğuk uygulaması ile düşmüştür. Kontrol grubunda $0.26 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ olarak ölçülen süperoksit anyonu miktarı soğuk uygulaması ile %-15 oranında azalmayla $0.22 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Fasulye bitkisinde düşük sıcaklığın Süperoksit aktivitesi üzerine etkisi

* $P < 0.05$ önem seviyesine göre fark anlamlıdır

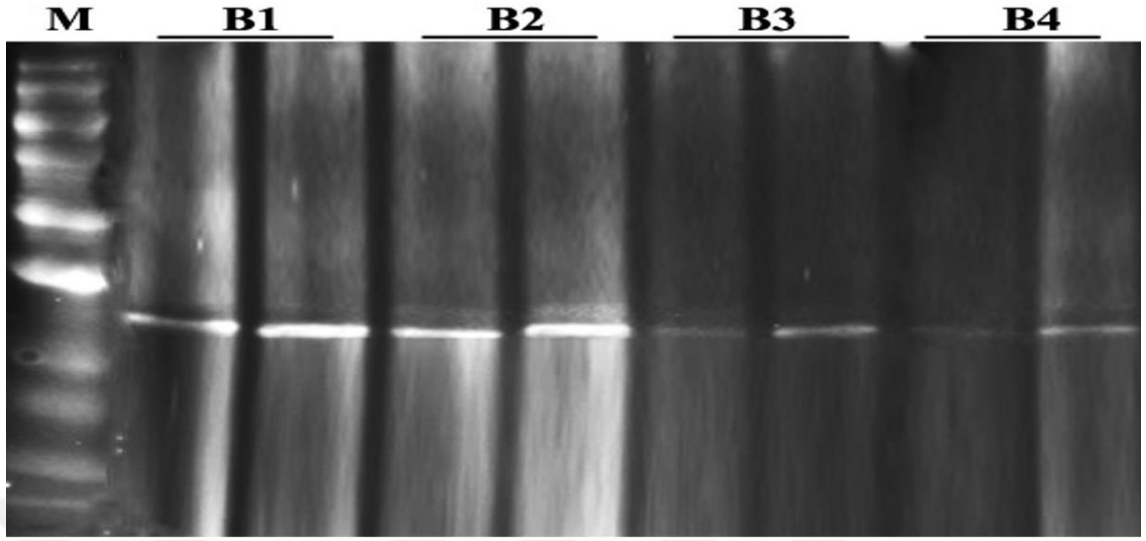
Lahananın yaprak dokusunda süperoksit anyonu içeriği soğuk uygulaması ile yükseldiği belirlenmiştir (Şekil 4.32). Kontrol grubunda $0.06 \text{ nmol.min}^{-1}.g^{-1}$ olarak ölçülen süperoksit anyonu miktarı soğuk uygulaması ile %3 oranında artışla $0.062 \text{ nmol.min}^{-1}.g^{-1}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.32. Lahana bitkisinde düşük sıcaklığın Süperoksit aktivitesi üzerine etkisi
**P < 0.05* önem seviyesine göre fark anlamlıdır

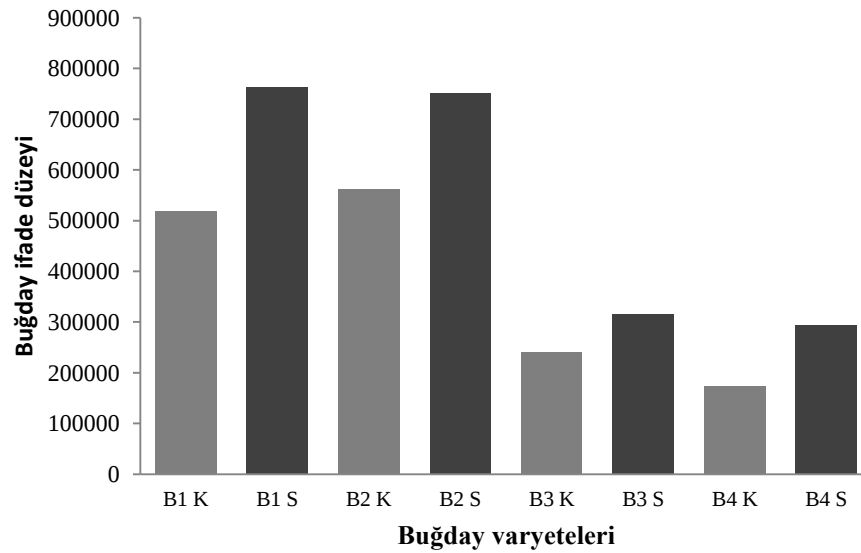
4.6. AOX proteini ifadesi analiz Sonuçları (Western Blot)

Araştırmanın bu kısmına bitkilerin yaprak dokularından mitokondri izole edilerek AOX proteinin ifade düzeyi belirlenirken kullanılan western blot tekniği ile devam edilmiştir.



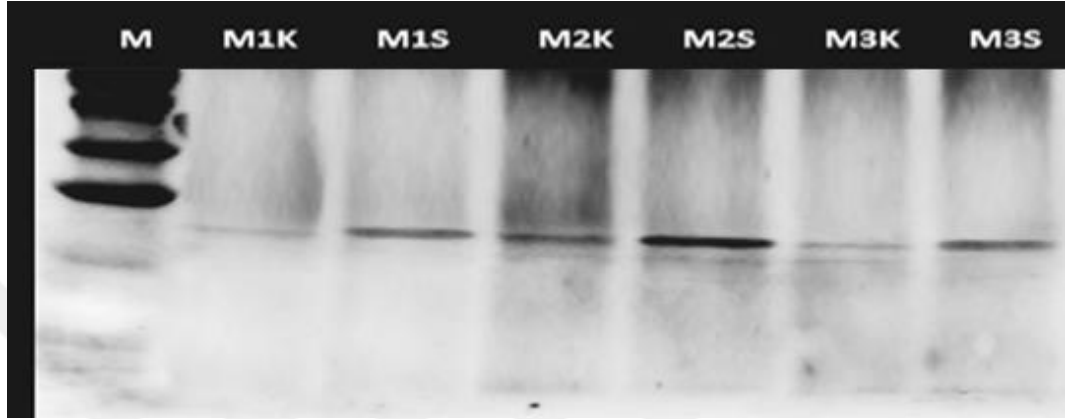
Şekil 4.33. Düşük sıcaklık uygulamalarıyla buğday bitkisinde AOX proteini translasyon düzeyi değişimi

Buğday bitkisi varyetelerinin tamamında, yaprak dokusu mitokondrilerinde düşük sıcaklık uygulamasıyla AOX proteini düzeyi artışı belirgin olarak görülebilmektedir (Şekil 4.33).



