

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DOMATES BİTKİSİNDE GLİSİN BETAİN
UYGULAMASININ SOĞUK TOLERANSI
İLE İLGİLİ GENLERİN BELİRİMİ
ÜZERİNE ETKİLERİ

Tuğba KARABUDAK

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Melike Bor

Genel Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.01.00

Sunuş Tarihi: 01.07.2011

Bornova- İzmir

2011

Tuğba KARABUDAK tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “Domates bitkisinde glisin betain uygulamasının soğuk toleransı ile ilgili genlerin belirlenimi üzerine etkileri” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 01.07.2011 tarihinde yapılan tezsavunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:**İmza**

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR
Raportör Üye	: Doç. Dr. Yasemin EKMEKÇİ
Üye	: Doç. Dr. Melike BOR

ÖZET**DOMATES BİTKİSİNDE GLİSİN BETAİN UYGULAMASININ
SOĞUK TOLERANSI İLE İLGİLİ GENLERİN BELİRİMİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

KARABUDAK, Tuğba

Yüksek lisans Tezi, biyoloji bölümü

Tez Danışmanı: Doç Dr. Melike Bor

Temmuz 2011, 76 sayfa

Abiyotik streslerden biri olan soğuk stresi bitkiyi fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler bakımdan olumsuz etkiler. Düşük sıcaklıklardan zarar gören bitkilerin yapraklarında fotosentez ve solunum hızı düşer, protein sentezi engellenir, mevcut proteinlerin parçalanma hızı artar, lipid organizasyonu değişir, membran yapısı bozulur ve hücrenin kararlılığı azalır. Bitkiler karşılaştıkları stres ile metabolik olarak yeni bir düzenleme girerler. Bitkilerin strese yanıt olarak sentezlediği bir osmolit olan glisin betain (GB), protein komplekslerinin ve membran yapılarının kararlılığını korumakla görevlidir.

Domates (*Solanum lycopersicum L.*; genel olarak bilinen adı, *Lycopersicon esculentum*) önemli bir tarım bitkisidir. Ilıman iklim koşullarında yetişir ve soğuğa duyarlıdır. Özellikle 15⁰C'nin altındaki sıcaklıklarda soğuk hasarı görülür. Domates GB sentezleyemeyen bir bitkidir. Çalışmamızda, domates yapraklarına GB püskürtülmesiyle soğuk stresine dayanıklılığın artırılması amaçlanmıştır. Soğuğa duyarlı ve dayanıklı iki domates çeşidinin soğuk stresine verdiği morfolojik, fizyolojik ve moleküler yanıtları incelenmiştir.

Çalışmamızda, soğuk stresi ile membran kararlılığının azaldığı MDA ve iletkenlik ölçüm sonuçlarıyla görülmüştür. Dışarıdan GB uygulanan gruptaki bitkilere soğuk stresinin membran yapısına etkisi GB uygulanmamış

soğuğa maruz kalan bitkilere etkisine göre daha az olduğu görülmüştür. Fotosentetik verim sonuçları da, GB uygulamasının soğuk stresine karşı iyileştirici bir etkisi olduğunu gösterir.

Anahtar sözcükler: Domates, glisin betain, soğuk stresi

ABSTRACT

**THE EFFECT OF EXOGENOUS GLYCINE BETAINE
APPLICATION ON TOMATO PLANT UNDER THE EFFECT OF
COLD STRESS**

KARABUDAK, TUĞBA

MSc in Biology Department

Supervisor: Doç Dr. Melike Bor

July 2011, 76 pages

Among the abiotic stresses, cold stress is one of the most important stressors which effect physiological, biochemical and molecular responses of plants. Photosynthesis and respiration rates decrease, protein synthesis is inhibited, protein degradation increases, lipid structure and membrane integrity are effected when plants are subjected to low temperature degrees. Plants response to low temperature degrees by adjusting their metabolic pathways. Some osmoprotectant molecules like glycine betaine (GB) protects membrane integrity and protein structure within the cell membrane.

Tomato (*Solanum lycopersicum L.*; previous systematic name known as *Lycopersicon esculentum*) is an important agricultural plant. It grows under mild temperatures and sensitive to low temperatures and temperature degrees under 15⁰C effects growth adversely. Tomato plant does not synthesize GB which is an important protectant under low temperatures. In this study we applied GB exogenously and investigated the morphological, physiological and molecular responses of two tomato cultivars differing in low temperature tolerance.

Low temperature stress effected membrane integrity in both cultivars as it is seen in lipid peroxidation and membrane leakage values. Exogenous GB application increased low temperature stress tolerance in tomato plants as

compared to that of unapplied groups. Amerolative effects of GB application were more prominent in photosynthetic efficiency results of GB treated plants.

Key words: Cold stress, glycine betaine, tomato

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olduğum günden beri bilime ve hayata daha anlamlı bakmamı sağlayan, öğütleriyle kararlarımı daha kolay vermeme yardımcı olan, hep daha iyisini yapma arzusuyla beni geliştiren, heyecanımı paylaşan, bu yolu yanında yürüyebildiğim değerli hocam DOÇ. DR. MELİKE BOR'a teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca desteğini eksik etmeyen sıkıntımı ve mutluluğumu paylaşabildiğim, engin bilgi birikimiyle bana yol gösteren çok kıymetli hocam PROF. DR. FİLİZ ÖZDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Uzun süren laboratuvar çalışmalarında beni yalnız bırakmayan, çalışmamın daha verimli olması için tüm enerjilerini ortaya koyan, tükenmeyen enerjileri ve destekleri için çok değerli arkadaşlarım ÇAĞDAŞ KERA YÜCEL, LEVENT SOYLU, BAHADIR AYDIN ve SÜLEYMAN İLHAN'a teşekkür ederim.

Hayatımdaki en büyük şansım olan seçimlerimi destekleyen sorunlar karşısında dik durmamı sağlayan annem MUALLA KARABUDAK ve babam ATİLLA KARABUDAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	..v
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Soğuk Stresinin Bitkiler Üzerindeki Çeşitli Etkileri.....	5
1.1.1. Soğuk Stresinin Fotosentez Üzerindeki Etkileri	5
1.1.2. Soğuk Stresinin Hücre Zarına Etkisi.....	8
1.1.3. Lipid Desaturasyonu ve Fad Genleri	12
1.1.4. Lipoksigenaz ve Lox Genleri.....	14
1.2. Soğukun Gen İfadesine Etkisi.....	16
1.3. Soğuk Stresine Alışmada Şekerlerin Görevleri	19
1.4. Uyumlu Bileşikler	20
1.4.1. Prolin.....	20

İÇİNDEKİLER (devamı)

	<u>Sayfa</u>
1.4.2. Poliaminler.....	21
1.4.3. Glisin Betain	21
1.5 Domates Bitkisi (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	25
2. Materyal Metod	27
2.1. Bitki Materyali ve Yetiştirilmesi	27
2.2. Büyüme Parametreleri	28
2.3. Klorofil Flüresans Ölçümleri.....	28
2.4. Yaprak Osmotik Potansiyeli	28
2.5. Bağlı Su İçeriği	28
2.6. Membran Sızıntısının Belirlenmesi	29
2.7. Lipid Peroksidasyonu	29
2.8. Glisin Betain Analizi	29
2.9. FAD ve LOX Genlerinin RT-PCR Analizleri	30
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	31

İÇİNDEKİLER (devamı)

	<u>Sayfa</u>
3.1.1.Kök ve Gövde Uzunluğu.....	31
3.1.2. Kök ve Gövde Yaş Ağırlıkları	34
3.1.3.Kök ve Gövde Kuru Ağırlıkları	38
3.2.Fotosentetik Aktivite.....	42
3.3.Yaprak Osmotik Potansiyeli	45
3.4.Bağıl Su İçeriği (RWC).....	47
3.5. Yaprak Elektriksel Sızıntı Ölçümleri	49
3.6.Lipid Peroksidasyonu	52
3.7.Glisin Betain Miktarı	54
3.8.LOX ve FAD Genlerinin İfadesindeki Değişimlerin Belirlenmesi	55
KAYNAKLAR DİZİNİ	58
ÖZGEÇMİŞ	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1: Bitkilerin maruz kaldıkları biyotik ve abiyotik stresler	2
Şekil 1.2: Üşütücü ve Dondurucu Sıcaklıkların Bitki Üzerine Etkisi	5
Şekil 1.3: Kloroplastlarda ROS oluşumu.....	6
Şekil 1.4: Osmotik dengesizliğin hücre membranı üzerine etkisi	9
Şekil 1.5: Soğuk stresiyle Uyarılan Membran Yapısındaki Bozulma	10
Şekil 1.6 : Lox yolağı	16
Şekil 1.7: GB'nin sentezlenme yolları	22
Şekil 3.1: <i>Gary</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kök uzunluğundaki değişimler (cm)	31
Şekil 3.2: <i>Gary</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda gövde uzunluğundaki değişimler (cm) ...	32
Şekil 3.3: <i>T47657</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kök uzunluğundaki değişimler (cm)	33
Şekil 3.4: <i>T47657</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda gövde uzunluğundaki değişimler (cm)....	33
Şekil 3.5: <i>Gary</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kök yaş ağırlığındaki değişimler (g)	35
Şekil 3.6: <i>Gary</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda gövde yaş ağırlığındaki değişimler (g)	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 3.7: <i>T47657</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kök yaş ağırlığındaki değişimler (g).....	37
Şekil 3.8: <i>T47657</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda gövde yaş ağırlığındaki değişimler (g).....	38
Şekil 3.9: <i>Gary</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kök kuru ağırlığındaki değişimler	39
Şekil 3.10: <i>Gary</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda gövde kuru ağırlığındaki değişimler (g)...	40
Şekil 3.11: <i>T47657</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kök kuru ağırlığındaki	41
Şekil 3.12: <i>T47657</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda gövde kuru ağırlığındaki değişimler (g)...	41
Şekil 3.13: <i>Gary</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda fotosentetik verim değerlerindeki değişim (Fv/Fm)	43
Şekil 3.14: <i>T47567</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda fotosentetik verim değerlerindeki değişim (Fv/Fm)	43

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Sayfa

Şekil 3.15: <i>Gary</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda ozmotik potansiyel değerlerindeki değişim (mmol kg^{-1}).....	45
Şekil 3.16: <i>T47567</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda ozmotik potansiyel değerlerindeki değişim (mmol kg^{-1}).....	47
Şekil 3.17: <i>Gary</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda bağıl su içeriği (RWC) değerlerindeki değişim.....	48
Şekil 3.18: <i>T47567</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda bağıl su içeriği (RWC) değerlerindeki değişim (%).....	49
Şekil 3.19: <i>Gary</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda yaprak elektriksel iletkenlik değerlerindeki değişim (%).....	50
Şekil 3.20: <i>T47567</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda yaprak elektriksel iletkenlik değerlerindeki değişim (%).....	51
Şekil 3.21: <i>Gary</i> domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda lipid peroksidasyonu (MDA miktarı) sonuçları ($\text{mmol g yaş ağırlık}^{-1}$)	52

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

- Şekil 3.22: *T47567* domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda lipid peroksidasyonu (MDA miktarı) sonuçları (nmol g yaş ağırlık⁻¹)..... 53
- Şekil 3.23: *Gary* ve *T47567* domates çeşitlerinde glisin betain (GB) uygulaması yapılan gruplarda soğuk stresi uygulamasının 1. ve 5. günündeki glisin betain miktarları (nmol g yaş ağırlık⁻¹)..... 54
- Şekil 3.24: *Gary* domates çeşidinde soğuk uygulaması ve GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kısa dönemde (0, 2, 6, 12 saat) LOX ve FAD genlerinin ifade değişimlerinin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi 56
- Şekil 3.25: *Gary* domates çeşidinde soğuk uygulaması ve GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda uzun dönemde (1. ve 5. günler) LOX ve FAD genlerinin ifade değişimlerinin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi 56
- Şekil 3.26: *T47657* domates çeşidinde soğuk uygulaması ve GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kısa dönemde (0, 2, 6, 12 saat) LOX ve FAD genlerinin ifade değişimlerinin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi 57
- Şekil 3.27: *T47657* domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması ve GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda uzun dönemde (1. ve 5. günler) LOX ve FAD genlerinin ifade değişimlerinin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi 57

KISALTMALAR DİZİNİ

H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
α -LeA	α -linoleik asit
13- HPOT	(13S)-hydroperoxyoctadecatrienoic asiti
¹ O ₂	Tekli (Singlet) Oksijen
9-HPOT	(9S)-hydroperoxyoctadecatrienoic asiti
BADH	Betain Aldehid Dehidrogenaz
CBF	C- Tekrarlı Bağlama Bölgeleri
CMO	Colin Monooksijenaz
COD	Colin Oksidaz
COR	Soğuk Stresine Cevap Veren Genler
DA	Dienoik Asit
FAD	Yağ Asidi Desaturaz
GB	Glisin Betain
LA	Linoleik Asit
LHC	Işık Toplama Merkezi
LOX	Lipoksijenaz
MDA	Manoldialdehid
O ₂ ⁻	Süperoksit
OH	Hidroksil Radikalleri
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RUBİSCO	Ribuloz-1,5-Bisfosfat Karboksilaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
TA	Trienoik Asit

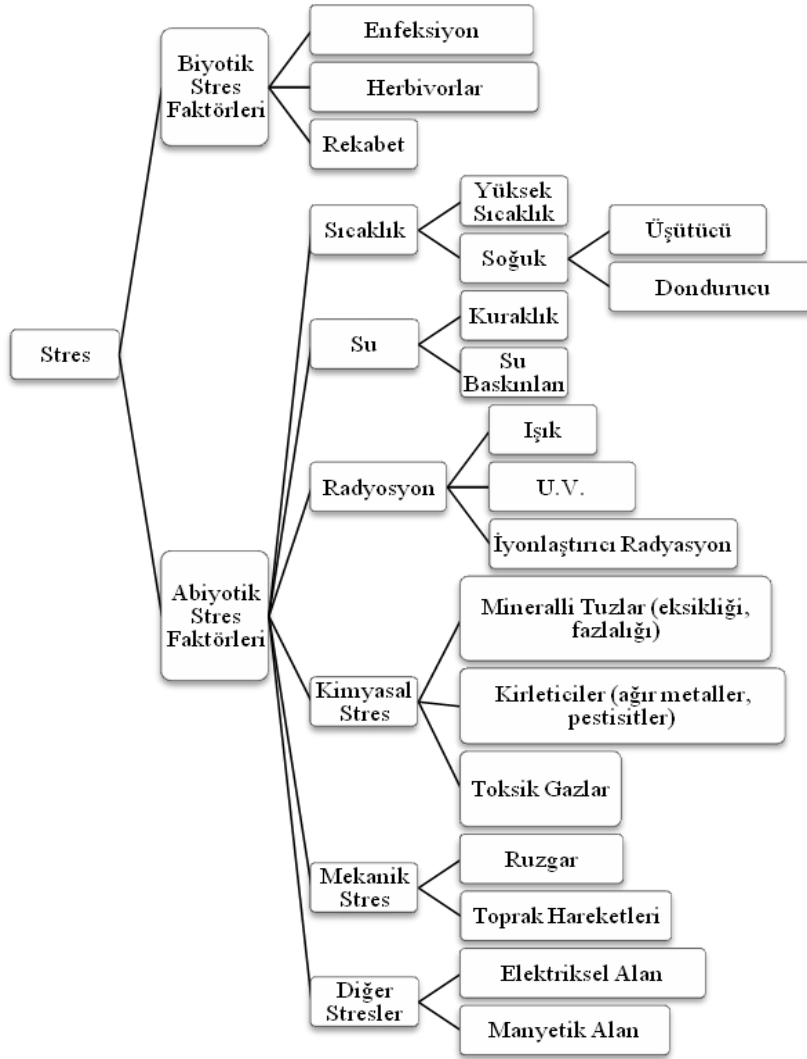
1. GİRİŞ

Bitkiler, yaşadıkları ortamda çeşitli çevresel faktörlerden etkilenmektedirler. Çevresel faktörleri biyotik ve abiyotik faktörler olarak iki grup altında inceleyebiliriz. Biyotik faktörleri, bitkilerin çevresindeki diğer canlılarla olan etkileşimleri şeklinde tanımlayabiliriz. Abiyotik faktörleri ise, bitkilerin yaşadığı ortamdaki sıcaklık değeri, nem değeri, ışık miktarı ve yoğunluğu, su, CO₂, O₂ ve mineral madde miktarı gibi fiziksel ve kimyasal faktörlerin toplamı olarak değerlendirebiliriz. Biyotik ve abiyotik çevresel faktörlerin etki değerleri bitkiden bitkiye farklılık göstermektedir. Bu çevresel faktörlerin herhangi birinin fazla veya eksik olması bitkilerin strese maruz kalmaları anlamına gelmektedir (Schulze et. al., 2005) (Şekil 1.1).