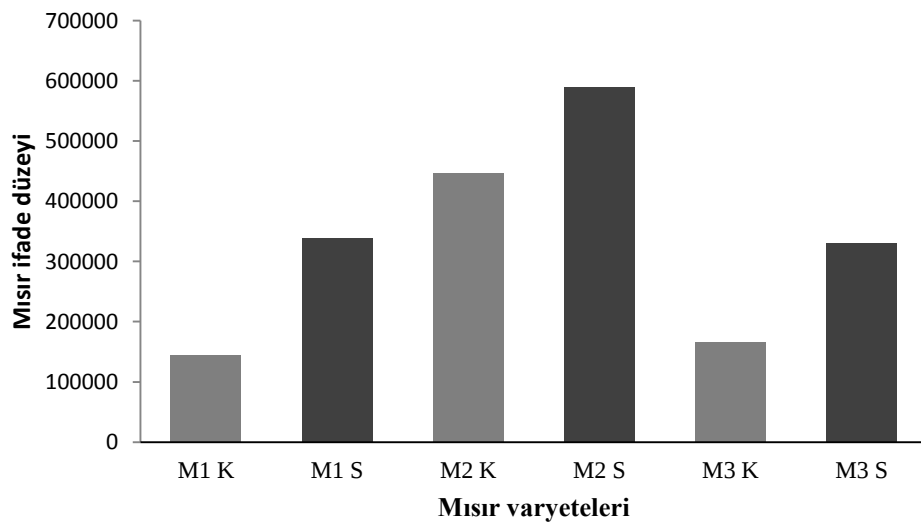
Şekil 4.34. Düşük sıcaklık uygulamalarıyla buğday bitkisinde AOX proteini translasyon düzeyinin analizi

Düşük sıcaklık uygulaması neticesinde AOX proteini transkripsiyon düzeyi analizlerine göre buğday varyetelerinden B1, B2, B3 ve B4 bitkilerinde sırasıyla %47, %33.5, %31 ve %70 oranında artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.34).



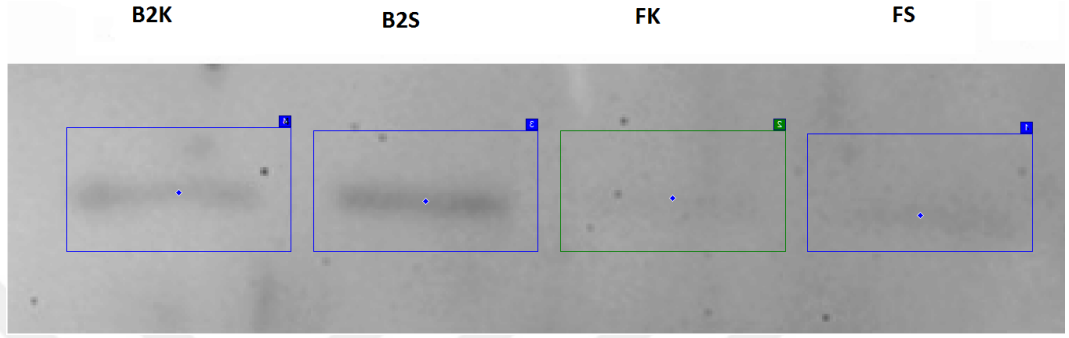
Şekil 4.35. Düşük sıcaklık uygulamalarıyla mısır bitkisinde AOX proteini transkripsiyon düzeyi değişimi

Mısır bitkisi varyetelerinin tamamında, yaprak dokusu mitokondrilerinde düşük sıcaklık uygulamasıyla AOX proteini düzeyi artışı belirgin olarak görülebilmektedir (Şekil 4.35).



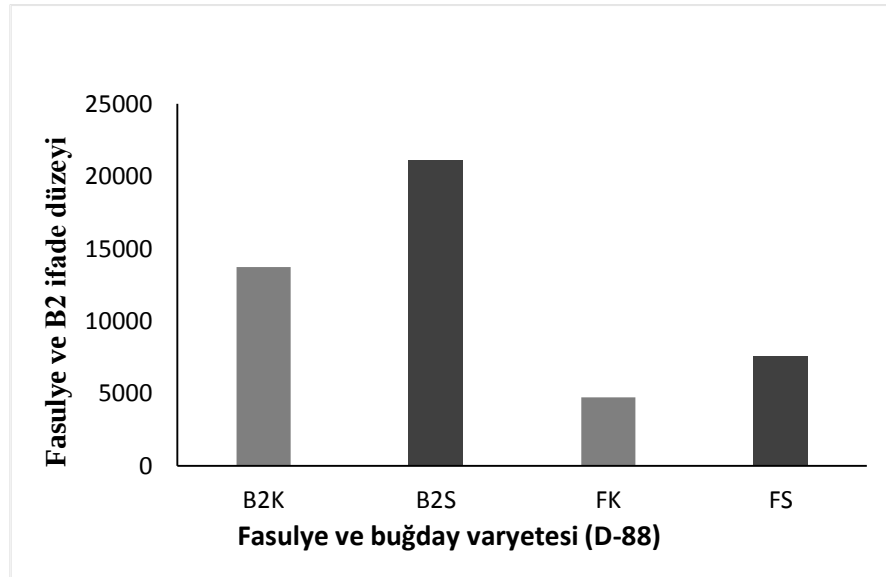
Şekil 4.36. Düşük sıcaklık uygulamalarıyla mısır bitkisinde AOX proteini transkripsiyon düzeyinin analizi

Düşük sıcaklık uygulaması AOX proteini transkripsiyon düzeyi analizlerine göre mısır varyetelerinin tamamında artışa sebep olmuştur. M1, M2, M3 bitkilerinde sırasıyla %134.5, %32, %98 oranında artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.36).



Şekil 4.37. Düşük sıcaklık uygulamalarıyla fasulye bitkisinde AOX proteini transkripsiyon düzeyi değişimi

Fasulye bitkisi yaprak dokusu mitokondrilerinde düşük sıcaklık uygulamasıyla AOX proteini düzeyi artışı belirgin olarak görülebilmektedir (Şekil 4.37).



Şekil 4.38. Düşük sıcaklık uygulamalarıyla fasulye bitkisinde AOX proteini transkripsiyon düzeyinin TotalLab TL-120 programına göre analizi

Düşük sıcaklık uygulaması AOX proteini translasyon düzeyi analizlerine göre fasulye bitkisinde kontrol grubuna kıyasla %60 oranında artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.38).



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırmada soğuga direnç yetenekleri farklılık gösteren bitki türlerinde, yapılan kontrollü soğuk uygulamasıyla, bu bitkilerdeki alternatif oksidaz (AOX) aktiviteleri ile soğuga direnç yeteneği arasında herhangi bir ilişki olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla buğday ve mısırın soğuga direnç özelliklerinin farklılık gösterdiği varyeteleri ve bunların yanısıra, soğuga çok hassas olduğu bilinen bir fasulye ve çok dayanıklı olduğu bilinen bir lahanaya varyetesinin tohumları temin edilmiştir. Çimlendirilerek belirli bir büyüklüğe kadar yetiştirilen fidelere, üşüme hasarları oluşturacak kadar belirli sürelerde üşüme sıcaklıkları uygulanmış ve sonrasında bu bitkilerin kontrollü şartlarda yetiştirilenlerin yaprakları deney materyali olarak alınmıştır. Bu materyaller, amaca uygun olarak üşüme sıcaklıklarının etkisiyle bitkilerde oluşması muhtemel olan oksidatif hasarların seviyesini belirlemek üzere bazı antioksidant enzimlerin (Katalaz, Peroksidaz, Süperoksit Dismutaz, Askorbat Peroksidaz, Glutasyon Reduktaz) ve oksidatif hasarı direkt olarak gösteren MDA içeriği, H_2O_2 içeriği, Süperoksit içeriği ve ayrıca asıl üzerinde yoğunlaşmış olduğumuz, soğuga dirençle ilişkili olduğunu düşündüğümüz AOX enzim aktivitesi gibi parametrelerin araştırılması için kullanılmıştır.

Yaptığımız antioksidant enzim aktivitesi analizlerinde, Katalaz aktivitesinin buğday varyetelerinin bazılarında kontrol bitkilerine kıyasla artma, bazılarında ise azalma (Şekil 4.5), mısır varyetelerinde azalma, fasulyede istatistiki olarak değişmediği, oysa lahanada artma eğilimi gösterdiği, Peroksidaz ve Süperoksit Dismutaz aktivitelerinin de bu bitkilerde (fasulye hariç) genel anlamda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Askorbat peroksidaz aktivitelerinin tüm bitki varyetelerinde genel olarak artmış olduğu, Glutasyon Reduktaz ve oksidatif hasarın seviyesini gösterme anlamında önemli olan H_2O_2 ve Süperoksit içeriklerinin buğday varyetelerinde artma ve azalmalar, mısır ve fasulyede azalma, lahanada ise artma şeklinde değişim gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakarak, üşüme sınır sıcaklığının tüm bitkilere ait varyetelerde antioksidant enzim aktivitelerine etki etmiş olduğunu, soğuga dayanıklı türler olduğu bilinen buğday ve lahanada genel anlamda tüm antioksidant enzim aktivitelerinin artışına yol açtığını,

ancak bazı buğday varyeteleri ve soğuğa dayanıksız olduğu bilinen mısır ve fasulyede (APX hariç) ise bunun tam tersi sonuçları ortaya çıkardığını söylemek mümkündür. Strese maruz kalan bitkilerde tüm antioksidant enzimlerin aktivitelerinde ve oksidatif hasarın oluştuğunu gösteren H_2O_2 ve Süperoksit içeriği gibi parametrelerde artış olması beklenen bir tepkidir (Şekil 4.25-4.32). Zira bu tepki, soğğun bitkide hasar oluşturduğu (hücre ve organel zarlarında kırılma gibi) ve bu hasarın sonucu olarak, bitki hücrelerinde hücre kompartımanlarına zarar veren oksidant maddelerin bertaraf edilebilmesi amacıyla, bitkinin kendi genetik potansiyellerini harekete geçirerek oluşturması gereken bir cevap niteliğindedir (Bowler *et al.* 1991; Van Camp *et al.* 1994; Foyer *et al.* 1997; Apel and Hirt 2004) Ancak bu cevabın, soğuğa dayanıklı türlerde (buğday ve lahanada) artmış olması, buğday ve lahanada uygulanan soğğun hücrede ciddi bir oksidatif hasara yol açtığını ve bu hasarların giderilmesi için gerekli tüm genetik potansiyellerin harekete geçirebildiğini göstermektedir. Oysa soğuğa dayanıksız olduğu bilinen türlerde (mısır ve fasulye) antioksidant enzim aktivitelerinin ve H_2O_2 ve Süperoksit içeriklerinin genel anlamda azalma şeklinde çıkmış olması, mısır ve fasulyede oksidatif hasar oluşturacak sıcaklıklar uygulanmış olması ve bu bitkilerin de üşümeye çok hassas bitkiler arasında yer aldıkları dikkate alındığında, bu türlerin stres şartlarında hasara uğramış olmalarına rağmen, genetik potansiyelleri, gerekli tüm antioksidant enzim aktivitelerini düzenlemek gibi bazı cevapları oluşturmaya yeterli olmadığından dolayı böylesi sonuçların alındığını gösterir nitelikte olmuştur. Diğer taraftan, bitkilerin antioksidant enzim aktivitelerine bakarak, bitkinin strese dayanıklı olduğuna karar vermenin pek de mümkün gözükmediği birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Li *et al.* 2010; Liu *et al.* 2011; Avcı 2016). Ancak bu araştırmada birden fazla dayanıklı ve dayanıksız bitki üzerinde araştırma yapıldığından dolayı, genel anlamda alınan sonuçlara bakarak, soğuğa dirençli bitkilerin, soğuk stresinin yol açtığı hasarları bertaraf etmek için gerekli metabolik tepkilerden biri olan antioksidant kapasitenin harekete geçirilmesinde, direnci az veya dirençsiz olanlara nispeten daha fazla başarılı olduklarını ve buğday ve lahanada bitkilerinin soğuğa dirençli olmalarını sağlayan, antioksidant kapasitelerini yeterince harekete geçirebildiklerini söylemek mümkün görünmektedir.

Yaptığımız analizler sonucunda, düşük sıcaklık uygulamasının buğday ve mısır varyetelerinde, fasulye ve lahanada, LPO seviyelerini kontrol gruplarına kıyasla artırdığı, ancak artış seviyeleri kıyaslandığında, mısır varyetelerinde ki artış yüzdelерinin (%125, 122 ve 45) buğday ve fasulye ve lahana bitkilerine nispeten çok yüksek olduğu, sadece buğdayın B2 kodlu varyetesinde %47’lik bir değerin olduğu belirlendi (Şekil 4.-4.4). LPO seviyesi analizi, bitkinin maruz kaldığı stres sonrasında, bitkinin hücresel zararlarında meydana gelen hasarların büyüklüğünü gösteren ve strese dayanıklılık çalışmalarında, strese dayanıklılığın nisbi ve kantitatif olarak belirlenmesinde çok kullanılan bir parametredir. Çünkü bitkilerin hasar oluşturabilecek kadar bir strese maruz kalması durumunda, bitki hücrelerinde ilk hasar oluşumu hücre zararlarında ortaya çıkmaktadır. Hücre zararlarında görülen bu hasarın, stresin etkisiyle sitoplazmada oluşan ROT’ların, hücre zararlarına gelerek, lipid ikili tabakasındaki doymamış yağlara bağlanmaları nedeniyle olduğu bilinmektedir (Halliwell and Gutteridge 1989; Wagner and Moore 1997). Bunun sonucunda hücre zararlarında lipid peroksidasyon oluşumu süreci başlamış olur ve sonrasında hücre zarındaki enzimlerin aktiviteleri azalır, yine hücre zarının yapısında bulunan taşıyıcılar, reseptörler fonksiyonel kayıplara uğrar ve böylece hücre zarının seçici geçirgenlik özelliği azalır ve müteakiben hücre metabolizması bozulmaya başlar (Chen *et al.* 1995). Bu bulgular ışığında, bu bitkiler için ayrı ayrı belirlenmiş olan “üşüme hasarı sınır sıcaklığı” derecelерinin (buğday için 5/2°C, mısır için 10/7°C, fasulye için 8/5°C, lahana için ise 5/2°C) ve 48 saatlik sürenin amacımıza uygun olduğunu, yani kullandığımız türlerin hepsinde üşüme hasarlarının oluşumuna yeterli olduğunu, ve yine mısır bitkilerine diğer türlere uygulanandan daha yüksek sıcaklıklar (10/7°C) uygulanmasına rağmen, çok daha yüksek LPO seviyelerinin oluşmuş olmasından dolayı, tüm bu türler içerisinde, mısıra ait bu varyetelerin düşük sıcaklıklara en hassas konumda olduğunu söylemek mümkündür.