Bitkilerin genotipik yapılarındaki çeşitlilik çevresel streslere verdikleri yanıtlar açısından önemli farklılıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bitkiler sessiz canlılar oldukları için çevresel streslerden diğer canlılara göre daha çok etkilenirler. Bu nedenle bitkiler çevresel streslere karşı çok çeşitli tolerans ve direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir. Sürekli olarak farklı çevresel faktöre maruz kalmaları bitkilerin genetik, fizyolojik ve biyokimyasal olarak dinamik bir yapıya sahip olmalarını tetiklemektedir. Bununla birlikte bitkilerin çevresel strese karşı tolerans gösterme biçimleri çeşitlilik göstermektedir ve daha çok nesiller boyunca kalıtılan genetik yapı ile ilişkilidir (Madhava Rao et. al., 2006).

Abiyotik stresler; kuraklık, tuzluluk, yüksek veya düşük sıcaklık, ışık, besin fazlalığı veya eksikliği, ağır metaller, kirlilik gibi problemlerin tek başlarına veya birlikte oluşturdukları etkiler olarak tanımlanmaktadır. Abiyotik stresler bitkilerin büyümesini, gelişmesini ve verimini, çimlenme döneminden itibaren olumsuz olarak etkilemektedir. Bununla birlikte, bitkiler strese uzun süre veya çok yoğun şekilde maruz kaldıklarında stresten etkilenmeleri daha belirgin biçimde ortaya çıkar. Ayrıca bazı koşullarda, bitkiler için gerekli olan çevresel faktörlerin miktarı ve şiddeti stres etkisi gösterebilir. Örneğin polenlerin dağılımı için gerekli olan rüzgar, transpirasyonu arttırması ve mekanik zarara neden olması sebebiyle bitkiye zarar verebilir. (Schulze et. al., 2005). Abiyotik strese maruz kalan bitkiler

fizyolojik bakımdan çeşitli yanıtlar oluşturur. Bu yanıtların en önemlileri, su alımının azalması, transpirasyon oranının değişmesi, fotosentezin azalması, solunumun değişimi, azot alımında azalma, metabolik toksisite ve gelişimi inhibe eden maddelerin biriktirilmesidir (Madhava Rao et. al., 2006). Bitkilerde, stres etkisi altında gözlenen fizyolojik ve biyokimyasal yanıtların, moleküler düzeyde oluşan değişimler sonucunda ortaya çıktığı son yıllarda yapılan çeşitli araştırmalar tarafından ortaya konulmuştur. Moleküler düzeydeki değişimler, gen ifadesinin düzenlenmesi yoluyla, makromoleküllerin parçalanması, enzim aktivitelerinin değişmesi, protein sentezinin azaltılması, membran sistemlerinin yeniden organize edilmesi şeklinde gerçekleşmektedir (Madhava Rao et. al., 2006).



Şekil 1.1: Bitkilerin maruz kaldıkları biyotik ve abiyotik stresler [Schulze et. al. (2005)'den alınmıştır]

SOĞUK STRESİ ÜZERİNE GENEL BİLGİLER

Bitkilerin yaşam döngüsünde karşılaştıkları önemli abiyotik streslerden biri olan soğuk stresi, bitki gelişimini olumsuz etkilemektedir. Soğuk stresi, bitkilerin farklı derecelerdeki düşük sıcaklık değerlerine maruz kalması nedeniyle metabolik ve fizyolojik süreçlerin etkilenmesi sonucunda ortaya çıkar. 15⁰C'nin altındaki sıcaklıklar birçok tür için stres oluşturan sıcaklıklardır (McKersie and Leshem, 1994). Bitkilerde soğuk stresine neden olan düşük sıcaklık değerlerini şu şekilde sıralayabiliriz:

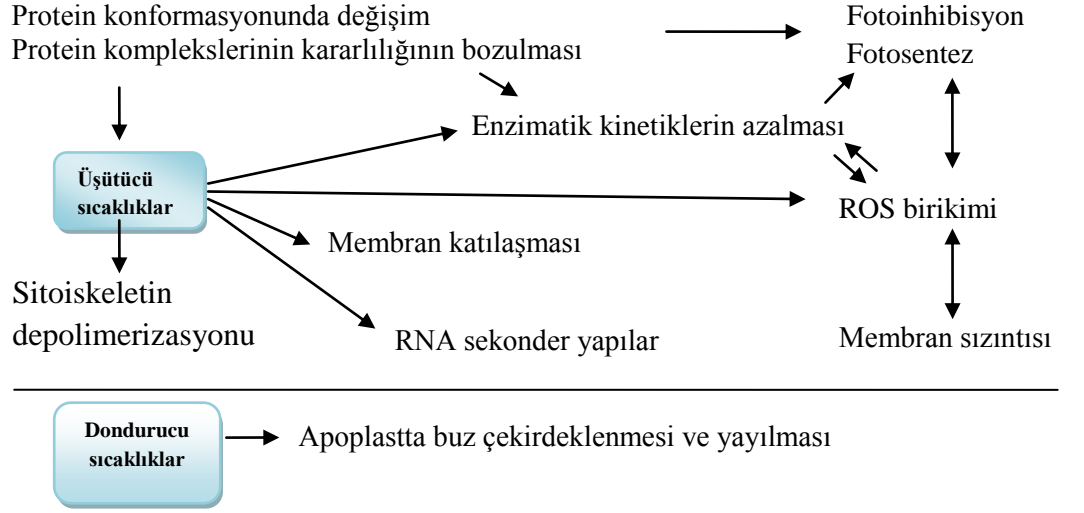
- Düşük sıcaklıklar (10-15⁰C arası sıcaklıklar)
- Üşütücü (Üşüme) sıcaklıklar (0-10⁰C arası sıcaklıklar) (Kodama et al., 1995)
- Dondurucu sıcaklıklar (0⁰C'nin altındaki sıcaklıklar)

Düşük sıcaklıklar membranların yapısını bozarak tüm membran ile ilişki mekanizmaların (iyon kanallarının açılması, membran ilişkili elektron transfer reaksiyonları gibi) aksamasına neden olur. Düşük sıcaklık değerleri zar bütünlüğünün bozulmasına neden olur ve zar yapısında yer alan protein ve lipidler hücre zarından ayrılarak hücre içine girmeye başlar. Bununla birlikte zar yapısında yer alan lipidlerin fiziksel özellikleri, H-ATPaz' ların, diğer taşıyıcıların ve metabolizmanın bağımlı olduğu enzimlerin taşınımını etkiler. Düşük sıcaklıklara duyarlı bitkilerde zar lipidlerinde doymuş yağ oranı yüksektir. Bu zarlar 0⁰C'nin oldukça üzerindeki sıcaklıklarda yarı kristal haldedir. Çift bağ içermeyen doymuş yağ asitleri ve trans-tekli doymuş yağ asitleri içeren lipidler doymamış yağ asidi içeren lipidlere göre daha yüksek sıcaklıklarda katılaşırlar. Düşük sıcaklıklara dirençli bitkilerin zar lipidlerindeki doymamış yağ asidi oranı daha fazladır. Bu şekilde hücre zarı akışkanlığını düşük sıcaklıklarda yitirmez. Düşük sıcaklık, reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine de neden olmaktadır. ROS süpürücü enzimlerin aktiviteleri düşük sıcaklıklarda azaldığı için hücre düzeyinde ROS oluşumu dengelenemez. Soğuk stresi sırasında ROS oluşumu artacağından kloroplast elektron transfer zinciri indirgenir. ROS birikimi özellikle membranları etkiler. Bunun sonucunda da elektron sızıntısı gerçekleşir. Ayrıca,

düşük sıcaklık RNA'daki sekonder yapıların şekillenmesine neden olur (Ruelland et. al., 2009).

Üşütücü sıcaklıklar, metabolik reaksiyonların kinetiğini termodinamik olarak azaltır. Düşük sıcaklığa maruz kalınması termodinamik eşitliğin değişmesiyle bazı globüler (hemoglobün gibi) proteinlerin kararlılığını çözülebilmek özelliklerini etkiler (Siddiqui ve Caviocchioli, 2006). Bu durum protein ve protein komplekslerinin bozulmasına neden olur. Sonuç olarak metabolik düzen bozulur. Üşütücü sıcaklıklarda zarar gören bitkilerin yapraklarında fotosentez azalır, karbohidrat taşınımı yavaşlar, solunum hızı düşer, protein sentezi engellenir ve mevcut proteinlerin parçalanma hızı artar (Ruelland et. al., 2009).

Dondurucu sıcakların en önemli etkisi hücre seviyesinde, hücreler arası boşluklarda ve trakelerdeki suyun donarak buz kristallerinin oluşmasıdır. Ayrıca, hücresel su hücre dışındaki buz kristallerine taşınır, hücre dehidrasyona uğrar ve büzülür (Dowgert ve Steponkus, 1984). Sıcaklık azaldıkça dehidrasyonun derecesi artar ve buz simplasta taşınır (Gusta et. al., 2004), hücre iç yapısının bozulmasına ve dokuların ölmesine neden olur (Şekil 1.2). Dondurucu sıcaklıklara tolerans, dokular arasında farklılık gösterir. Tohumlar ve su kaybetmiş diğer dokular mutlak sıcaklığa kadar canlılıklarını koruyabilirler. Hiç su kaybetmemiş vegetatif hücreler hücre içi organelleri parçalayabilen, büyük ve yavaş büyüyen buz kristallerinin oluşumunu engelleyecek çabuklukta soğutulunca canlılıklarını koruyabilmektedir. Ama doğal koşullarda bu kadar hızlı şekilde soğuma görülmez. Soğuğa alışkın türler dondurucu sıcaklıklar karşısında yaşamlarını devam ettirebilecek yeteneğe sahip olabilirler. Antifriz proteinlerin sentezlenmesi, sakkaroz, rafinoz, fruktanlar sorbitol ve mannitol miktarlarının artması bitkiyi dondurucu sıcaklıklara karşı korur (Taiz and Zeiger 2008).



Şekil 1.2: Üşütücü ve Dondurucu Sıcaklıkların Bitki Hücresi Üzerine Etkisi
[Ruelland et. al. (2009)'dan alınmıştır]

1.1. SOĞUK STRESİNİN BİTKİLER ÜZERİNDEKİ ÇEŞİTLİ ETKİLERİ

1.1.1. Soğuk Stresinin Fotosentez Üzerindeki Etkileri

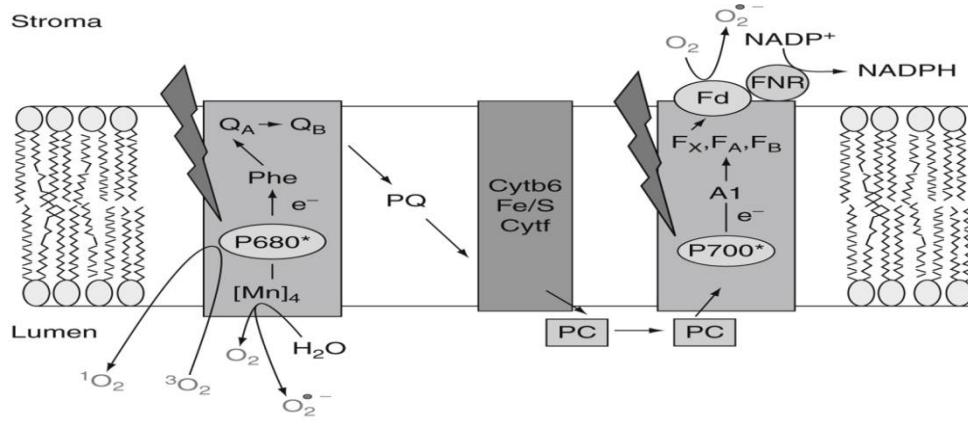
Fotosentez, ışık enerjisini kimyasal potansiyel enerjiye (ATP) ve redoks potansiyel enerjisine (NADPH) kloroplast membranlarında dönüştüren başlıca mekanizmadır. Depolanan kimyasal enerji ilk Calvin döngüsüne girer. Bu döngüde, CO₂, ribuloz-1,5-bisfosfatla reaksiyona girerek gliserat-3-fosfatı oluşturur ve bu sırada ATP ve NADPH kullanılır. Üretilen trioz fosfatların çoğu ribuloz-1,5-bisfosfatın yenilenmesi için kloroplastta tutulur, bir kısmı ise sitosole gönderilerek sukroz sentezinde kullanılır.

Fotosentezin en uygun şekilde gerçekleşmesi için, fotosistem I (PSI) ve fotosistem II'deki (PSII) fotokimyasal reaksiyonlar için absorblanan ışık dengeli, NADP ve ATP'deki enerjinin dönüşümü ve metabolizmadaki yararları çevresel değişime yanıt iyi ayarlanmış olmalıdır. Fotokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan enerji ile bu enerjinin kullanımı arasındaki dengeye fotostasis denir (Ensminger et. al., 2006; Huner et. al.; 1993).

Düşük sıcaklık stresi fotosentezi çeşitli yönlerden etkilemektedir. Sitosolde sakkaroz sentezini inhibe edebilir. Bu durum fosforlanmış ara ürünlerin birikmesine neden olur ve mevcut organik fosfatın eksilmesiyle, sitosol ve

kloroplast arasında inorganik fosfat döngüsünün azalmasıyla sonuçlanır (Furbank et al., 1987; Hurry et al., 1993, 2000). Bu azalma CO₂ fiksasyonu için ribuloz-1,5-bisfosfatın oluşturulmasında gerekli ATP'nin sentezine engel olur. Ayrıca düşük sıcaklık stresi, membran viskozitesinin artmasıyla ve plastokinon difüzyonunun kısıtlanmasıyla tilakoid elektron taşımını inhibe edebilir (Griffth et al., 1984). Tersine, PSI ve PSII tarafından yakalanan ışık enerjisi ve reaksiyon merkezindeki elektron yükleme ve ayrılma işlemlerindeki kontrollerde bu enerjinin kullanılması büyük ölçüde sıcaklıktan bağımsızdır.

Şekil 1.3: Kloroplastlarda ROS oluşumu [Ruelland et. al. (2009)'dan alınmıştır]



Biyokimyasal reaksiyona girebilen klorofil anten kompleksleri daha fazla enerji tutabildiklerinden düşük sıcaklığa maruz kaldıklarında bir dengesizlik oluşabilir (Ensminger et al., 2006; Huner et al., 1993). Bu şartlarda tilakoid membranları aşırı enerji ile yüklenmiş hale gelirler. Aşırı enerji durumunda oluşan hasarın bir sonucu olarak ROS oluşumunda artış gözlenir. Fotosistemlerin klorofil antenlerindeki uyarıcı enerjinin birikmesi reaktif singlet oksijen (¹O₂) oluşumunda O₂ ile etkileşime girebilen uyarılmış triplet klorofil moleküllerin üretilmesine neden olur. Süperoksit suyun oksidasyonu sırasında üretilebilir. Fotosentetik elektron taşıma zincirinin aşırı derecede baskılanması PSI tarafından O₂'nin doğrudan azaltılmasına neden olacaktır. Bu durumda, süperoksit (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikalleri (OH[•]) gibi ROS'ların oluşumu gözlenecektir (Şekil 1.3).