Araştırmamızda, AOX proteini translayon düzeylerinin, yapılan üşüme sınır sıcaklığı uygulamalarıyla kendi kontrollerine kıyasla buğday ve mısır varyetelerinin hepsinde ve fasulyede bariz olarak arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.33–4.36). AOX enzim aktivitesinin stres olmayan durumlarda genellikle düşük olduğu bilinmektedir. Soğuk stresi

(Vanlerberghe and McIntosh 1992a; Purvis and Shewfelt 1993) ve diğer birçok çevresel faktörlerden ötürü (Meeuse 1975; Laties 1982a; Hiser and McIntosh 1990; Moore and Siedow 1991; Vanlerberghe and McIntosh 1992; Lennon *et al.* 1997; Simons *et al.* 1999b; Juszczuk *et al.* 2003) ve yine hücrede ROS türlerinin artışı (Prasad *et al.* 1994) ile AOX aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Bu rapor edilen bulgular ve bizim elde ettiğimiz sonuçlar biraraya getirildiğinde, soğuk stresinin AOX proteini transkripsiyon düzeyinin arttığını, dolayısıyla bu bitkilerde düşük sıcaklığın mitokondriyal zarlarda hasar oluşturmakta olduğunu ve bitkilerde ROS oluşumunun arttığını, buna tepki olarak, oksidatif hasarı bertaraf edebilmek maksadıyla AOX enzim aktivitesinin artırılmış olduğu görülmüştür. Ancak kendi kontrolleriyle kıyasla AOX aktivitesindeki artış oranlarına bakarak, buğday için %47, %33.5, %31 ve %70, mısır varyeteleri için %134.5, %32, %98 ve fasulye için %60 olarak belirlenmiş olması nedeniyle, bu rakamsal değerlere bakıldığında, sanki dayanıksız olan mısır ve fasulye bitkilerinde de güçlü bir AOX aktivitesi varmış gibi görünmektedir (Şekil 4.33-4.36). Oysa jel görüntüleri ayrıntılı olarak incelendiğinde, buğday varyetelerinin kontrollerinde bile AOX aktivitelerinin, mısır varyeteleri ve fasulyedekinden çok daha yüksek olduğu, düşük sıcaklığın uygulanması halinde zaten yüksek olan bu değerlerin çok daha yükselmiş olduğu, fakat kontrol ile kıyaslandığında bu artış oranlarının mısır varyeteleri ve fasulyedeki ile benzerlik göstermiş olduğu göze çarpmaktadır. Hatta buğday varyeteleri kendi arasında kıyaslandığında, soğuğa en dayanıklı olan B1 ve B2 Kodlu Yıldırım ve Doğu-88'e ait kontrollerde de AOX aktivitelerinin, B3 ve B4 kodlu Ayyıldız ve Alpaslan varyetelerinin kontrollerine nazaran daha yüksek olması ve düşük sıcaklık uygulamasıyla birlikte B1 ve B2'de, B3 ve B4'e göre çok daha yüksek AOX aktivitelerinin ortaya çıkmış olması, bizim, soğuğa dayanıklılık ve AOX aktivitesi arasında güçlü bir ilişkinin olduğu yönündeki görüşümüzü destekler niteliktedir. Bu arada şunu da belirtmekte fayda vardır ki; düşük sıcaklığa maruz kalma halinde bitkilerde görülen AOX aktivite artışı, dirençle ilişkilidir. Ancak bu artışın düzeyinin yeterli olması, yani güçlü bir şekilde AOX aktivitesinin artmış olması gereklidir. Aksi halde ROS oluşumunu engelleyen ve bitkide iç sıcaklığın artışını sağlayan bu metabolik yolun yeteri kadar devreye sokulamaması halinde, bitkide mutlak bir soğuğa direnç oluşumu görülmeyecektir. Bu düşüncemizi destekleyen bulguları, fasulye ve mısır

varyetelerinde belirlediğimiz AOX aktivite değerlerini gösteren bantlara bakarak görmek mümkündür.

5.1. Sonuç

Bu araştırmada, 4 farklı buğday, 3 farklı mısır varyetesi ve ayrıca fasulye ve lahanada bitkilerinin her birine kendi türüne has üşüme sınır sıcaklığı uygulamaları yapılarak elde edilen tüm bulgular bir araya getirildiğinde;

- Üşüme sınır sıcaklığının tüm bitkilere ait varyetelerde antioksidant enzim aktivitelerine etki etmiş olduğunu, soğuğa dayanıklı türler olduğu bilinen buğday ve lahanada genel anlamda tüm antioksidant enzim aktivitelerinin artışına yol açtığını, ancak bazı buğday varyeteleri ve soğuğa dayanıksız olduğu bilinen mısır ve fasulyede (APX hariç) ise bunun tam tersi sonuçları ortaya çıkardığını,
- Soğuğa dirençli bitkilerin, soğuk stresinin yol açtığı hasarları bertaraf etmek için gerekli metabolik tepkilerden biri olan antioksidant kapasitenin harekete geçirilmesinde, direnci az veya dirençsiz olanlara nispeten daha fazla başarılı olduklarını, yani buğday ve lahanada bitkilerinin soğuğa dirençli olmalarında önemli rolü olan, antioksidant enzim kapasitelerini yeterince harekete geçirebildiklerini,
- Üşüme sınır sıcaklığı uygulanması halinde, LPO seviyelerinin belirlenmesinin, bitkilerdeki üşüme hasarlarının oluşup oluşmadığı, ayrıca oluşan hasarın türler ve tür içinde varyeteler arasında nasıl değişim gösterdiğini anlamada uygun bir yöntem olduğunu,
- Soğuğa dayanıklı türe ait varyeteler kendi arasında kıyaslandığında, soğuğa en dayanıklı olan varyetelere ait kontrol bitkilerinde de AOX aktivitelerinin, soğuğa direnci nisbeten az olan varyetelerinin kontrollerine nazaran daha yüksek olması ve düşük sıcaklık uygulamasıyla birlikte dayanıklı varyetelerde, nispeten dayanıklılığı az olanlara göre çok daha yüksek AOX aktivitelerinin ortaya çıkmış olması nedeniyle, soğuğa dayanıklılık ve AOX aktivitesi arasında güçlü bir ilişkinin olduğunu,
- Soğuğa direnci çok az olan mısır varyeteleri ve fasulyeden aldığımız sonuçlardan yola çıkarak, düşük sıcaklığa maruz kalma halinde bitkilerde görülen AOX aktivite

artışının dirençle ilişkili olduğunu, ancak bu artışın düzeyinin yeterli olması gerektiğini, yani güçlü bir şekilde AOX aktivitesinin artmış olması gerekli olduğunu, ufak çaptaki artışların direnç sağlama için yeterli olmayacağını söylemek mümkündür.

Yine bu araştırmada elde edilen bulgulara bakarak, özellikle bu araştırmanın da temelini oluşturan AOX enziminin sorumlu olduğu, “Alternatif Solunum Yolu” denilen metabolik yolun, yapılacak eksojen uygulamalar ile aktiveleştirilebilme durumunun araştırılması, soğuğa direnci az olduğu bilinen bitkilere direnç sağlamak adına faydalı sonuçlar verebilir düşüncesindeyiz. Ayrıca AOX enziminin ileri moleküler tekniklerle, sentezinden sorumlu gen bölgesinin, transkripsiyonuna etki eden faktörlerin belirlenmesinin gerekli olduğu kanaatini taşımaktayız.

KAYNAKLAR

- Abdrakhmanova, A., Zickermann, V., Bostina, M., Radermacher, M., Schgger, H., Kerscher, S., Brandt, U., 2004. Subunit composition of mitochondrial Complex I from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta*, (1658), 148-156.
- Agarwal, S. and Pandey V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 48(4), 555-560.
- Ahmad, P ., Sarwat, M., Sharma,S., 2008. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Signaling in Plants *Journal of Plant Biology*, May, 51 (3) ,167-173.
- Akkus, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkiler, Mimoza Yayınları,Konya.
- Alberdi, M. and Corcuera, L. J., 1991, Cold acclimation in plants, *Phytochemistry*,30 (10): 3177-3184.
- Allen, D.J. and Ort, D.R., 2001, Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants, *Trends Plant Sci.*, 6, 36-42.
- Amaya, I., Botella, MA., Calle, M., Medina, M.I., Heredia, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quesada, MA., Valpuesta, V., 1999. Improved germination under osmotic stress or tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett*, (457), 80-84.
- Ananieva, E.A., Alexieva, V.S., Popova, L.P., 2002. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *J. Plant Physiol.*, 159, 685-693.
- Aono, M., Saji, H., Fujiyama, S., Sugita, M., 1995. Decrease in Activity of Glutathione Reductase Enhances Paraquat Sensitivity in Transgenic *Nicotiana tabacum*, *Plant Physiol.*, (107), 645-648.
- Apel, K. and Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, (55), 373–399.
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant*, (85), 235-241.
- Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141:391–396
- Avcı, T., 2016. Üşümeye hassas olan bazı bitkilere aklımasyon sağlamak amacıyla UV ışınlarının kullanımının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Aydin, M., Taspınar, MS., Cakmak, ZE., **Dumlupınar, R.**, Agar, G., 2016. Static magnetic field induced epigenetic changes in wheat callus, *Bioelectromagnetics*, 37/ 7: 504-511, DOI: 10.1002/bem.21997
- Bakardjieva, N., and Christov K., 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from moses (*Mnium* sp.) and ferns (*Polydium vulgare*) to hight temperature. *Can. J. Bot.*, 74, 1665-1670.
- Banci, L., 1997. Structural properties of peroxidase. *J. Biotech.*, (53), 253-263.
- Baskin, S.L., Salem, H., 1997. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Washington, D.C. Taylor & Francis. 364 p.
- Bauchanan, B.B., Schürmann, P., Wolosiuk, R.A., Jacquot, J.P., 2002. The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond. *Photosynth. Res.*, 73, 215-222.

- Bergmeyer, J., and Grabl, M., 1983. *Methods of Enzymatic Analysis* (Third Edition), pp.190-302, Germany.
- Berry, E.A., Guergova-Kuras, M., Huang, L.S., Crofts, A.R., 2000. Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, (69), 1005-1075.
- Bertamini, M., Zulini, L., Muthuchelian, K. Ve Nedunchezian, N. (2007). Low night temperature effects on photosynthetic performance on two grapevine genotypes. *Biol. Plantarum* 51, 381-385.
- Bidwell, R.G.S., 1974. *Plant Physiology*, Giles, McMillan Co., New York.
- Blokhina, O., E. Virolainen and K.V. Fagerstedt, 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation Stress: A review. *Ann. Bot.*, 91, 179-194.
- Bois, J.F., Winkel, T., Lhomme, J.P., Raffaillac, J.P. ve Rocheteau, A. (2006). Response of some Andean cultivars of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to temperature: effects on germination, phenology, growth and freezing. *Eur. J. Agron.* 25, 299-308.
- Bolwell, G.P., 1999. Role of reactive oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol.*, 2, 287-294.
- Borecky, J. and Vercesi, A.E., 2005. Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress. *Bioscience Reports*, (24), 269-283.
- Bowler, C., Slooten, I., Tsang, W.T., Vancamp, W., Vanmontagu, M., Inze, D., 1991. Oxidative stress in plants. *Nato Advanced Science Institutes Series, Series a, Life Sciences*, (212), 695-705.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Biochem.*, (72), 248-254.
- Braidot, E., Petrucci, E., Vianello, A., Macr, F., 1999. Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. *FEBS Letters*, 451(3), 347-350.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., 2000, Responses to abiotic stresses, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones (eds), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 158-1249.
- 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
- Bunkelmann, J.R., ve Trelease, R.N., 1996, Ascorbate peroxidase: a prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes, *Plant Physiol.*, 110, 589-598.
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, (58), 79.
- Calegario, F.F., Cosso, R.G., Fagian, M.M., 2003. Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.*, (35), 211-220.
- Campbell, C., Atkinson, L., Zaragoza-Castells, J., Lundmark, M., Atkin, O., Hurry, V., 2007. Acclimation of photosynthesis and respiration is asynchronous in response to changes in temperature regardless of plant functional group. *New Phytol.*, (176), 375-389.

- Cassels, A. C. and Curry, R. F., 2001, Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 64, 145-167.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiology Reviews*, 59:527–605.
- Chaudiere, J., and Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem. Toxicol.*, 37, 949-962.
- Chien, L., Wu, Y., Chen, H., 2011. Mitochondrial energy metabolism in young bamboo rhizomes from *Bambusa oldhamii* and *Phyllostachys edulis* during shooting stage. *Plant Physiology and Biochemistry*, (49), 449-457.
- Creissen, G., Broadbent, P., Stevens, R., Wellburn, A.R., Mullineaux, P.M., 1996. Manipulation of Glutathione Metabolism in Transgenic Plants, *J. Biochem.*, 24, 465-472.
- Creissen, G., Edwards, E.A., Mullineaux, P.M., 1994. Glutathione Reductase and Ascorbate Peroxidase, In: *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants*, Foyer, C.H., Ed., Mullineaux, P.M., CRC Press. Boca Raton, 343-364.
- De Santis, A., Perangelo, L. ve 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 Virville, J.D., Cantrel, C., Bousquet, A.L., Hoffelt, M., Tenreiro, A.M., Pinto, V.V., Arrabaça, J.D., Caiveau, O., Moreau, F. ve Zachowski, A. (2002). Homeoviscous and functional adaptations of mitochondrial membranes to growth temperature in soybean seedlings. *Plant Cell Environ.* 25, 1289-1297.
- Dehon, L., Macheix, J.J., ve Durand, M., 2002, Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*, *J. Exp. Bot.*, 53, 303–311.
- Dhindsa, R., Plumb-Dhindsa, P., ve Thorpe, T., 1981, Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase, *J. Exp. Bot.*, 32, 93–101.
- Djajaneğara, 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.
- Doğru, A., 2006. Kolza (*brassica napus* L. ssp. *oleifera*)’nın bazı kışlık çeşitlerinde düşük sıcaklık toleransı ile ilgili fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerin araştırılması
- Dudkina, N.V., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., Boekema, E.J., Braun, H., 2006. Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends in Plant Science*, 11(5), 232-240.
- Durmuş, N., 2003. Büyüme düzenleyici maddelerin oksidatif stres üzerine etkileri. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü., Trabzon.
- Elstner, E.F. and Heupel, A. 1976. Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish. *Planta*, 130, 175-180.
- Elstner, E.F., 1982 Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu Rev Plant Physiol.*, 33:73-96