Normal gelişim şartlarında fotosentetik elektron taşıma sistemi tarafından ROS sentezi, aktif bir ROS süpürücü sistem (Cu/Zn- süperoksit dismutaz ve askorbat peroksidaz gibi) ile dengede tutulur. Ama düşük sıcaklıklarda, bu

enzimatik sistemlerin verimliliğinde düşüş gözlenebilir. Bu da, fotoinhibisyona ve lipid peroksidasyonuna neden olur. Süperoksit radikali soğuk stresinde, PSI'de hasar oluşturan temel etmendir. Süperoksit radikali demir-kükürt merkezine saldırır (Sonoike et al., 1996; Tjus et al., 1998). Dondurucu sıcaklıkta ve az ışıktaki PSI fotoinhibisyonu sadece soğuğa duyarlı bitkilerde (salatalık, patates; Sonoike et al., 1996) oluşmaz, arpa, (Tjus et al., 1998), kışlık buğday (Ivanov et al., 1998), ve Arabidopsis (Zhang and Scheller, 2004) gibi soğuk stresine dayanıklı türlerde de belirlenmiştir. Soğuk stresine duyarlı ve dayanıklı türler arasındaki farklılıklardan biri, düşük sıcaklığa karşı ROS'ları uzaklaştıran antioksidant enzimlerin aktivitelerindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır (Tjus et al., 2001). Aktif oksijen PSI'de oluşur ve PSI'in fotoinhibisyonuna neden olur. ROS'lar süpürülmediğinde, uzun ömürlü süperoksit anyonları kendiliğinden gerçekleşen reaksiyonla veya süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesiyle H_2O_2 'ye dönüşür. Oluşan H_2O_2 ve O_2^- molekülleri yayılıp PSII'yi inaktif duruma getirebilir. Buradan anlaşılacağı gibi, H_2O_2 ve O_2^- birlikte PSII'nin hasar görmesine sadece O_2^- ise PSI'in hasar görmesine neden olur (Tjus et al., 2001). Arabidopsis bitkisinin düşük ışık ve don stresine birlikte maruz kalması sonucu PSII'nin maksimum fotokimyasal etkinliği (F_v/F_M) 24 saat sonra $4^{\circ}C$ 'de ~%19 azalmıştır. Ancak $4^{\circ}C$ 'de 24 saat boyunca hiç karanlık yaşamamış bitkilerde PSII aktivitesinde azalma gözlenmemiştir. NADP⁺'nin fotoredüksiyonu olarak hesaplanan PSI aktivitesi ise sadece 8 saatte düşük ışık ve don stresi uygulamasından sonra ~%32 oranında azalmıştır. Oysa düşük ışık stresi uygulanmadığında değişiklik gözlenmemiştir. Düşük ışık ve don stresi Arabidopsis bitkisinde PSII ile karşılaştırıldığında PSI aktivitesini daha fazla etkilediği ortaya konulmuştur (Zhang ve Scheller, 2004).

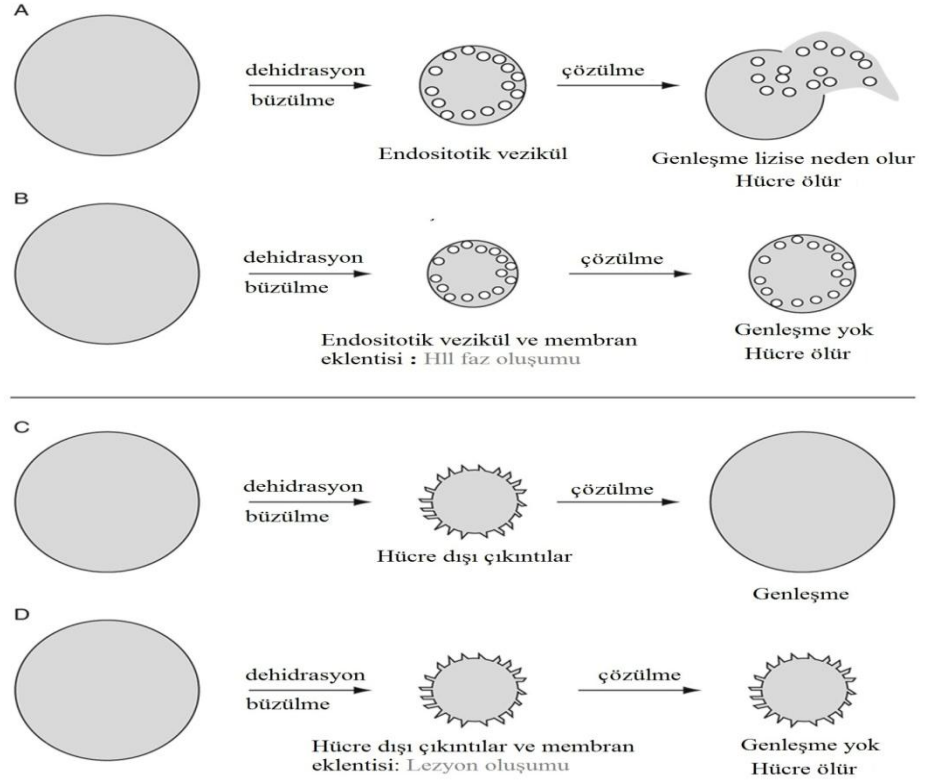
PSII de fotoinhibisyonun temelinde D1 proteinin aktivitesinin kaybolmasıdır. PSII aktivitesini eski haline döndürmek için inaktive olan proteinlerin yerine D1 proteinleri sentezlenmelidir. *in vivo* PSII inhibisyonunun boyutu D1'in inaktivasyonu ve yeni D1 proteini sentezleyip inaktive olan proteinin yerini alma yani tamir süreci arasındaki dengeye bağlıdır. PSII inhibisyonunun tamiri sıcaklığa bağlıdır. Düşük sıcaklıklarda tamir süresi arttığı belirlenmiştir (Gombos et. al., 1994).

Fotoinhibisyonun PSI ve PSII üzerine etkisine ek olarak, ROS oluşumu tilakoid membranların peroksidasyonuna neden olur. Kloroplast membranlarının kendilerine özgü lipid kompozisyonlarından (yüksek miktarda doymamış yağ asidi [18:3] içeren galaktolipitlerin oranı fazla olması) dolayı, bu membranlar oksijenin aktif formları tarafından çok hızlı etkilenebilirler (Havaux and Niyogi, 1999). ROS'un şekillenmesi kloroplastın indirgeyici depolarının büyük bir kısmının bitmesine neden olacaktır. Bu durum, disülfit gruplarının indirgenmesiyle hedef enzimlerinin aktifleşmesi için tioredoksin *f* in indirgenmesini ve kapasitesini olumsuz yönde etkileyecektir (Ruelland and Miginiac-Maslow, 1999). Calvin döngüsünün iki enzimi olan sedoheptulose-1,7-bisfosfat ve fruktoz-1,6-bisfosfatın ışık bağımlı indirgeyici aktivitesi domateste düşük sıcaklıkta aydınlık evreden sonra indirgendiği gözlemiştir (Brüggemann et al., 1994; Hutchison et al., 2000; Sassenrath et al., 1991). Ayrıca son zamanlarda, pirinç ve Arabidopsis ile yapılan proteomik çalışmalar, RcbA, PSII'nin oksijen ilişkili kompleks proteinleri, sedoheptuloz-bisfosfat ve ATP sentaz a ve b zincirleri gibi fotosentetik proteinlerin ışıkla uyarılan degradasyonuna kanıt oluşturur. Bu proteinlerin ve protein komplekslerinin degradasyonu soğukta ROS'un hareketine bağlıdır. Dona duyarlı salatalıkta, ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz (rubisco) aydınlanmış kloroplast lizatlarında veya parçalanmamış yapraklarda üretilen hidroksil radikali (OH) ile bölgeye özel olarak parçalanır (Nakano et al., 2006).

1.1.2. Soğuk Stresinin Hücre Zarı Üzerine Etkisi

Düşük sıcaklık stresi hücre zarı ve hücre zar sistemleri üzerinde belirgin hasarlar oluşturur. Ancak 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda bu hasarlar daha belirgin olarak ortaya çıkmaktadır. Dondurucu sıcaklık stresine maruz kalındığında üretilen ROS, iyon sızıntısı ile sonuçlanan lipid peroksidasyonuna neden olur. Dondurucu sıcaklık stresisiyle membran lezyonlarının yanı sıra apoplastta buz çekirdeklerinin oluşumu da tespit edilmiştir (Ruelland ve ark. 2009). Hücre dışı buz oluşumu hücre zarı apoplastta hareket etmesine neden olur ve bu şekilde su potansiyeli değişir. Su potansiyelinin değişmesiyle hücre dehidrasyona uğrar ve büzülür. Bunun tersi durumunda çözülme, osmotik genişleme ile birlikte olacaktır (Şekil 1.4). Endositotik veziküllerin şekillenmesiyle ilişkili olan buzlanma ve

bunu takiben oluşan osmotik büzülme görülen türlerde genişleme ile uyarılan parçalanma etkilidir. Bu olay plazma membran yüzeyininin küçülmesiyle sonuçlanır.

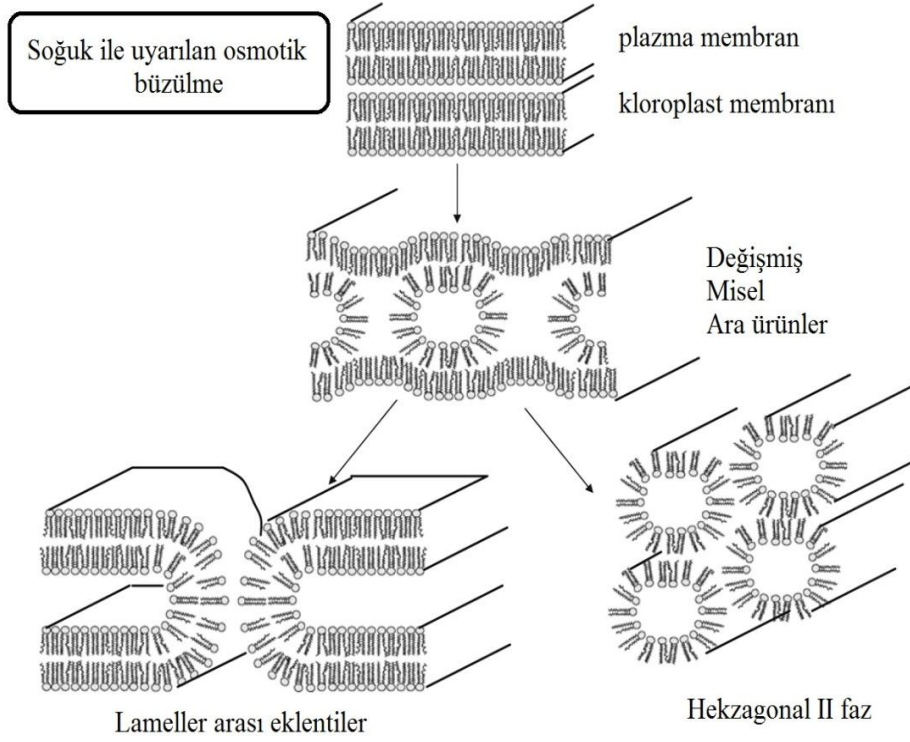


Şekil 1.4: Osmotik dengesizliğin hücre membranı üzerine etkisi [Ruelland et. al.(2009)'dan alınmıştır]

Erime sırasında osmotik genişleme yüzey alanının genişlemesiyle birlikte gerçekleşir. Ama çok geniş alanlar, buzlanma sırasında küçüldüğü zaman bu küçülmenin geri dönüşü yoktur (Şekil 1.4A). Genleşme ile parçalanmanın uyarılma şiddeti türe ve sıcaklığa bağlı olarak değişir. Örneğin soğuğa alıştırmamış protoplastlarda, -2°C ile -4°C kadar soğuk ortamlarda zarlarda meydana gelen parçalanma, çavdar ve yulaf bitkileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis*'te oldukça az orandadır (Uemura ve ark., 1995). Düşük sıcaklık stresi uygulanan, önceden soğuğa alıştırmamış çavdar ve yulaf bitkilerinde, plazma zarları hücre içi daralmaya daha az maruz kaldıkları için genişleme sonucu ortaya çıkan parçalanma daha düşük düzeyde meydana gelir (Şekil 1.4C).

Soğuk stresinde, soğukla uyarılan büzülmenin diğer bir sonucu plazma membranının çeşitli iç membranlara daha yakın hale gelmesidir. Bu durum

özellikle kloroplast membranında görülür. Lipid çift katmanları birleştikleri zaman misel ara ürünler oluşur. Bu ara ürünlerden hekzagonal II fazı, katmanlı olmayan bir fazdır ve her bir silindirin merkezinde su ile silindirik misellere dönüştüren 3 boyutlu bir dizidir. Diğer bir ara ürün ise lameller arası eklentilerdir (Şekil 1.5). Değişmiş misel ara ürünlerin hekzagonal II faza veya lameller arası eklentilere dönüşüp dönüşmeyeceği tabakayı oluşturan katmanların esnekliklerine bağlı olduğu düşünülür. Esnekliği fazla olan katmanlardan oluşan tabaklar hekzagonal II fazını oluştururken, esnekliği az olanlar lameller arası eklentileri oluşturur (Siegel, 1987; Uemura et. al., 1995).



Şekil 1.5: Soğuk stresiyle Uyarılan Membran Yapısındaki Bozulma [Ruelland et. al. (2009)'dan alınmıştır]

Dondurucu sıcaklık stresi ile uyarılan hekzagonal oluşumunun eşik sıcaklığı yulaf için -3°C , çavdar için -6°C 'dir. Yulaf ve çavdarın sırayla -5°C ve -10°C 'ye maruz kalması sonucunda protoplazmanın %50'sinden fazlası etkilendiği için hücre ölümü meydana gelir (Şekil 1.4B). Soğuğa alıştırmış *Arabidopsis*'te ise dondurucu sıcaklık stresi ile uyarılan hekzagonal II oluşumu engellenir ancak lezyonlar oluşur (Uemura et. al., 1995). Bu lezyonlar stres sırasında gerçekleşen

kırılmalardan plazma membranının uzaklaşması için oluşurlar ve lameller arası eklentilerin şekillenmesinden kaynaklanmaktadır.

Membranların kütleli bileşenleri

Soğuk stresi membran kompozisyonundaki değişimleri uyarır. Örneğin, kışlık çavdarın (Uemura and Steponkus, 1997), *Arabidopsis*'in (Hendrickson et al., 2006; Ivanov et al., 2006) kloroplastlarının iç ve dış membranlarında monogalaktosildiaçilgliserolün azalması ve digalaktosildiaçilgliserolün artması soğuk stresine alışmanın bir yanıtıdır. Soğuk stresi, sadece dış membranlarda plastidik fosfatidilkolin miktarında bir azalmaya neden olur (Uemura and Steponkus, 1997). Benzer şekilde kahvede, soğuk stresine alışma sırasında digalaktosildiaçilgliserol artışı görülür (Campos et al., 2003). *Arabidopsis thaliana*'nın soğuk stresine alışması fosfolipitlerdeki artma ve serebrosidlerde ve serbest sterollerde azalma şeklinde gerçekleşir (Uemura and Steponkus, 1995). Soğuğa dayanıklı bir patates türü olan *Solanum commersonii*'nin soğuk stresine alışması plazma membranında fosfolipitlerin artışı ile (özellikle fosfatidiletanolamin'deki artış ile) gerçekleştiği bilinmektedir (Palta et al., 1993). Fosfatidiletanolaminin fosfatidilkoline oranındaki artış yulaf kültürü olan "Ogle" ile çavdar kültürü olan "Puma" da gözlemesine rağmen *Arabidopsis*'te gözlenmemiştir (Uemura and Steponkus, 1994; Uemura et al., 1995).

Plazma membranında ve kloroplast membranında meydana gelen bu değişimler soğuk stresi ile uyarılan membran hasarlarından korunmada önemlidir. Kloroplast membranında bulunan lipitlerinde hegzagonal II fazın şekillenmesini digalaktosildiaçilgliserol ve fosfatidilkoline göre monogalaktosildiaçilgliserol daha fazla etkiler. Digalaktosildiaçilgliserol ve fosfatidilkolin çift katmanlı yapıyı korurlar (Uemura and Steponkus, 1997). Soğuk stresine alışmadan sonra, soğuk ile uyarılan hegzagonal II faz oluşumu meydana gelmediği ve bazı bitkilerde lezyon gözlenmiştir. Daha önceden de açıklandığı gibi, hegzagonal II faz oluşumu ve plazma membranları ve kloroplast membranları arasında değişmiş misel ara ürünlerin şekillenmesiyle ilişkilidir. Çavdarın soğuk stresine alışması sırasında plazma membranında fosfolipid miktarının artması, cerebrosidlerin ve serbest sterollerin azalması, tekli tabakaların esnekliğinin azalmasıyla membran yüzeyinde tutulan suyun armasını sağlar. Ayrıca çavdarın kloroplast membranında

monogalaktosildiaçilgliserol oranındaki azalma ve digalaktosildiaçilgliserol oranındaki artma membranların hidrasyonunda artışa ve tekli tabakaların esnekliğinin azalmasını sağlar.

1.1.3. Lipid desaturasyonu ve FAD genleri

Arabidopsis'te çeşitli fosfolipidlerin oranı soğuğa uyum sırasında az miktarda değişir ancak fosfolipidlerin kompozisyonunda belirgin farklar vardır. Bitki 2⁰C'de 1 hafta tutulduktan sonra, ikili doymamış yağ asitlerinin (18:1/18:3, 18:2/18:2, 18:2/18:3 gibi) oranı hem fosfatidilkolinde (%36.9'dan %42.8'e) hem de fosfatidiletanolaminde (%28.6'dan %34.9'a) artar. Tekli doymamış yağ asitlerinin (18:0/18:3, 16:0/18:3 gibi) oranı ise fosfatidilkolinde (%60.8'den %54.8'e) ve fosfatidiletanolaminde (%67.6'dan %61.4'e) azalır (Uemura et al., 1995). Doymamış yağ asitlerindeki artış soğukun genel bir etkisidir ve *Morus bombycis* Koidz. (dut) bitkisinin ve bir CAM bitkisi olan *Kalanchoë daigrmontiana*'nin plazma membranında, *Arabidopsis* ve bezelyede ise mitokondri membranında bu değişim gözlenmiştir (Behzadipour et al., 1998; Davy de Virville et al., 2002; Matos et al., 2007; Yoshida et al., 1984).

Doymamış yağ asitlerinin miktarı soğuğa verilen önemli bir yanıttır. Mikozomal 18:1 desaturazın aktivitesi eksik *Arabidopsis* fad2 mutantları çoklu doymamış yağ asitlerini az miktarda içermektedir. 22⁰C'de tutulan fad2.2 mutantında yapılan bir çalışmada; fosfatidilkolinde 18:2 yağ asidinin %2 oranında bulunduğu, 18:3 yağ asidinin ise %14 oranında bulunduğu tespit edilmiştir. Yabani tip bitkide ise bu oranlar sırasıyla %33 ve 40'tır. fad2.2 mutanı 6⁰C'ye maruz bırakıldığında bitkinin öldüğü gözlenmiştir (Miquel et al., 1993). Soğuğa alışkın *Solanum commersonii* plazma membranından ekstrakte edilen polar lipitlerin 16:0/18:2 oranında bir artış gözlenmiştir. Böyle bir durum soğuğa alıştırılmamış *Solanum tuberosum* bitkisinde gözlenmemiştir (Palta et al., 1993). Kanolada yapılan bir çalışmada, endoplazmik retikulum lipidlerinde 18:3 yağ asitleri soğuğa duyarlı çeşitler ile karşılaştırıldığında, dayanıklılarda çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Tasseva et al., 2004).

Soğuk denemesi sırasında doymamış yağ asitlerinin diğer bir görevi, donma/erime döngüsünde genişleme ile uyarılan lizisin gerçekleşmesini önler. Fosfatidilkolinin doymamış türevlerinin oranının artması genişleme ile uyarılan

lizinin oluşma ihtimalini azaltır (Uemura and Steponkus, 1989). Doymamış yağ asitlerinin görevi kloroplastı korumaya yöneliktir. Kloroplast *omega-3* desaturaz olan FAD8 geninin transkript temel düzeyi düşük sıcaklıkta büyüyen *Arabidopsis*'te önemli ölçüde yüksektir (Gibson et al., 1994). Dondurucu sıcaklık stresi, kloroplast membranlarında sıvı fazdan jel fazına dönüşümü uyarır. Kloroplast membranlarında bulunan trienoik asit bu jel fazının şekillenmesini önler (Roughan et al., 1985). Tillakoid membran yapısında bulunan trienoik yağ asitleri, düşük sıcaklıklarda *Arabidopsis*'de fotoinhibisyonunun iyileşmesi için gereklidir. Hasarlı D1 proteinlerinin onarılma düzeyi, tillakoid membranların yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin miktarı azaldıkça azalır (Vijayan and Browse, 2002).

Membran lipid desaturasyonunun, kloroplast fonksiyonlarının korunmasında, polen gelişiminde, soğuk stresine toleransta ve jasmonik asit üretimi gibi çeşitli biyolojik ve fizyolojik aktivitelerle ilişkili olduğu bilinmektedir (Gibson et al. 1994, Kodama et al. 1995, McConn and Browse 1996, Routaboul et al. 2000). Membran lipidleri dienoik yağ asitleri (DA) ve trienoik yağ asitlerden (TA) oluşur. Toplam yaprak lipidlerinin yaklaşık %70'ini, kök gibi fotosentetik olmayan dokulardaki yağların ise %55-70'ni DA'lar ve TA'lar oluşturur (Harwood 1980). TA/DA oranı çevresel şartlarda uyum sağlamak için değişir. Düşük sıcaklıklara yanıt olarak TA seviyesinde azalış yüksek sıcaklığa yanıtta ise TA seviyesinde artış gözlenir (Smolen' ska Kuiper, 1977; Willemot et. al., 1977; Horiguchi et. al., 1996). DA'lar, endoplazmik retikulumda ve plastidlerde ω -3 yağ asidi desaturaz (FAD) enzimiyle TA'ları oluşturur (Ohlrogge ve Browse, 1995). *Arabidopsis*'te, FAD3, ER'da bulunan ω -3 yağ asidi desaturazı kodlar. FAD7 ve FAD8, FAD3'ün izoenzimidir ve kloroplastta bulunur (Iba v.d., 1993; Gibson v.d., 1994). Bu enzimlerin ifadeleri transkripsiyonel ve/veya translasyon sonrası düzenlenir (Vrinten et. al.,2005; Collados et. al., 2006).

Yapılan bir çalışmada, 25⁰C'de normal büyüme şartlarındaki fad3-2 fad7-2 fad8 üçlü mutantının fotosentetik parametreleri yabani tip ile karşılaştırıldığında önemli bir fark gözlenmemiştir (McConn M ve Browse J., 1996). 2000 yılında yapılan başka bir çalışmada ise 25⁰C'den daha düşük sıcaklıklarda trienoik yağ asitlerinin fotosentez için gerekli olduğu gösterilmiştir (Routaboul J. et. al.,

2000). 22⁰C’de büyütülen bitkiden koparılan yapraklara 2-5⁰C soğuk stresi uygulanmıştır ve sonuçta yabancı tipe göre üçlü mutantta sabit elektron taşınımının kuantum veriminin (Φ II) daha fazla inhibe edildiği görülmüştür. Bu inhibisyon sadece soğuk ortamda yapılan ölçümde görülmüştür. Ölçüm oda sıcaklığında yapıldığında, çok hızlı olarak kontrol değerlerine ulaştığı görülmüştür. PSII elektron taşınımının maksimum kuantum verimliliği (Fv/Fm) ise kısa süreli soğuk denemelerinde yabancı tip bitkileri ile üçlü mutantında benzerdir. Soğuk stresinin (4⁰C’de) 5. gününde üçlü mutant bitkilerinde Fv/Fm değerlerinde azalma görülmüştür (Routaboul J. et. al., 2000). Bu sonuçlar, trinoik yağ asitlerinin fotosentezi koruyarak soğuk koşullara tolerans sağladığını gösterir.

1.1.4. Lipoksigenaz ve LOX genleri

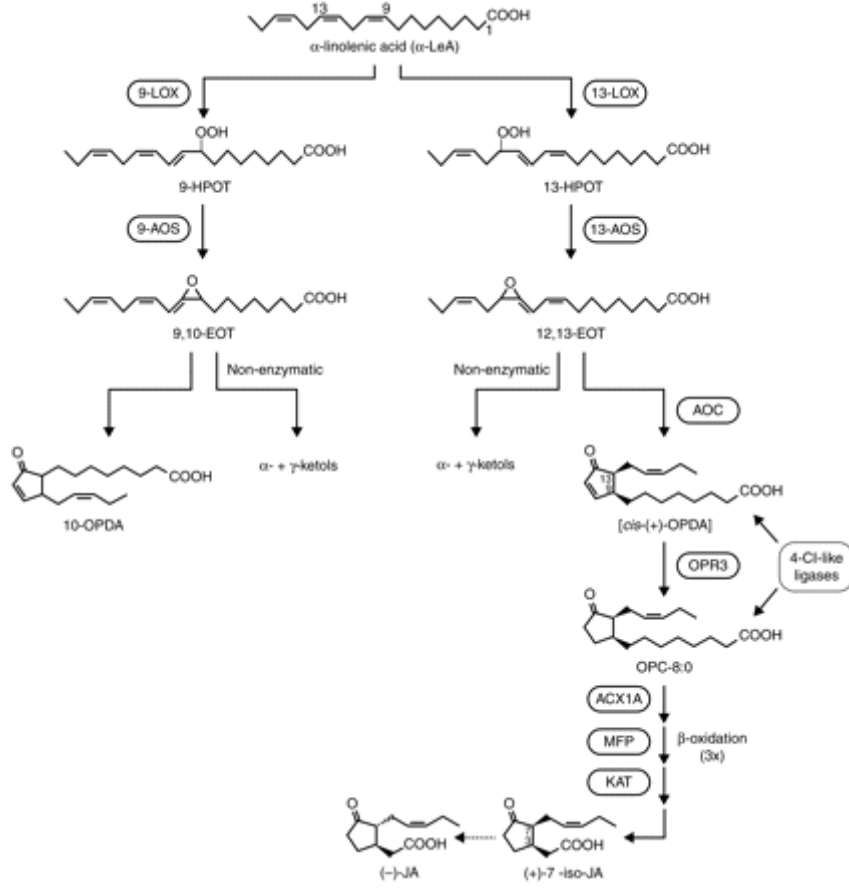
Lipoksigenaz (LOX) enzimleri, oksijenin zarlardan özel olarak geçebilmesi için membran lipidleri ile ilgili reaksiyonları katalizler. Membran lipidleri linoleik asit (18:2 LA) veya α -linoleik asit (18:3 α -LeA) içerir. Oksijen α -LeA’yı substrat olarak kullanarak C-9 (9-LOX) ya da C-13 (13-LOX) yolaklarında (9S)-hydroperoxyoctadecatrienoic asiti (9-HPOT) ya da (13S)-hydroperoxyoctadecatrienoic asiti (13-HPOT) oluşturur (Şekil 1.6). LOXlar hem grubu içermeyen demir içeren deoksigenazların büyük bir gen ailesini oluşturur. Monomeriktirler. Konumsal özelliğe (9-LOX, 13-LOX) göre bitki LOXlarının sınıflandırılmasının yanında, primer yapıları tarafından da gruplandırılabilirler. LOXlar bir transit peptitleri eksiktir ve yüksek sekans benzerliği gösterenler (>%75) tip-1 LOX olarak gruplandırılır. Oysa kabul edilen bir kloroplast transit peptid sekansı ile LOXlar ve tüm sekansın düşük benzerliği, tip-2 LOX olarak sınıflandırılır. Şimdiye kadar tanımlanmış tüm tip-2 LOXlar, 13-LOX yolağını kullanırlar. LOX’un reaksiyon mekanizmasıyla ilgili olarak, aktif alandaki boşluk ve substratın uyumu konumsal özellik için önemli bir faktör olarak tanımlanmıştır (Feussner & Wasternack, 2002).

LOX proteinlerinin moleküler kütlesi hayvanlarda 75-80 kDa, bitkilerde ise 94-105 kDa kadardır. Moleküler kütlelerindeki farklılığa rağmen soya (*Glycine max L. Merr.*), tavşan (*Oryctolagus cuniculus*) ve mercanlarda *Plexaura homomalla* (Gillmor et al., 1997; Minor et al., 1996; Oldham et al., 2005), yapılan

çalışmalar sonucunda LOX'ların yapısal olduğu görülmüştür. Bitki ve hayvanlarda bulunan LOX enzimleri küçük bir N-terminal domain ve temel bir C-terminal domain içerir. N-terminal domain biyolojik membranlar ile etkileşimi sağlar. C-terminal domain ise demir koordinasyonu için önemli olan amino asit içerirler.

Hayvanlarda LOX yolağı, fizyolojik bakımdan aktif löktrienler ve lipoksinlerin üretilmesinden sorumludur. Memelilerde ise LOXların görevi tam olarak anlaşılamamıştır (Funk, 1996; Yamamoto et al., 1997; Brash, 1999). Yüksek bitkilerde LOX yolağı oldukça karmaşıktır. LOX'lar savunma (Porta et al., 1999; González-Aquilar et al., 2004; Prost et al., 2005; Nemchenko et al., 2006; Mita et al., 2007), sinyal taşınımı (Blokhina et al., 2003; Kourtchenko et al., 2007), bitkinin büyümesi ve gelişmesi (Hildebrand et al., 2000; Kolomiets et al., 2001; Santino et al., 2003; Vellosillo et al., 2007) ve meyve olgunlaşması (Zhang et al., 2006) gibi süreçlerde önemli rol oynar. LOX ürünlerinin temel görevi patojen saldırısına ve yaralanmaya (Croft et al., 1993; Fournier et al., 1993; Vick, 1993; Creelman and Mullet, 1995; Blée, 1998; Weber et al., 1999) ve senesese (Siedow, 1991; Paliyath and Droillard, 1992; Page et al., 2001; Leverentz et al., 2002) karşı bitkiyi korumadır.

Domateste LOX gen ailesi en az beş izoform içerir. Bunlar, *TomloxA*, *TomloxB*, *TomloxC*, *TomloxD*, *TomloxE* olarak isimlendirilir fizyolojik olarak birbirlerinden farklıdır. (Chen et al., 2004; Liavonchanka and Feussner, 2006). Kloroplast ile etkileşime giren 2 LOX geninden biri olan *TomloxC*, plastitlerin içinde veya dışında bulunabilir. Olgunlaşma başlangıcına kadar tespit edilemez. C6 aldehid ve alkol içeren aroma uçucuların üretiminden sorumludur (Chen et al., 2004; Griffiths et al., 1999; Heitz et al., 1997). Diğer *tomolox* izoformları 9-HPO'ların üretiminden sorumludur. *TomoloxD* kloroplast ile etkileşimde olan diğer bir izoformdur. Plastid membranının içinde veya plastidin içinde bulunur (Arimura et al., 2009). Bu izoform kontrol şartlarında domates meyvesinde çok az miktarda ifade edilir. Ama yaralanmaya yanıtta ifadesi artar (Heitz et al., 1997). *TomoloxB* ifadesi olgunlaşmış yeşil meyvede bulunur. Etilen ile etkisi artar (Ferrie et al., 1994; Griffiths et al., 1999). *TomoloxA* domates meyvesinin olgunlaşması sırasında ifadesi giderek azalır (Griffiths et al., 1999). *TomloxE* transkriptleri meyve olgunlaşması sırasında ifade edilir (Chen et al., 2004).