- Elthon, T.E., Nickels, R.L., McIntosh, L., 1989. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol.*, (89), 1311-1317.
- Ensminger, I., Busch, F., Huner, N.P.A., 2006, Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis, *Physiol. Plantarum*, 126, 28-44.
- Erdei, S., Hegedüs, A., Hauptmann, G., Szalai, J., ve Horvath, G., 2002, Heavy metal induced physiological changes in the antioxidative response system, *Acta Biol Szeged*, 46 3-4, 89-90.
- Eyidogan, F.D., Öktem H.A., Yücel, M., 2003. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. *Acta Physiologia Plantarum*, (25), 263-269
- Fernie, A.R., Carrari, F., Sweetlove, L.J., 2004. Respiratory metabolism: Glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in PlantBiology*, 7: 254-261.
- Finnegan, P.M., Soole, K.L., Umbach, A.L., 2004. Alternative mitochondrial electron transport proteins in plants. In: Day, D.A., Millar, A.H., Whelan, J.(eds), *Plant Mitochondria: From Genome to Function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 163-230.
- 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.
- Foyer, C., Noctor, G., 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.*, 28, 1056-1071.
- Foyer, C.H., Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, (133), 21-25.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant.*, (100), 241-254.
- Foyer, C.H., Vanacker, H., Gomez, L.D., Harbinson, J., 2002, Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures:review, *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 659-668.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, (64), 97-112.
- Friedrich, T. and Bottcher, B., 2004. The gross structure of the respiratory Complex I: a Lego system. *Biochim. Biophys. Acta*, (1608), 1-9.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J. F. And Dommes, J., 2002, Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures, *Plant Growth Regulation*, 37, 263-285.
- 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.
- Girotti, A.W., 1985. Mechanisim of lipid peroxidation. *J.free radicals bio.med.*, , 87-95.
- Gong, Y., Toivonen, P.M.A., Lau, O.L. and Wiersma, PA., 2001. Antioxidant system level in 'Braeburn' apple in related to its browning disorder. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 42, 259-264.

- 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 alternative oxidase. *Plant Cell Physiology*, 45: 1413-1425.
- Gupta, K.J., Zabalza, A., van Dongen, J.T., 2009. Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiologia Plantarum*, 137: 383–391
- Güler, N.S., 2008. *Ctenanthe setosa*'da yaprak kıvrılması sırasında apoplastik ve simplastik alanlarda antioksidan sistemde meydana gelen değişimler. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon
- Hale, M.G., Orcutt, D.M., 1987. The physiology of plants under stress, John Wiley and, New York, 206p.
- Hale, M.G., ve Orcutt, D.M., 1987. The Physiology of Under Stress, John Wiley and Sons, New York, USA.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. 1989. Free radicals in biology and medicine, Oxford, clarendon Press. 86-123 p.
- Halliwell, B., 1984. Toxic Effects of Oxygen on Plant Tissues, In: Chloroplast Metabolism, The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells. Oxford Press, Oxford, 180-206.
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* (141), 312–322.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., 1999. Free radicals in biology and medicine , Oxford university press, Oxford. Aust, S.D., Morehouse, L.A., and Thomas, C.E. 1985. Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Radical. Biol. Med.* , (1), 3–25.
- He, Y.L., Liu, Y.L., Cao, W.X., Huai, M.F., Xu, B.G., Huang, B.G., 2005. Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in Kentucky bluegrass. *Crop Sci.*, 45, 988-995.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 25, 189-198.
- 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.
- Hogewoning, S.W. and Harbinson, J., 2007. Insights on the development, kinetics, and variation of photoinhibition using chlorophyll fluorescence imaging of a chilled, variegated leaf. *J. Exp. Bot.*, (58), 453-463.
- Hua-Ming Chen , Koji Muramoto , Fumio Yamauchi, Kenshiro Fujimoto , and Kiyoshi Nokiara. Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein, *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46 (1), pp 49–53. DOI: 10.1021/jf970649w
- Huner, N. P. A., Öqüist, G. and Sarhan, F., 1998, Energy balance and acclimation to light and cold, *Trends in Plant Science*, 3 (6): 224-230.
- Ishikawa, H.A. (1996). Ultrastructural features of chilling injury: injured cells and the early events during chilling of suspension-cultured mung bean cells. *Am. J. Bot.* 83, 825-835.

- Jaleel, C.A., Sankar, B., Sridharan, R., Panneerselvam, R., 2008. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turk. J. Biol.*, (32), 79–83.
- Janda, T., Szalai G., Rios-Gonzales K., Veisa O. and Paldi E., 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science*, 164, 301-306.
- Jouve, L., Franck, T., Gaspar, T., Cattivelli, L. and Hausman, J. F., 2000, Poplar acclimation to cold during *in vitro* conservation at low non-freezing temperature: metabolic and proteic changes, *Journal of Plant Physiology*, 157, 117-123.
- Kadioğlu, A., 2011. Bitki Fizyolojisi. KATÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 365, Trabzon
- Kannerworff, W.A. and Van Der Plas, L.H.W., 1994. Respiration of bulb scale fragments of tulip after storage at 5°C . *Plant Sci.*, (104), 31-38.
- Kehrer, J.P., 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43.
- Kim, K.Y., Kwon S.Y., Lee H.S., Hur Y., Bang C.W., Choi K.S. and Kwak S.S., 2000. Differential expression of four sweet potato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethephon. *Phytochemistry*, 54, 19-22
- Kocaçalışkan, İ., 2004. Bitki Fizyolojisi. Kütahya.
- Kratsch, H.A. ve Wise, R.R. (2000). The ultrastructure of chilling stress. *Plant Cell Environ.* 23, 337-350.
- Kuru, H.İ., 2007. Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Heat of Bacteriophage T4. *Nature*, (227), 680-685.
- 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.
- Laloue, H., Weber-Lofti, F., Lucau-Danila, A., ve Guillemat, P., 1997, Identification of ascorbate and guaiacol peroxidase in needle chloroplasts of spruce trees, *Plant Physiol. Biochem.*, 35, 341–346.
- Lambers, H., 1982. Cyanide-resistant respiration: a non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. *Physiologia Plantarum*, 55:478–85.
- Lambers, H., 1997. Oxidation of mitochondrial NADH and the synthesis of ATP. In Dennis, D.T., Turpin, D.H., Lefebvre, D.D., Layzell, D.B. eds, *Plant Metabolism*. Longman Singapore Publishers, Singapore, pp 200-219.
- Larcher, W., 1995, *Environmental Influences on Growth and Development*, in *Physiological Plant Physiology*, Larcher, W. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 277-319 pp.
- Li, J.T., Qiu, Z.B., Zhang, X.W., Wang, L.S., 2010. Exogenous hydrogen peroxide can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, (33), 835-842.
- Liu, Y., Jiang, H., Zhao, Z., An, L., 2011. Abscisic acid is involved in brassinosteroids-induced chilling tolerance in the suspension cultured cells from *Chorispora bungeana*. *Journal of Plant Physiology*, (168), 853-862.