Şekil 1.6. Lox yolağı (Porta ve ark., 1999)

1.2. SOĞUĞUN GEN İFADESİNE ETKİSİ

Bitkiler karşılaştıkları düşük sıcaklık stresi ile alışma (aklimasyon) denilen bir süreç sayesinde baş edebilirler. Bitkilerin soğuğa olan toleransı aklimasyon oluşturma hızına bağlıdır. Aklimasyonun anlaşılmasında iki önemli tanımın yapılması gerekmektedir. Deaklimasyon, dayanıklılık düzeyindeki azalıştır. Soğuk stresi bittiği zaman bitkinin normal şartlardaki metabolik sürecine geri dönmesidir. Reaklimasyon ise; kaybedilen alışmanın soğuk ile karşılaşıldığında yeniden kazanılmasıdır. Aklimasyon haftalar-aylar kadar uzun sürerken, deaklimasyon günler-haftalar kadar kısa sürer. Soğuğa alışkın *Solanum commersonii* 20⁰C’de tutulduğunda 2-3 saat içinde deaklimasyon süreci başladığı ve 1 günde bu sürecin tamamlandığı tespit edilmiş, alışmanın sağlanması için bitki 15 gün boyunca 2⁰C’de tutulmuştur (Chen ve Li; 1980). Ama soğuğa alışkın bir

bitki stres bitmesinden sonra yeniden soğuk ile karşılaştığında reaktifasyon çok daha hızlı gerçekleşir.

Hücre membranları akışkan yapıdadır. Düşük sıcaklıklar membranların akışkanlıklarını azalır, katılığını artır. Alfalfa ve *Brassica napus*'ta yapılan çalışmalarda, plazma membranının katılmasında öncelikli olarak COR (soğuga cevap) genlerinin uyarıldığı gösterilmiştir (Orvar, B.L. et al. 2000; Sangwan, V. et al. 2001). Oleat desaturazı eksik *Arabidopsis fad2* mutantları, yabancı tip (14°C) ve linoleat desaturase geni aşırı ifade olan transgenik *Arabidopsis* (12°C) ile karşılaştırıldığında daha yüksek sıcaklıklarda (18°C) diasilgliserol kinazın aktivasyonunun ve membran katılmasının arttığını gösterir (Vaultier, M.N. et al. 2006). Bu sonuçlar, bitki hücrelerinin, membran katılmasından etkilendiklerinden dolayı soğuk stresine duyarlı olduğu görüşünü desteklemektedir.

Soğuga uyum bitki transkriptomunda büyük bir değişimi uyarır. *Arabidopsis*'te genomun %20 oluşturan soğukla ifade olan genlerin (Hannah, M.A. et al. 2005) yaklaşık %4'ünün transkripsiyonel olarak düzenlendiği ortaya çıkmıştır (Lee, B-H. et al. 2005). COR genlerinin promotorlarındaki cis elementine bağlanabilen ve ifadesini aktifleştiren CBF'ler (DREB1'ler olarak bilinen C-tekrarlı bağlama bölgeleri) transkripsiyon faktörlerinden *apetala2/etilene* yanıt veren faktör ailesinin ifadesi soğuk stresi ile uyarır. Transgenik bitkilerdeki analizler, orta sıcaklıkta soğuga alışmanın uyarıldığını ve COR genlerinin ifadesini aktifleştirmek için CBF'lerin ektopik ifadesinin yeterli olduğunu göstermiştir (Stockinger, E.J. et al. 1997; Liu, Q. et al. 1998). CBF'ler fosfoinositol metabolizmasında, transkripsiyon, osmolit biyosentezinde, ROS detoksifikasyonunda, membran taşınımında, hormon metabolizmasında bilinen veya tahmin edilen hücre koruma fonksiyonlarında genlerin ifadesini düzenler (Lee, B-H. et al. 2005; Fowler, S. and Thomashow, M.F. 2002; Maruyama, K. et al. 2004).

Arabidopsis'te bir MYC-tip sarmal yapı transkripsiyon faktörü olan ICE1 (inducer of CBF expression1) CBF3 promotorunda MYC tanıma elementlerine bağlanabilir ve soğuga alışmada CBF3'ün ifadesi için önemlidir. *ice1* mutantları

CBF3 geni eksiktir ve don stresine karşı çok hassas ve soğuga alışmazlar. ICE1'in aşırı ifadesinin oluşturulması soğuga alışma sırasında CBF3, CBF2 ve COR genlerinin ifadesini arttırır ve transgenik Arabidopsis'in buza toleransı artar. ICE1 nukleusta bulunan ve nukleusta ifade olan bir gendir. Ama sadece soğuk stresinde CBF'lerin ifadesini uyarır (Chinnusamy, V. et al. 2003).

Yapılan birçok çalışmada transkripsiyon sonrası düzenlemenin soğuk stresinde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. Soğuk stresine maruz kalan buğdayda iki COR geninin (ribokinaz ve C3H2C3 RING-finger protein) mRNA'larında intron tutma ile düzenlendiği gösterilmiştir (Mastrangelo, A.M. et al. 2005). $P_{RD29A}::LUC$ genetik tarama kullanarak, Lee et. al (2006), STABILIZED1 (STA1) bir öncül-mRNA splays faktörünü tanımlamışlardır. Bu faktör Arabidopsis'te soğuk toleransı için önemli özelliği olan öncül-mRNA splays düzenleyicisidir. Soğuk stresi STA1'in ifadesini arttırır. *stal* mutanti soğukla uyarılan öncül-mRNA'nın splaysı bakımından hasarıdır. Bu mutant dona, ABA'ya ve tuza çok duyarlıdır. Bu sonuçlar tam fonksiyonel STA1'in splays için ve özel transkriptlerin yıkılmasında gerekli olduğunu gösterir. Soğuk stresinde bu faktörlerin artması istenir (Lee, B.H. et al. 2006). Serin/arginin bakımından zengin olan proteinler (SR) spleozomların bir parçasıdır ve ökaryotlarda splay düzenleyici olarak davranırlar. Yüksek ve düşük sıcaklığa maruz kalan *Arabidopsis*'te bazı SR genleri öncül-mRNA'lerin alternatif splaysını düzenler (Palusa, S.G. et al. 2007).

Abiyotik stresle indüklenen siRNA ve miRNA strese yanıtın belirleyicilerini veya negatif düzenleyicileri kodlayabilen hedef genlerin ifadesini azaltabilir. Oysa bu miRNA ve siRNA'ların ifadesinin azalması stres toleransının belirleyicileri veya pozitif düzenleyicileri kodlayabildiği hedef mRNA'larının birikmesiyle sonuçlanır (Sunkar, R. et al. 2007). Mikroarray analizler, transkripsiyon faktörlerini kodlayan soğukla ifadesi artan genlerin yaklaşık %17'si olduğunu göstermiştir. Oysa soğukla ifadesi azalan genlerin sadece %7'si transkripsiyon düzenleyicilerini kodlar (Lee, B-H. et al. 2005). Bu yüzden transkripsiyon sonrası düzenleme soğuga alışma boyunca genlerin ifadesinin azaldığı temel bir nokta görevi gördüğü düşünülebilir. Çünkü miRNA'lar stressiz koşullar altında çeşitli gelişim süreçlerini düzenlerler (Jones-Rhoades, M.W. et al. 2006). Soğuk stresi

altında bitkiler büyüme ve gelişimlerini düzenlemek için aynı miRNA'ları kullanabilmesi mümkündür.

Sumolasyon, SUMO E3 ligaza bağımlı, protein substratlarının SUMO proteinlerine bağlanmasıyla gerçekleşen translasyon sonrası protein modifikasyonudur. Proteinlerin sumolasyon/desumolasyon oranı, ABA ve salisilik asit sinyalinde ve abiyotik ve biyotik strese bitkilerdeki yanıtında çok önemli bir göreve sahip olduğu görülür (Miura, K. et al. 2007).

1.3. SOĞUK STRESİNE UYUMDA ŞEKERLERİN GÖREVİ

Soğuk stresine toleransın sağlanmasında şeker birikiminin önemli görevi olduğu rapor edilmiştir (Levitt, 1980; Siminovitch, 1981). Bir çok çalışmada Arabidopsis yapraklarında soğuk stresine alışma sürecinde şeker düzeyinin arttığı tespit edilmiştir (Kaplan et al., 2004; Klotke et al., 2004; Rohde et al., 2004; Strand et al., 1997, 1999, 2003; Takagi et al., 2003). Sukroz ve rafinoz gibi eriyebilen şekerlerde ki artışın soğuğa alışma sırasında kritik olduğu belirlenmiştir (Koster and Lynch, 1992). Soğuk stresine yanıtta şeker miktarının artması ilgili genlerin ifade olup şeker sentezlenmesinin gerçekleşmesinin yanında nişasta parçalanmasıyla da ilişkilidir. Soğuk stresine maruz kaldıktan sonra miktarlarında artış gözlenen maltoz ve maltotrioz gibi şekerler β -amilaz aktivitesi ile nişastanın parçalanmasıyla oluşan ürünlerdir (Kaplan et al., 2007).

Osmolitlerin birikmesi düşük sıcaklığa karşı verilen önemli bir yanıttır. Soğuk stresine alışma sürecinde osmolitlerin nasıl hareket ettiklerini anlamak için farklı mekanizmalar önerilmiştir. Bunlardan biri, hücre içinde osmolitlerin osmotik ayarlamayı sağladıkları görüşüdür. Karbohidratlar ve diğer çözünen maddelerin birikimi hücrenin osmotik potansiyelini değiştirir. Bu şekilde, apoplastik alandaki buz oluşumu ile hücre içindeki solusyonun arasındaki su potansiyel farkı azalır. Şeker miktarındaki artış suyun donma sıcaklığını düşüreceği için soğuk ile karşılaşan bitkideki buz oluşumu daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşir.

Soğuk stresine alışma sırasında eriyiklerin diğer bir rolü, buzun çözülmesi sırasında plazma membranının korunmasıdır. Tüm hücreler çok hızlı buz tutmayan su içerirler. Buz tutmayan suyun oranı kuru ağırlığın %20-40

arasındadır. Membran ile ilişkili su, çift katlı lipit tabakasının korunmasında gerekli olan hidrofilik bir alan oluşumunu sağlar. Buz ile uyarılan dehidrasyon sırasında, indirgenmeyen şekerler kaybedilen suyun yerine geçerler. Bu şekilde bitki su kaybından fazla etkilenmez.

Soğuk stresine alışma sırasında eriyiklerin diğer bir koruyucu etki mekanizması, buz şartlarında buz yerine “cam” oluşturma yeteneğidir. “Cam” bir katının viskozitesine sahip bir sıvıdır. Yani sıvı halde bulunurlar ama bir katı kadar viskoz yapıdadırlar. Bu yapı sayesinde bitkiler soğuk stresine dayanıklı hale gelirler.

1.4. OSMOTİK DÜZENLEYİCİLER

Eriyebilen şekerlere ek olarak uyumlu bileşikler amino asit, poliaminler ve betaini kapsayan moleküllerin heterojen bir grubudur. Uyumlu bileşikler düşük moleküler ağırlığa sahip organik moleküllerdir. Kuruma, osmotik stres veya düşük sıcaklık gibi streslere yanıt olarak üretilirler. Fizyolojik olarak uyumlu bileşiklerin yüksek seviyelerde birikmeleri metabolizmayı olumsuz olarak etkilemez. Ama stres karşısındaki görevleri tam olarak açıklanamamıştır. Uyumlu bileşikler de tıpkı şekerler gibi, osmotik potansiyeli artırarak ve hücre dehidrasyonunun artmasını önleyerek strese karşı bitkiyi korurlar. Proteinlerin ve membranların kararlılığını artırır (Korn et al., 2008).

1.4.1. Prolin

Prolin soğuk stresi ile karşılaşan bitkide kısa sürede bol miktarda sentezlenebilen bir uyumlu bileşiktir. Dondurucu sıcaklıklardaki prolinin etkisi tam olarak anlaşılammıştır. Yapılan çalışmalar, proteinleri denaturasyondan koruduğunu (Nikolopoulos and Manetas, 1991), protein sentezleme mekanizmasının kararlı olmasını (Kadpel and Rao, 1985), sitosolik asiditeyi düzenlediğini (Venekamp, 1989), su bağlama kapasitesinin artmasını sağladığını (Schobert and Tschesche, 1978) ve karbon ve azot kaynağı olarak kullanılabildiğini (Fukutaku and Yamada, 1984) göstermiştir.

1.4.2. Poliaminler

Poliaminler iki veya daha fazla birincil amino grubuna sahip organik bileşiklerdir. Üşütücü sıcaklıklara toleransın oluşmasında poliaminlerin görevi fotosentetik sürecin korunması ile bağlantılıdır. Poliaminler, tilakoid membranların, özellikle ışık toplama kompleksi II (LHCII) ve PSII'nin korunmasıyla ilişkilidir (Kotzabasis et al., 1993). Poliaminler oksidatif strese karşı bitkiyi koruma görevi de görürler. Soğuk stresine maruz bırakılan domates bitkisinde, poliamin sentezinin inhibisyonu elektrolit sızıntısının artmasına neden olur (Kim et al., 2002). Poliaminler sinyal molekülü olarak görev yaparlar.

1.4.3. Glisin Betain

Glisin betainin yapısı

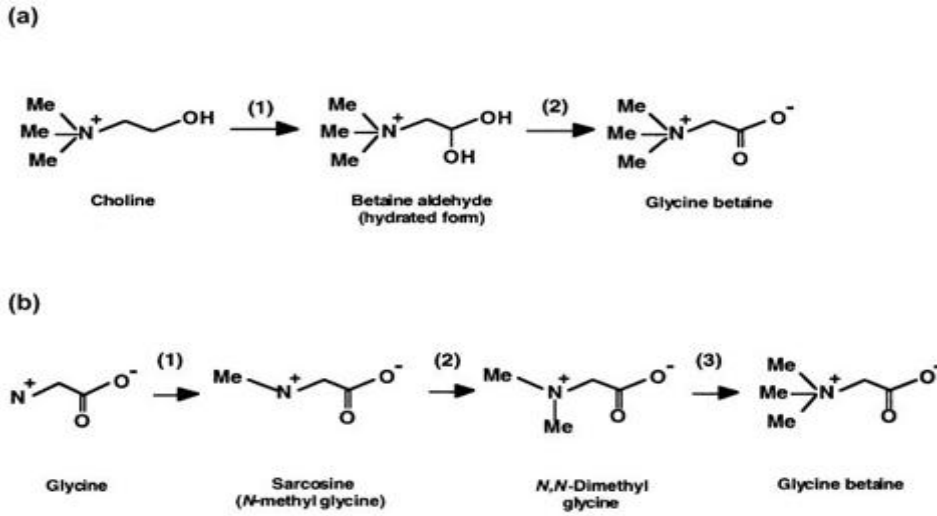
Glisin betain (N,N,N-trimetil glisin) nötral pH'a sahip amfoterik bir uyumlu bileşiktir, suda erir ve üç metil gruptan oluşan bir non-polar hidrokarbon parça içerir. Glisin betainin (GB) moleküler özellikleri, GB'nin enzim ve protein kompleksleri gibi makromoleküllerin hidrofobik ve hidrofilik domainlerle etkileşime girmesini sağlar. *in vitro* çalışmalar; GB'nin, bir hücrenin strese maruz kaldığı zaman hücre içi osmatik basıncı arttıran hücrel osmolit olduğunu gösterir (Gorham 1995).

GB'nin moleküler yapısını nasıl sabit tutabildiği açıklamak için iki hipotez önerilmiştir. Arakawa ve Timasheff (1983) yaptığı biyofiziksel analizlerin sonucunda, GB'nin bir protein ile tercihe bağlı olarak etkileşime girmediği, böylece proteindeki suyun bağlanacağı yüzeyin korunabildiği ortaya koymuştur. Diğer hipotez Schobert tarafından 1977 yılında ortaya atılmıştır. Bu hipoteze göre, su kıtlığı olduğunda GB'nin hidrofobik kısmı, bağlanan suyu kolayca serbest bırakan proteinin hidrofobik kısmına bağlanır. Bu durumda, GB proteinin hidrofobik kısmına suyun daha kolay bağlanmasını sağlar ve denaturasyondan proteini korur.

GB'nin Biyosentezi

Doğada GB'nin dağılımının taksonomi ile ilişkili olmadığı görülür. GB çeşitli prokaryot türlerinde, ökaryotik mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunan bir moleküldür. Biyolojik sistemlerde; GB, kolin ve glisin substratlarının varlığında iki farklı yol ile sentezlenir. Kolinin GB'e dönüşümü, kolinin oksidasyonunu sağlayan bir veya iki enzim ile gerçekleşir. Genellikle iki enzimin kullanıldığı yol, GB oluşumu çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda daha yaygındır. Bu yolda, GB toksik bir ara ürün (betain aldehyd) kolinin iki basamaklı oksidasyonunun sonucunda şekillenir (Şekil 1.7a). Yüksek bitkilerde, reaksiyonlar kloroplastın stromasında bulunan CMO ve BADH enzimleri tarafından katalizlenir. GB'nin biyosentezi stresle uyarılabilir. GB, stres şartlarında doğal GB biriktiren bitkilerde 40-400 $\mu\text{mol (g DW)}^{-1}$ konsantrasyonda birikir (Rhodes and Hanson 1993). Tek enzimin kullanıldığı yol, *Arthrobacter* genusundaki toprak bakterisinde tespit edilmiştir. Bu reaksiyon COD (H_2O_2 üreten oksidaz) enzimi tarafından katalizlenir.

Glisinin GB'e dönüşüm yolu iki ekstrem halofilik mikroorganizma (*Ectothiorhodospira halochloris* ve *Actinopolyspora halophilia*)'da tespit edilmiştir (Nyyssöla *et al.* 2000). Bu mikroorganizmalarda GB, iki S-adenosilmetionin bağımlı metiltransferaz GSMT ve SDMT tarafından katalizlenen üç ardışık N-metilasyon ile glisinden üretilir (Şekil 1.7b).



Şekil 1.7: GB'nin sentezlenme yolları [Sakamoto *et. al.* (2002)'dan alınmıştır]

Glisin betainin rolü

Glisin betain (GB) kuraklık tuzluluk, ekstrem sıcaklık ve ağır metal gibi çevresel streslere yanıtta bazı bitkiler tarafından sentezlenen temel bir ozmolittir. Düşük moleküler ağırlığa sahip, eriyebilen bir uyumlu bileşik olan GB hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda birikebilir ama toksik değildir. Bununla birlikte çeşitli abiyotik streslere yanıt olarak GB biriktirilmesi tüm bitkilerde gözlenmez. *Beta vulgaris*, *Spinacia oleracea*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Sorghum bicolor* gibi türler GB sentezleyebilir. Solanaceae familyasına ait olan *Lycopersicon esculentum*, *Arabidopsis thaliana*, patates, pirinç GB sentezleyemeyen bitkilerdir (Wyn Jones and Storey, 1981).

Birçok çalışma, üşütücü ve dondurucu streslerde GB'nin dışarıdan uygulanmasının bitkide dayanıklılığın arttığını göstermiştir (Kishitani et. al. 1994; Chen, Li and Chen 2000, Gorham 1995). PSII kompleksinin kararlılığına GB'nin etki olduğunu göstermiştir. *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir (Papageorgiou and Murata 1995). GB, siyanobakterilerden tilakoid membranların ve ıspanak yapraklarının PSII moleküllerinin *in vitro*'da inkübasyonu sırasında PSII kompleksinin oksijen salınımı aktivitesini artırır (Papageorgiou, Fujimura and Murata 1991; Mamedov et. al. 1991; Mohanty et. al. 1993).

S. cereale Puma kültüründe GB miktarı 4 haftalık alışma periyodu sonunda 1 g. yaş ağırlıkta 290 µg'dan 1300 µg'a artmıştır (Koster and Lynch 1992). Buğdayın üç farklı kültüründe yapılan çalışmada, GB miktarındaki önemli artış, soğuğa alıştırmamanın 2. haftasının sonunda gözlenmiştir. GB biriktirme miktarı kültürlerin dondurucu strese olan dayanıklılıklarıyla ilişkilidir (Kamata and Uemura, 2004). GB'nin soğuğa yanıtındaki rolü, normal olarak GB biriktiremeyen bitkilerin GB biriktirmesine olanak sağlanan çalışmalarla anlaşılmıştır. Soğuk stresi sırasında PSII aktivitesindeki azalış GB uygulanmış bitkilerde daha az şekilde gerçekleşir. Soğuk strese maruz kalan bitkiler 25⁰C'ye döndürüldüğünde GB uygulanmış bitkilerde daha yüksek gelişim oranı gözlenmiştir (Park et. al. 2006). GB don stresine karşı da bitkide tolerans sağlar. Don stresine gelişen tolerans, *Arabidopsis*'te *codA* geni ifade edildiğinde, soğuğa alışmamış bitkilerde iyon sızdırmazlığının LT₅₀'nin artmasıyla hesaplanır.

GB'nin görevi transkripsiyonel ve translasyonel mekanizmalarının kararlılığını sağlar. GB *in vitro*'da protein komplekslerin ve membranların kararlılığını sağlar (Papageorgiou and Murata, 1995). Düşük sıcaklık stresine yanıtta da benzer görev alır. Ayrıca GB, H₂O₂ sinyal yolunu dolaylı olarak etkileyebilir. GB toksik düzeyde biriktiğinde programlanmış hücre ölümüne neden olur ve toksik olmayan miktarda ise gen ifadesini düzenlediği ve strese yanıt verir. H₂O₂ bitkilerde bir sekonder mesajcıdır. Düşük düzeyde H₂O₂ katalaz gibi antioksidant enzimlerin ifadesini uyararak oksidatif strese karşı toleransı sağlar (Prasad et. al. 1994a). GB veya H₂O₂'nin dışarıdan uygulanması yabancı tip domateste soğuğa karşı tolerans sağlar (Park et. al., 2004). GB, H₂O₂ oluşumunu sağlayabilir ve bu şekilde GB'nin dışarıdan uygulanması H₂O₂ ile gerçekleşen antioksidant mekanizmaların uyarılması sonucunda soğuk stresine tolerans oluşturması olasıdır.

Don stresinin domateste yarattığı göze çarpan semptomu nekrotik yaprak oluşumudur. (Park *et al.* 2004). Ayrıca hücrel hasarın belirlenmesinde don uygulamasından sonra yapraklardaki elektrolit sızıntı ölçülür. GB sentezleyebilen transgenik domates bitkileriyle yapılan çalışmada, 3 gün 3⁰C uygulanan stresten sonra elektrolit sızıntı yabancı tipte en yüksek değerde, düşük oranda GB sentezleyebilen transgenik bitkide orta değerde, yüksek oranda GB sentezleyebilen transgenik bitkide ise düşük değerde olduğu tespit edilmiştir. Bu bitkiler 3 gün 25⁰C'de tutulduktan sonra hem yabancı tipte hem de transgenik bitkilerde sızıntının artarak devam ettiği gözlenmiştir.

3 gün 3⁰C uygulanan don stresinden sonra, yabancı tip bitkilerinin yapraklarındaki PSII aktivitesi 0. gün ile karşılaştırıldığında %40 azalmış, GB sentezleyebilen transgenik bitkilerde ise ilk aktivitelerinin %49-52 oranında korunmuştur.

GB birikimi çeşitli çevresel streslerden membranın hasar görmesini önler (Deshnium *et al.* 1997; Chen, Li and Chen 2000). Bunu membran stabilizatörü olarak, (Rudolph, Crowe & Crowe 1986), yüzeysel proteinleri kaplayan su tabakasını koruyarak (Coughlan & Heber 1982) veya lipid peroksidasyonunu indirgeyerek gerçekleştirir (Prasad, Anderson & Stewart 1994a). Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde özellikle mısır, darı ve salatalıkta elektrolit sızıntı ile lipid

peroksidasyonu arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur (Parkin and Kuo 1989; Lukatkin 2003).

1.5 Domates Bitkisi (*Lycopersicon esculentum*)

Solanaceae familyasına ait olan domates tarımı yapılan önemli bir kültür bitkisidir. 2008 verilerine göre ülkemizde 10 985 400 ton üretilmiştir. Dünya genelinde Çin ve ABD'den sonra en fazla domates yetiştiren 3. ülke Türkiye'dir (<http://faostat.fao.org>). Türkiye'de domates örtü altı veya açık sahada yetiştirilir. Ülkemizin tüm tarımsal alanlarında açıkta yetiştiriciliği yapılmasına rağmen örtü altı yetiştiriciliği daha çok Ege, Akdeniz ve Marmara bölgesinde yapılmaktadır.

Domates ılıman iklim bitkisidir ve soğuğa duyarlıdır. Büyümesi için en uygun sıcaklık 22-26⁰C'dir. Sıcaklık 15⁰C'nin altına ve 35⁰C'nin üstüne çıktığı zaman meyve tutumunda düzensizlikler olmaktadır. Gece ile gündüz arasındaki sıcaklık farkının 8-12⁰C derece olması istenir. Domates 3⁰C'ye kadar düşen yerlerde sorunsuz yetişir. 15⁰C civarındaki sıcaklıklarda çiçekler açar ancak tozlanma, polen tüpü gelişmesi açısından problemler yaşanır. İyi bir tozlanma ve dölleme için sıcaklığın en az 16-17⁰C den yüksek olması gerekir. Oransal nem %65-70 olmalıdır. Anavatanı Güney ve Orta Amerika olan domates, 0-15⁰C aralığındaki sıcaklıklara maruz kaldığında hasar görür. Bu sıcaklık aralığında domatesin tüm gelişim aşamaları olumsuz olarak etkilenir. 10-15⁰C'nin altındaki düşük sıcaklık koşullarında erkek organlarda oluşan polenlerin az sayıda olması veya hiç oluşmaması yada oluşan polenlerin canlılık ve çimlenme yeteneklerinin düşük olması, çiçek organları ile eşey hücrelerinde deformasyonların ve gelişim bozukluklarının görülmesi gibi faktörler verimi büyük ölçüde düşürmektedir (Dasgan ve ark., 1994; Abak ve Güler, 1994; Abak ve ark., 1995; Dasgan ve ark., 1999).

Soğuk uygulanan domates fidelerinin büyümesi sınırlanır, çiçek ve meyve oluşumu gözlenmez. Soğuk stresi ile karşılaşıldığında solunumun ve fotosentezin azalması, organların ağırlıklarında azalma, hızlı su kaybı, senesens, yaprak yüzeyinde lezyon oluşumu, hastalıklara duyarlılığın artması gibi fizyolojik bozukluklar farklı gelişim aşamalarında görülebilir (Saltveit 2002). Soğuktan korunmayı sağlayan GB, domates tarafından doğal yoldan sentezlenemez. Birçok

bitkinin sentezleyebildiği GB, domates gibi bu organik bileşiği sentezleyemeyen bitkilere çeşitli yollar ile aktarılması çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalar, dışarıdan yaprağa GB solusyonunun püskürtülmesi, sulama suyuna veya MS gibi kültür ortamlarına GB eklenmesi ve/veya ilgili gen transferi şeklinde gerçekleşir. Bu çalışmaların sonucunda GB sentezleyemeyen bitkinin GB'i hücre içine aldığı tespit edilmiş ve stres karşısında daha dirençli hale geldiği belirlenmiştir.

Tez projemizde ülkemizde tarımı yapılan domates bitkilerinde soğuğa duyarlı ve dirençli iki kültür çeşidinin düşük sıcaklığa verdiği çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal yanıtlar karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bununla birlikte, eksojen GB uygulamasının düşük sıcaklık stresi altında domates bitkisinde oluşturduğu etkilerin koruyucu olup olmadığı belirlenmiştir. Bu kapsamda düşük sıcaklığın çeşitli büyüme parametrelerine, hücre bağıl su içeriğine, PSII'nin fotokimyasal etkinliğine, osmotik potansiyele, membran elektrolit sızıntısına etkileri saptanmıştır.

2. MATERYAL METOD

2.1. Bitki Materyali ve Yetiştirilmesi

Çalışmamızda bitki materyali olarak, Syngenta A.Ş. den temin edilen soğuk stresine toleranslı (T47657) ve duyarlı (Gary) farklı iki domates (*Lycopersicon esculentum*) çeşidi kullanıldı. Tohumlar, yüzey sterilizasyonu için 10 dakika %10'luk hipoklorit çözeltisinde bekletildikten sonra steril deiyonize su ile 5 kez yıkandı. Tohumlar, çimlenmeleri için steril, ıslatılmış filtre kağıtlarına yerleştirildi ve 25⁰C'de sıcaklıkta, karanlıkta bekletildi. Çimlenme yaklaşık olarak her seride 4 gün içinde gerçekleşti. Çimlenen bitkiler perlit içeren saksılara aktarıldı ve ½ oranında seyreltilmiş Hoagland çözeltisiyle sulandı (Hoagland, 1950). Bitkiler kontrollü koşullarda şartlarında (16 saat ışık/ 8 saat karanlık, 25/23⁰C sıcaklık, nem oranı % 70, 350 µmol m⁻² s⁻¹ ışık yoğunluğu) büyütülmüştür.

Fideler 3 haftalık büyüklüğe ulaştıklarında soğuk stresi uygulaması yapılmıştır. Uygulama grupları aşağıdaki şekilde belirlenmiştir:

- i. Kontrol grubu
- ii. Yalnız soğuk stresi grup
- iii. Yalnız GB uygulanan grup
- iv. GB uygulamasının ve soğuk stresinin birlikte uygulandığı grup

Glisin betain uygulaması yapılacak bitkilere soğuk stresi uygulamasından 1 gün önce glisin betain uygulaması yapıldı. Bitkilerin yaprak yüzeyine 10 mM glisin betain püskürtme ile uygulandı. GB bitki tarafında alınmasını kolaylaştırmak için glisin betain çözeltisinin içine tween-20 [%0,005 (v/v)] ilave edildi. GB bitkinin tüm yapraklarına uygulandıktan sonra, bitkiler 24 saat karanlıkta tutuldu (Park v.d. 2006). Soğuk stresi, uygulaması için 3 haftalık bitkiler kontrollü, sıcaklık, nem ve 16 saat ışık/ 8 saat karanlık koşullarına sahip Nüve marka iklimlendirme dolabına alındı. Soğuk stresi, gündüz 10⁰C; gece ise 4⁰C 5 gün uygulandı. Kontrol bitkileri ise 16 saat ışık/ 8 saat karanlık, 25/23⁰C sıcaklıkta yetiştirildi. Deneme süresince kontrol ve soğuk stres uygulanan bitkiler ½ oranında seyreltilmiş Hoagland çözeltisiyle sulandı. Tüm örneklemeler için 3. ve 4. yapraklar kullanıldı. Birbirinden bağımsız üç deneme serisi kuruldu.

2.2. Büyüme Parametreleri

Domates bitkisine soğuk stresi, GB uygulaması ve soğuk stresi ve GB uygulamasının ve soğuk stresinin birlikte etkilerinin belirlenmesi için kök ve gövde uzunluğu ve ağırlığı ölçülmüştür. Örneklemeler, stres ve kontrol grubu olmak üzere 0., 1. ve 5. günlerde rasgele seçilen bitkilerden yapılmıştır. Ağırlığı alınan materyaller, 70 °C'de 72 saat bekletilip kurutulmuştur. Kuru ağırlıklar kaydedilmiştir.