- Lyons, J. M., 1973, Chilling injury in plants, *Annual Review of Plant Physiology*, 24, 445-466.
- M.V., Inzé D. ve Camp, W.V., 1997, Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants, *EMBO J.*, (16), 4806–4816.
- Mahajan, S., Tuteja, Narendra., 2005, Cold, salinity and drought stresses: An overview, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, 139-158.
- Maxwell, D.P., Wang, Y., McIntosh, L., 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (96), 8271-6.
- McCain, T.N. and Hill, R.D., 1977. Cyanide-insensitive respiration in wheat: cultivar differences and effects of temperature, carbon dioxide, and oxygen. *Canadian Journal of Botany*, 55(5): 549-555.
- McClung, C.R., 1997. Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Bio. Med.*, (23), 489-496.
- McCord, J.M. and Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocuprein. *J. Biol. Chem.*, (244), 6049-6055.
- McIntosh, L., Eichler, G., Gray, G., Maxwell, D., Nickels, R., Wang, Y., 1998. Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, (1365), 278-84.
- Meeuse, B.J.D., 1975. Thermogenic respiration in aroids. *Annual Reviews in Plant Physiology*, 26: 117-126
- Meister, A., 1983. Selective Modification of Glutathione Metabolism. *Science.*, (220), 472- 477.
- Michae, O.D., 1989. Characterization of the alternative respiratory pathway in soybean Ph. D. Theses. Iowa State University.ABD.
- Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., Kannt, A., 1998. Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, (27), 329-356.
- 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
- 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.
- Mittler, R., 2002. Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance, *Trends Plant Sci.*, 7, 405-410.
- Mittler, R., 2006, Abiotic stress, the field environment and stress combination, *Trends Plant Sci.*, 11, 15-19.
- Miyake, C. And Asada, K., 1992. Tylakoid Bound Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts and Photoreduction of Its Primary Oxidation Product Monodehydroascorbate Radicals in the Tylakoids. *Plant Cell Physiol.*, (33), 541-553.
- 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.
- Moller, I.M., 2002. A new dawn for plant mitochondrial NAD(P)H Dehydrogenases. *Trends in Plant Science*, 7(6), 232-240.

- Mutlu, S., 2009. Salisilik asidin arpada (*Hordeum vulgare* L.) soğuk toleransını sağlama ve apoplastik ile simplastik proteinler üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Nagy, K.A., Seymour, R.A., Odell, D.K., 1972. Temperature regulation by inflorescence of *Philodendron*. *Science*, 178: 1195-1196
- Nakano, Y., Asada, K., 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.*, (28), 131-40
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J.P., 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol. Plant.*, (129), 185-195.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., 2002a. Hydrogen peroxide and nitric Oxide as signaling molecules in plants. *J Exp Bot* 53, 1237–1242.
- Nishida, I. And Murata, N., 1996, Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The crucial contribution of membrane lipids, *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 47: 541-568.
- Nishiyama, Y., Ikeda, H., Haramaki, N., 1998. Oxidative Stress is Related to Exercise in Tolerance in Patients With Heart Failure. *Am. Heart. J.*, 135, 115.
- Nobuyuki, M., Atsushi, S., Fuminori, K., Shigeo, T., 2008. Mitochondrial alternative pathway is associated with development of freezing tolerance in common wheat. *Journal of Plant Physiology*, (165), 462-467.
- Noctor, G., and Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and Glutathione, Keeping Active Oxygen Under Control, *Ann. Review of Plant Physiol. Plant Mol. Biology*, (49), 249-279.
- Noctor, G., De Paepe, R., Foyer, C.H., 2007. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant Science*, 12: 125–134
- Parsons, H.L., 1998. The role of alternative pathway respiration in plant cells growing under phosphorus limitation: A study using transgenic *Nicotiana Tabacum* cells lacking the alternative oxidase. Master Thesis. University of Toronto.
- Patterson, B. D., Mutton, L., Paul, R. E. and Nguyen, V. Q., 1987, Tomato polendevlopment: stages sensitive to chilling and a natural environment for the selection of resistant genotypes, *Plant Cell and Environment*, 10: 363-368.
- Patykowski, J., and Urbanek, H., 2003. Activity of enzymes related to H₂O₂ generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, (151), 153–161.
- Paul, M.J. and Foyer C.H., 2001, Sink regulation of photosynthesis, *J. Exp. Bot.*, 52, 1383– 1400.
- Pearce, R.S., 1999. Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regul.*, (29), 47 76.
- Plummer, D.T., 1980. Assay methods. in: Plummer (Ed.), D.T., *An Introduction to Practical Biochemistry*. British Library, London, pp. 119-159.
- 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., 1997. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 100: 165–70

- Purvis, A.C., Shewfelt, R.L., 1993. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiologia Plantarum*, 88: 712–718.
- Rajashekar, C. B., 2000, Cold response and Freezing tolerance in plants, in *Plant-Environment Interactions*, Wilkinson, R. E., (ed.), Marcel Dekker Inc., NewYork, 321-341 pp.
- Ranieri, A., Castagna, A., Scebba, F., Careri, M., Zagnoni, I., Predieri, G., Pagliari, M., Sanita`di Toppi, L., 2005. Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. *Plant Physiol. Biochem.*, (43), 45-54.
- Ranieri, A., D'Urso, G., Nali, C., Lorenzini, G., Soldatini, G.F., 1996. Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. *Physiol. Plant.*, (97), 381-87.
- Rasmusson, A.G., Alisdair, R., Fernie and Joost T., van Dongen., 2009. Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? *Physiologia Plantarum*, 137:371-382.
- 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
- Rhoadas, D.M., Subbaiah, C.C., 2007. Mitochondrial retrograde regulation in plants. *Mitochondrion*, 7: 177–194
- Rhoadas, 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
- Roberts, H., Smith, S.C., Marzuki, S., Linnane, A.W., 1980. Evidence that cytochrome b is the antimycin-binding component of the yeast mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Arch Biochem Biophys.*, (200), 387-395.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P., 2000. *In vitro* rooting of *Psoralea corylifolia* Linn: Peroxidase activity as a marker, *Plant Growth Regul.*, 305, 215–219.
- Rymen, B., Fiorani, F., Kartal, F., Vandepoele, K., Inzé, D. ve Beemster, G.T.S. (2007). Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. *Plant Physiol.* 143, 1429-1438.
- 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.
- Saltveit, M.E. ve Morris, L.L. (1990). Overview of chilling injury in horticultural crops. *Chilling Injury of Horticultural Crops*, Eds: C.Y. Wang, ss. 3-15, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Scandalios, G.D., 1994, Regulation and properties of plant catalases. In: Foyer, C.H. Mullineaux, P.M., Editors, *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton FL.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutase. *Plant Physiol.*, (101), 7-12.
- Schonbaum, G.S., Bonnet, W.D.J., Storey, B.T., Bahr, J.T., 1971. Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. *Plant Physiol.*, (47), 124-128.
- Schürmann, P. and Jacquot, J.P., 2000. Plant Thioredoxin Systems Revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (51), 371-400.