2.3. Klorofil Fluoresans Ölçümleri

Klorofil flüoresans ölçümleri, uygulamanın 0., 1. ve 5. gününde yapılmıştır. Flüoresans ölçümlerinden önce, yaprak üst yüzeyindeki 1cm²'lik alan 20 dakika boyunca yaprak klipsleri kullanılarak karanlığa adapte edilmiştir. Bir bitki verim analizi (Plant efficient analyser cihazı Hansatech marka kullanılarak) yaprakların 20 doygun ışık demetine maruz bırakılmasıyla, maksimum flüoresans uyarılması (*F_m*), değişken flüoresans (*F_v*) ve *F_v/F_m* oranları belirlenmiştir.

2.4. Yaprak Osmotik Potansiyeli

Uygulamanın 0., 1. ve 5. gününde yaprak ozmotik potansiyeli Wescor 5500 marka ozmatik potansiyel sistem cihazı ile belirlenmiştir. Ölçümler, mmol kg⁻¹ olarak ölçülmüştür.

2.5. Bağıl (Oransal, Bağıl) Su İçeriği

Yapraklardaki bağıl su miktarını belirlemek için, uygulamanın 0., 1. ve 5. gününde 2 farklı bitkinin yapraklarının yaş ağırlıkları (YA) tespit edildi. Daha sonra bu yaprakların turgorlu hale gelmesi için 5 saat deiyonize suda bekletildi. Yaprakların fazla suyu alındıktan sonra turgorlu ağırlıkları (TA) tespit edildi. Bu işlemin ardından, yapraklar 72 saat boyunca 70 °C'lik etüvde kuruması sağlandı. Yaprakların kuru ağırlıkları (KA) tespit edildikten sonra RWC değerleri Smart ve Bingham (1972)'in aşağıda verilen formülüne göre hesaplanmıştır.

$$RWC\% = [(YA-KA)/(TA-KA)] \times 100$$

2.6. Yapraklarda Elektrik İletkenlik Değişiminin Belirlenmesi

Elektrik iletkenliğin belirlenmesi için yapraklardan 0,6 mm çapında diskler kesilmiştir. Disklerin damarsız bölgeden ve yaprağın orta kısmına yakın bir bölgeden alınmasına dikkat edilmiştir. WTW Inolab Cond. 720 iletkenlik ölçer cihazı ile iletkenliği ölçülmüş (X_0), 20 ml dH_2O içinde 2 saat oda sıcaklığında diskler bekletilmiştir ve suyun iletkenliği ölçülmüştür (X_i). Daha sonra örnekler aynı suyun içinde $+80^{\circ}C$ 'de 2 saat tutulmuştur. Suyun sıcaklığı oda sıcaklığına gelince iletkenlik tekrar ölçülmüştür (X_t). Daha sonra hesaplama aşağıdaki formüle göre gerçekleştirilmiştir (Scotti Campos ve Thu Pham Ti; 1997).

$$\text{Electrolit leakage} = [(X_i - X_0) / (X_t - X_0)] \times 100$$

Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonun son ürünü malondialdehid (MDA) miktarı Madhava Rao ve Sresty (2000)'e göre ölçülmüştür. 0,5 g örnek %0,1 trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilmiştir. Homojenat 5 dakika 10.000g'de santrifüj edilir. Süpernatant hacminin 4 katı hacminde %20 TCA ve %0,5 thiobarbiturik asit (TBA) karışımı konulmuştur. Daha sonra su banyosunda $95^{\circ}C$ 'de 30 dakika inkübe edilir. Hızlı soğutulduktan sonra 10.000g'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant 532 nm ve 600 nm'deki absorbans değerlerinde okunmuştur.

2.7. Glisin Betain Analizi

Glisin Betain analizi, Shimadzu marka, model HPLC cihazı ile yapıldı. Subbarao et. al. (1999) ve Bessieres et. al. (1999) çalışmalarında belirtilen yöntemler modifiye edilerek kullanıldı. Bu analiz için glisin betain uygulanmış ve hem glisin betain hem de soğuk uygulanmış domates bitkilerinden 24. saat ve 5. günlerinde alınan ve sıvı azotta dondurularak analiz gününe kadar $-80^{\circ}C$ 'de saklanan yaprak örneklerinden 0,5 g tartıldı ve yapraklar 4 ml metanol:kloroform: H_2O (12/5/3 v/v) karışımı ile homojenize edildi. Homojenize

haldeki örnekler, +4⁰C'de iki gece bekletildi. Bu süre sonunda, metanol üst fazından 1 ml alınarak, BioRad AG1-X8 iyon seçici reçineden geçirilerek saflaştırıldı. İşlem sonrasında örnekler membran filtreden (0,45 µm) geçirilerek HPLC sisteme uygulandı. HPLC'de mobil faz olarak 15 mM KH₂PO₄ , 0,8 ml dakika⁻¹ sabit akış hızı ve 70⁰C sıcaklık koşulları ve Nucleogel RP 100-8, 300x7.7 mm kolon ve koruyucu kolon kullanıldı. Örneklerdeki glisin betain miktarı UV dedektör ile 195 nm'de, aynı çalışma koşullarında tanımlanan glisin betain standartlarından elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak nmol g. YA⁻¹ biriminde belirlendi.

2.9 FAD ve LOX Genlerinin RT-PCR Analizleri

Her uygulama grubundan 100 mg yaprak örneği alınarak önce sıvı azotta toz haline getirildi. Total RNA izolasyonu için Purelink RNA Mini Kit (Ambion) kullanıldı. İzolasyon kitin protokolüne uygun olarak yapıldı. İzole edilen RNAların miktarı Biofotometre (Ependorf) ile bütünlüğü ve kalitesi %1'lik agaroz jelde görüntülenerek belirlendi. RNA Qscript cDNA sentezleme kiti (Quanta) kullanarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. LeFAD72 F: 5'-ATTGTTGGGCATTGAGGGTA-3' R: 5'-CCATGGATTTTTGACCCAAC-3'
 LeLox F: 5'-AGAGGAGTGGCTGTTGAGGA-3' R: 5'-TGGTGCAACAATCTCTGAGC-3'
 LeAc F: 5'-CAGGCACACAGGTGTTATGG-3' R: 5'-GCCTCAGTCAGGAGAACAGG-3'

primerleri ile cDNA'in PCR amplifikasyonu, 94⁰C'de 1 dakika, 55⁰C'de 2 dakika, 72⁰C'de 3 dakika şekilde 35 döngüde gerçekleştirilmiştir. RT-PCR ürünleri 0.5 µg mL⁻¹ EtBr eklenmiş %1 (w/v) agaroz jele yüklenmiştir. Jel, Vilber Lourmat jel görüntüleme cihazıyla fotograflanmıştır. Bio-Profil Bio-1D Windows Application V11.9 software package (Vilber Lourmat, Marne la Vallée, France) ile analiz edilmiştir.

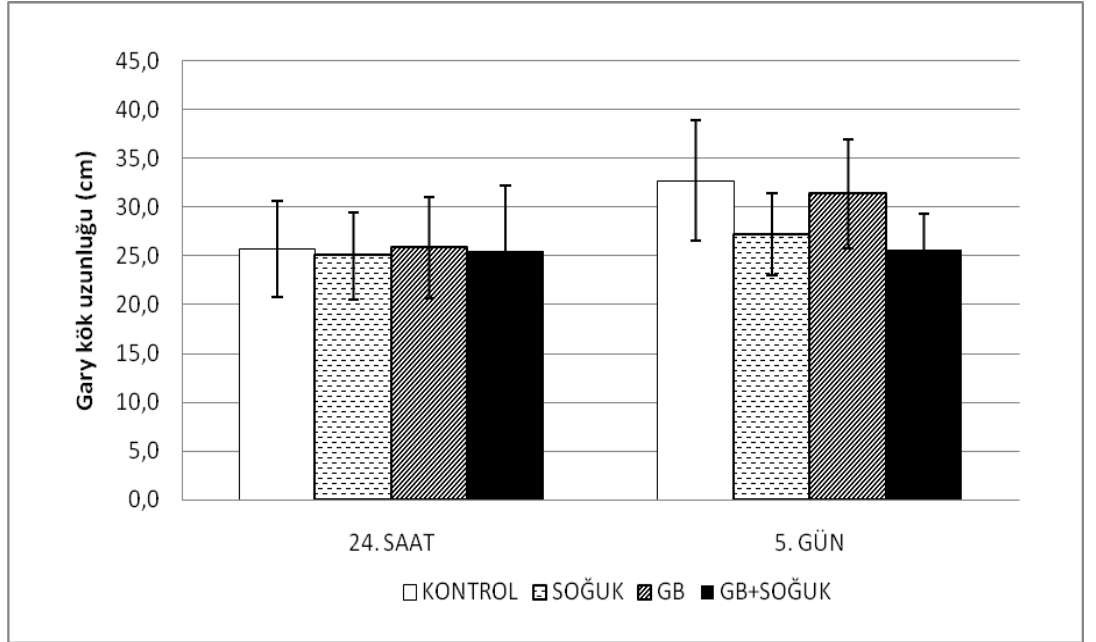
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Büyüme Parametreleri

3.1.1. Kök ve Gövde Uzunluğu

Soğuk stresine duyarlı (*Gary*) ve toleranslı (*T47657*) domates çeşitlerinde stres uygulamasının 0, 1. ve 5. günlerinde kök ve gövde uzunlukları belirlenmiştir. Kök ve gövde uzunluklarına ait veriler sırasıyla Şekil 3.1; 3.2; 3.3 ve 3.4'te verilmiştir. Soğuk stresine duyarlı çeşitte, kontrol grubuna göre stres uygulamasının 5. gününde kök uzunluğu, soğuk stresi uygulanan grupta %16,79; GB uygulanan grupta %4,28 ve GB ve soğuk stresinin birlikte uygulandığı grupta ise %21,77 oranında azaldı (Şekil 3.1).

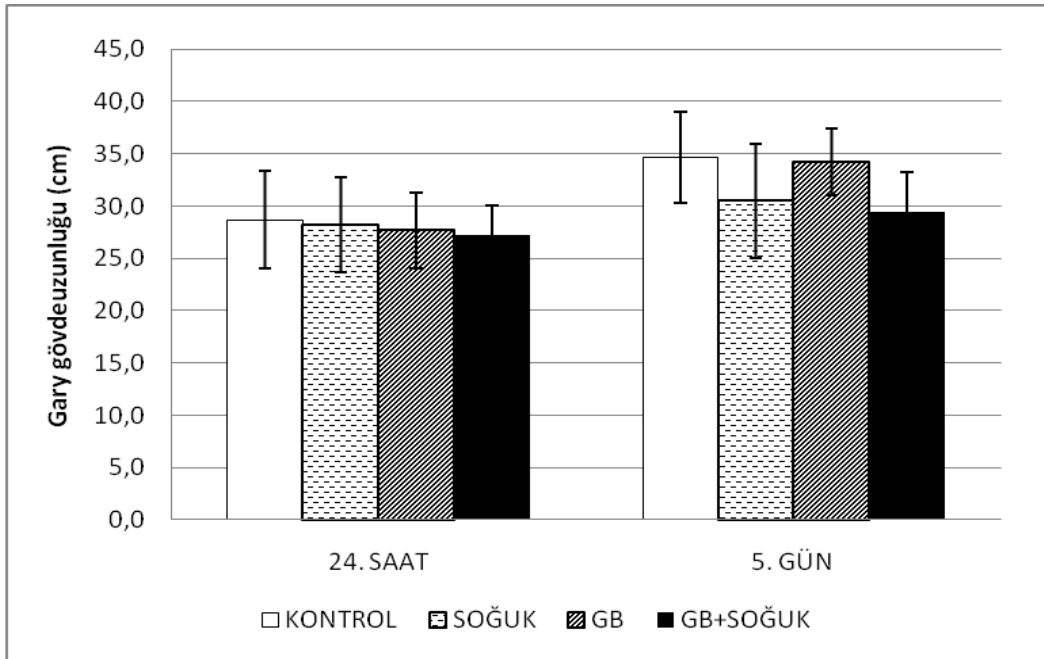
Şekil 3.1: *Gary* domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kök uzunluğundaki değişimler (cm)



	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	25,71±4,9	25±4,49	25,83±5,19	25,5±6,72
5. GÜN	32,7±6,23	27,21±4,18	31,3±5,59	25,58±3,75

Soğuk stresine duyarlı çeşitte gövde uzunluğu stres uygulamasının 5. gününde kontrol grubu bitkilerine göre sırasıyla; soğuk uygulanan grupta %12,03; GB uygulanan bitkilerde %1,21; GB ve soğuk uygulanan bitkilerde ise %15,2 oranında azaldı. (Şekil 3.2).

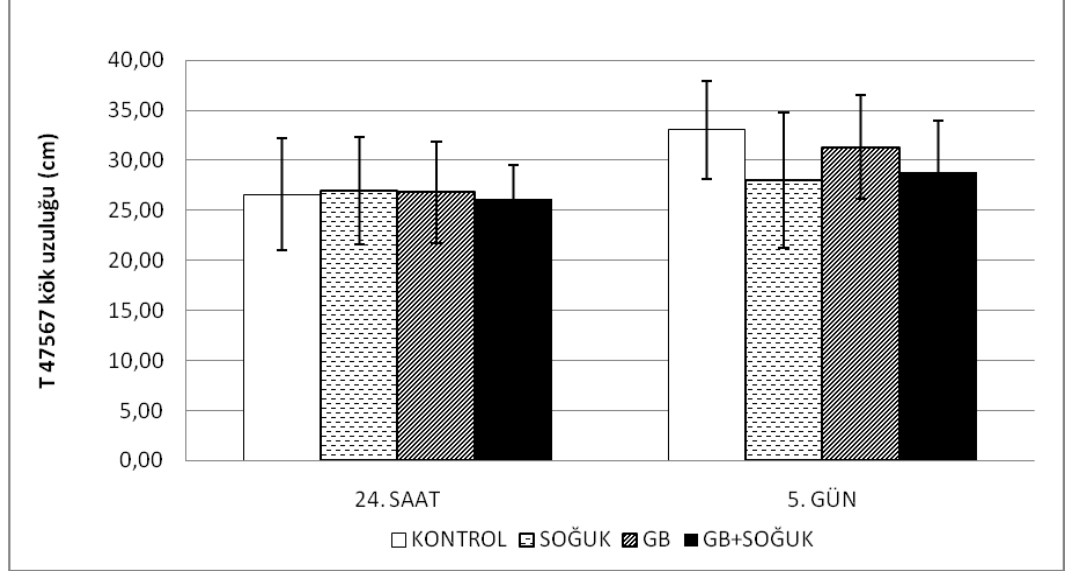
Şekil 3.2: Gary domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda gövde uzunluğundaki değişimler (cm)



	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	28,69±4,63	28,22±4,52	27,67±3,65	27,25±2,79
5. GÜN	34,67±4,35	30,5±5,45	34,25±3,2	29,4±3,8

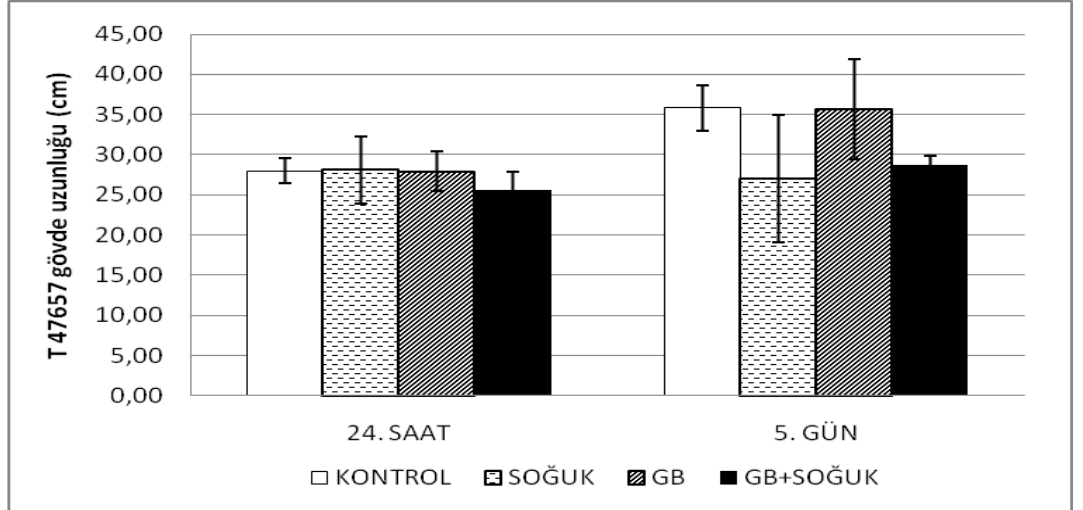
Soğuk stresine dayanıklı T47657 çeşidinde de stres süresince kök ve gövde uzunluklarındaki değişimler belirlendi. Stres uygulamasının 5. gününde kök uzunluğu kontrol gruplarına göre tüm gruplarda azaldı. Kontrol grubu bitkileri ile karşılaştırıldığında sırasıyla; soğuk uygulanan bitkilerin kök uzunluğunda %15,33; GB uygulanan bitkilerde %5,32; GB ve soğukun birlikte uygulandığı bitkilerde ise, %12,82 oranında azalma olduğunu gözlemlendi (Şekil 3.3).