- Searle, S.Y., Thomas, S., Griffin, K.L., Horton, T., Kornfeld, A., Yakir, D., Hurry, V., Turnbull, M.H., 2010. Leaf respiration and alternative oxidase in field-grown alpine grasses respond to natural changes in temperature and light. *New Phytol.*, (189), 1027-1039.
- Seymour, R.S., White, C.R., Gibernau, M., 2003. Environmental Biology: Heat reward for insect pollinators. *Nature.*, 426: 243-244.
- Siddiqui M.H., Al-Whaibi M.H., Basalah M.O., 2010. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma*, 248(3):447-55.
- Siedow J.N. and Moore, A.L., 1993. A kinetic model for the regulation of electron transfer through the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, (1142), 165-174.
- Siedow, J.N., Umbach, A.L., Moore, A.L., 1995. The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a coupled binuclear iron center. *FEBS Lett.*, (362), 10-14.
- 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
- Sigel, H., ve Sigel, A., 1999. *Interrelations Between Free Radicals and Metal Ions in Life Processes*, CRC Press, Boca Raton, FL..
- 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
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., Misalski, Z., 2007. The Role of Hydrogen Peroxide in Regulation of Plant Metabolism and Cellular Signalling in Response to Environmental Stresses. *Acta Biochim. Pol.*, (54), 39-50.
- Spiteller, G., 2001. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122, 617-657.
- Stahl, W., Sies, H., 2002. Introduction reactive oxygen species. *Res. Monographs*, 1-2.
- Steponkus, P. L., 1992. Preface, *Advances in Low Temperature Biology*, (1), 9-11.
- Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A.G., Walker, J.E., 2000. The Rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, (10), 672-679.
- Storey, B.T., 1972. The respiratory chain of plant mitochondria XIII. Redox state changes of cytochrome b562 in mung bean seedling mitochondria treated with antimycin A. *Biochim Biophys Acta*, (267), 48-64.
- 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.
- Street, H. E. ve Öpik, H., 1984. *The Physiology of Flowering Plants: Their Growth and Development*, Third Edition, Baltimore.
- Sutka, J. and Galiba, G., 2003, Abiotic Stresses: Cold Stress, *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 1-9.
- Taiz, L. and Zeiger, E., Çeviri; Türkan, I., 2008. *Bitki fizyolojisi*. 236 s., İzmir.
- Tao, D.L., Öquist, G., Wingsle, G., 1998. Active oxygen scavengers during cold acclimation of Scots pine seedlings in relation to freezing tolerance. *Cryobiology* 37, 38-45.

- Thomashow, M.F. 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50, 571-599.
- Umbach, A.L., Lacey, E.P., Richter, S.J., 2009. Temperature-sensitive alternative oxidase protein content and its relationship to floral reflectance in natural *Plantago lanceolata* populations. *New Phytol.*, (181), 662-671.
- 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 Physiol.*, (103), 845-54.
- Van Camp, W., Van Montagu, M., Inze, D., 1994. Superoxide dismutases. In: Foyer, C.H. and Mullineaux, P.M.(eds), *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. CRC Press Inc. Boca Raton., 317-341.
- Vanacker, H., Carver, T.L.W., Foyer, C.H., 1998. Pathogen-Induced Changes in the Antioxidant Status of the Apoplast in Barley Leaves. *Plant Physiol.*, (117), 1103-1114.
- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L., 1997. Alternative oxidase: from gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, (48), 703-34.
- Vanlerberghe, G.C., Cvetkovska, M., Wang, J., 2009. Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? *Physiol Plant.*, 137(4), 392-406.
- 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., Yip, J.Y.H., Parsons, H.L., 1999. In organello and in vivo evidence of the importance of the regulatory sulfhydryl/disulfide system and pyruvate for alternative oxidase activity in tobacco. *Plant Physiol.*, (121), 793-803.
- Vercesi, A.E., 2001. The discovery of an uncoupling mitochondrial protein in plants. *Bioscience Reports*, 21: 195-200.
- Vernieri, P., Lenzi, A., Figaro, M., Tognoni, F., Pardossi, A., 2001. How the roots contribute to the ability of *Phaseolus vulgaris* L. to cope with chilling induced water stress, *J. Exp. Bot.*, (52), 2199-2206.
- Vranová, E., Inzé, D. ve Van Breusegem, F.(2002). Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53, 1227-1236.
- Vranova, E., Van Breusegem, F., Dat, J., Belles-Boix, E. and Inze, D., 2003, The role of active oxygen species in plant signal transduction, in *Plant Signal Transduction*, Scheel, D. and Waternack, C. (eds.), Oxford University Press, Oxford, 45-73 pp.
- Wagner, A.M., Krab, K., 1995. The alternative respiration pathway in plants: Role and regulation. *Physiologia Plantarum*, 95: 318-325.
- Wagner, A.M., Moore, A.L. 1997. Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Biosci Rep.*, (17), 319-333.
- Wang, C. Y., 1990, *Chilling Injury of Horticultural Crops*, Boca Raton, FL: CRC, 313 pp.

- Wang, J., Rajakulendrana, N., Amirsadeghia, S., Vanlerberghea, G.C., 2011. Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature. *Physiologia Plantarum*, (142), 339-351.
- 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.
- 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
- Whetten, R.W., MacKay, J.J., Sederoff, R.R., 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49, 585-609.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Monyagu,
- 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.
- Wilson, D.F., 1967. Azide inhibition of mitochondrial electron transport II. Spectral changes induced by azide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 131(3), 431-440.
- Wise, R.R., 1995. Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynth. Res.*, (45), 79-97.
- Xin, Z., and Browse, J., 2000, Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperature, *Plant, Cell and Environment*, 23, 893-902.
- Yamaguchi, K., Mori, H., Nishimura, M., 1995. A novel isozyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol.* (36), 1157-62.
- Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., Byrne, B., Cecchini, G., Iwata, S., 2003. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, (299), 700-704.
- Yannarelli, G.G., Ferna'ndez-Alvarez, A.J., Santa-Cruz, D.M., Tomaro, M.L., 2007. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stres. *Phytochemistry*, (68), 505-512.
- Yee, Y., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. and Lu, C.Y., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguira gymnorrhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environ. Exp. Bot.*, 1-13.
- Yılmaz, S. and Ozan T. S., 2003. Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişki, *Türk Biyokimya Dergisi*, 28, (4), 252-256.
- Yun, J.G., Hayashi, T., Yazawa, S., Katoh, T. ve Yasuda, Y. (1996). Acute morphological changes of palisade cells of *Saintpaulia* leaves induced by induced by a rapid temperature drop. *J. Plant Res.* 109, 339-342.
- Zhou, D. and Solomos, T., 1998. Effect of hyPODia on sugar accumulation, respiration, activities of amylase and starch phosphorylase, and induction of alternative oxidase and acid invertase during storage of potato tubers (*Solanum tuberosum* cv. Russet Burbank) at 1°C. *Physiologia Plantarum*, 104(2), 255-265.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Iğdır’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Iğdır’da tamamladı. 2005 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2009 yılında mezun oldu. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.