Şekil 3.3: T47657 domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kök uzunluğundaki değişimler (cm)



	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	26,61±5,6	26,92±5,37	26,78±5,07	26,17±3,41
5. GÜN	33,07±4,9	28±6,75	31,31±5,22	28,83±5,07

Şekil 3.4: T47657 domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda gövde uzunluğundaki değişimler (cm)



	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	28±1,52	28,08±4,13	27,92±2,48	25,67±2,18
5. GÜN	35,83±2,84	27,06±7,92	35,67±6,24	28,67±1,21

Stres uygulamasının 5. gününde gövde uzunluğundaki değişimler incelendiğinde ise, kontrol grubu bitkilerine göre yalnız GB uygulanan grup dışındaki tüm gruplarda belirgin bir azalma gözlemlendi. Gövde uzunluğundaki azalma, soğuk stresi uygulanan grupta % 24,48; GB uygulanan grupta % 0,45; GB ve soğuk stresinin birlikte uygulandığı grupta ise % 19,98 oranında kaydedildi (Şekil 3.4).

Genel olarak düşük sıcaklık uygulaması her iki çeşitte de kök ve gövde uzunluğunu azalttı. Stres uygulamasının 1. gününde bu etki çok belirgin değerlere sahip olmadığı için sonuçlarda 5. gün sonundaki değişimler dikkate alındı. Domates bitkisi özellikle erken fide aşamasında 12⁰C nin altındaki sıcaklık değerlerinden olumsuz etkilenmektedir (Yu ve ark., 2009). Bu etki öncelikle kök ve gövde büyümesinin azalması şeklinde görülmektedir. Çalışmamızda da özellikle stres uygulamasının 5. gününde soğuğa duyarlı olan *Gary* çeşidinde ve soğuğa toleranslı *T47657* çeşidinde de kök ve gövde uzunluklarında azalma belirgin olarak gözlemlendi. Buğdayda yapılan çalışmada; 5⁰C’de büyüyen bitkilerin gövde uzunluğundaki azalma %75 oranında azaldığı görülmüştür. Aynı çalışmada, kök uzunluğunun ise %55 oranında azaldığı görülmüştür. (Equiza M. et. al. 2001). Mısır bitkisinde yapılan bir çalışmada ise, 2 gün boyunca soğuk stresine maruz kalan bitkilerdeki kök uzunluğu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %52 oranında daha az olduğu görülmüştür (Aroca R., et. al. 2001)

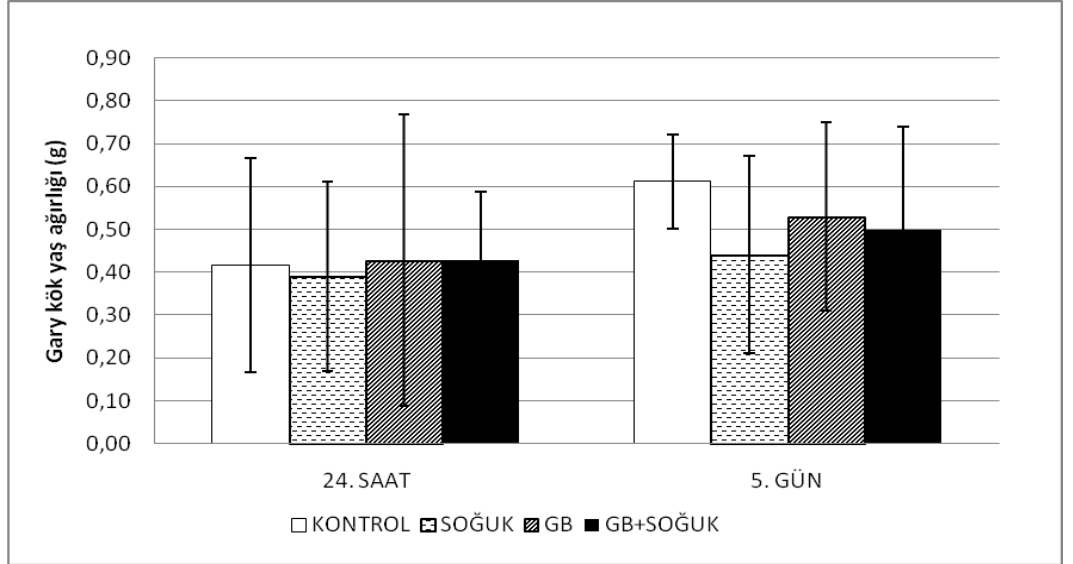
Ekzojen glisin betain uygulamasının soğuk stresine karşı koruyucu etkisi dayanıklı çeşit *T47657* de kaydedildi. Bu çeşitte GB uygulaması, soğuk stresinin büyümeyi azaltıcı etkisini hem kökte hem de gövde de büyük ölçüde iyileştirdi. Ancak *Gary* çeşidinde de glisin betain uygulaması hem kökte hem de gövde de stres etkisini arttırıcı bir etki gösterdi. Pirinç bitkisine tuz stresi koşullarında ekzojen GB uygulaması yapılan bir çalışmada, bitkilerin kök ve gövde uzunluğunda önemli bir değişim olmadığı gösterilmiştir (Demiral 2005).

3.1.2. Kök ve Gövde Yaş Ağırlıkları

Soğuk stresine duyarlı (*Gary*) ve toleranslı (*T47657*) domates çeşitlerinde stres uygulamasının 0, 1. ve 5. günlerinde kök ve gövde yaş ağırlıkları tartılarak,

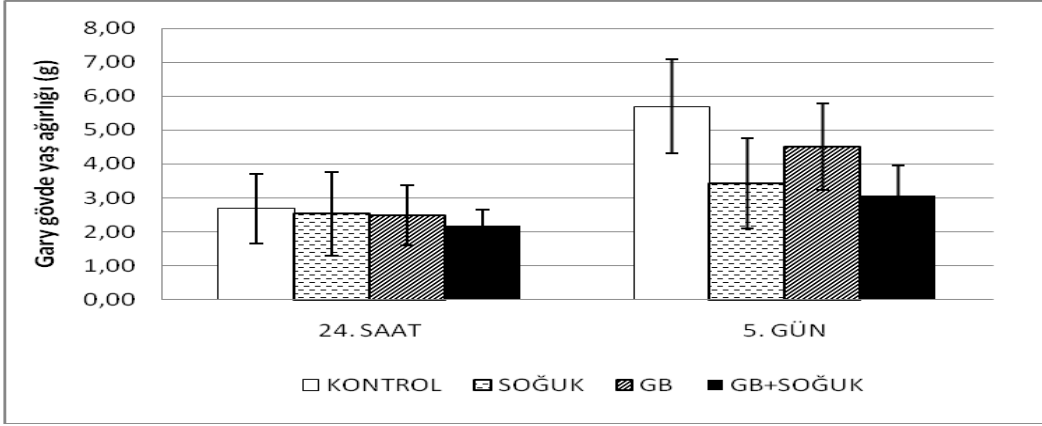
kaydedildi. Kök ve gövde yaş ağırlık değişimlerine ait veriler sırasıyla Şekil 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8’de verilmiştir. Kök ve gövde yaş ağırlığı değerleri genel olarak incelendiğinde her iki çeşidinde soğuk stresinden olumsuz etkilendiği gözlemlendi. Duyarlı çeşit *Gary*’de stres uygulamasının 5. gününde kök yaş ağırlıkları soğuk uygulanan grupta, GB uygulanan grupta ve GB ile birlikte soğuk stresi uygulanan grupta sırasıyla; %27,87; %13,11 ve %18,03 oranlarında azaldı. Ancak, tüm değerler incelendiğinde yaş ağırlık değişimi açısından GB uygulamasının soğuk stresinin etkisini önemli ölçüde iyileştirdiği görüldü (Şekil 3.5).

Şekil 3.5: *Gary* domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kök yaş ağırlığındaki değişimler (g)



	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	0,42±0,25	0,39±0,22	0,43±0,34	0,43±0,16
5. GÜN	0,61±0,11	0,44±0,23	0,53±0,22	0,5±0,24

Şekil 3.6: Gary domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda gövde yaş ağırlığındaki değişimler (g)

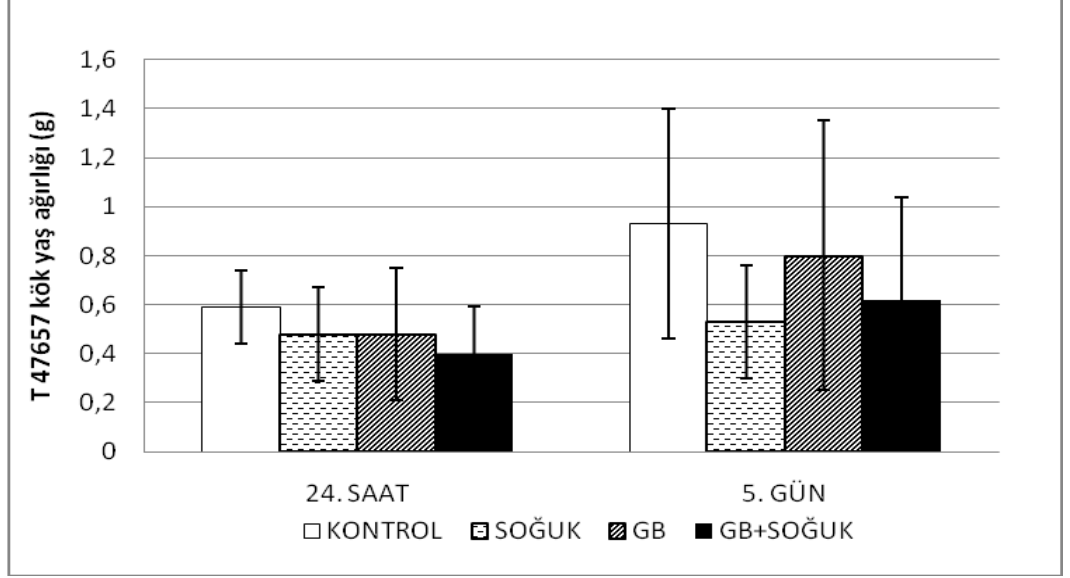


	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	2,68±1,03	2,53±1,23	2,49±0,89	2,17±0,49
5. GÜN	5,7±1,39	3,42±1,33	4,5±1,27	3,07±0,88

Soğuk stresinin bitkiler üzerindeki etkisinin anlaşılması açısından önemli parametrelerden biri olan gövde yaş ağırlığı değişiminin duyarlı çeşitte uygulama gruplarına göre farklı olduğu gözlemlendi. Gary çeşidinde, gövde yaş ağırlık değişimindeki azalma en çok GB ve soğuk stresinin birlikte uygulandığı grupta belirlendi. Soğuk stresinin 5. gününde kontrol bitkilerinin gövde yaş ağırlıklarına göre; soğuk stresine maruz kalan bitkilerin gövde yaş ağırlıkları % 40; GB uygulanmış bitkilerin gövde yaş ağırlıkları % 21,05; GB ve soğuk stresinin birlikte uygulandığı bitkilerin gövde yaş ağırlıkları ise % 46,14 oranında azaldı (Şekil 3.6).

Dayanıklı çeşit T47567'de kök yaş ağırlıkları; stres uygulamasının 5. gününde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; soğuk stresi, GB ve GB ile birlikte soğuk stresi uygulanmış gruplarda sırasıyla; %43, %14; %33 oranlarında azaldı. Soğuk stresi koşullarında GB uygulamasının kök yaş ağırlığı üzerinde iyileştirici etkisinin kök uzunluk değişimindeki iyileştirici etki ile uyumlu olduğu görüldü (Şekil 3.7).

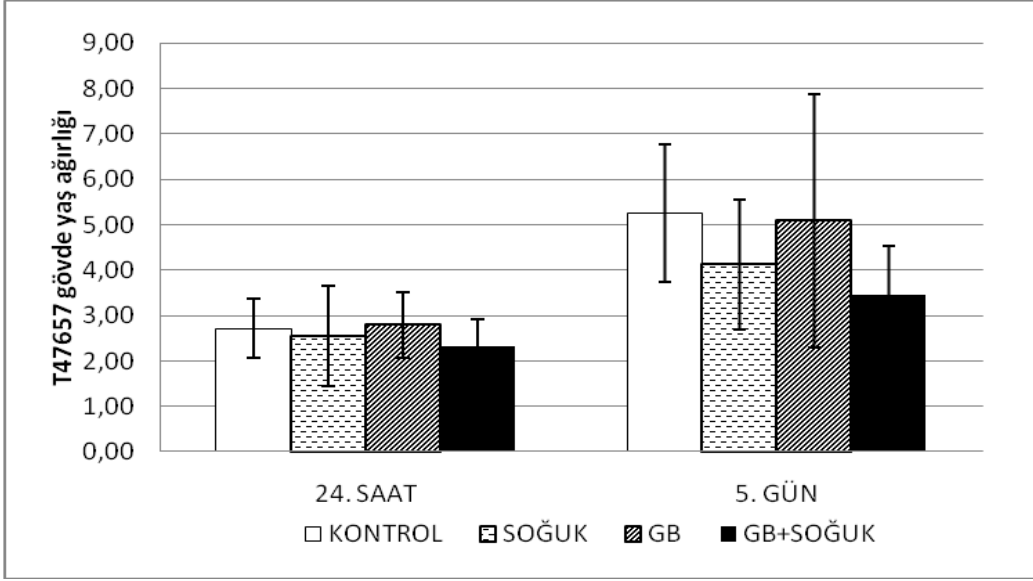
Şekil 3.7: *T 47657* domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kök yaş ağırlığındaki değişimler (g)



	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	0,59±0,15	0,48±0,19	0,48±0,27	0,4±0,19
5. GÜN	0,93±0,47	0,53±0,23	0,8±0,55	0,62±0,42

Soğuk stresi koşullarında *T47657* çeşidinde gövde yaş ağırlığı değerleri incelendiğinde stresin 5. gününde kontrol gruplarına göre, soğuk stresi, GB ve GB ile birlikte soğuk stresi uygulanmış gruplarda gövde yaş ağırlığı sırasıyla; %22, %3; %34 oranlarında azaldı (Şekil 3.8). Gövde yaş ağırlığındaki bu değişim gövde uzunluk değişimlerinden farklılık göstermektedir. Düşük sıcaklık stresinin bitkiler üzerinde oluşturduğu çeşitli olumsuz etkilerin en önemli nedeninin, hücre seviyesindeki suyun miktarının ve kullanılabilirliğinin azalması olduğu bilinmektedir. Bu açıdan ele alındığında yaş ağırlık değerlerindeki değişimler her iki çeşitte de soğuk stresinin kök ve gövde de su içeriğini azalttığını ve eksojen glisin betain uygulamasının soğuk stresinin etkisini iyileştirdiği gözlenmedi. Ancak *T47567* çeşidinin kök yaş ağırlık değerlerinde glisin betain uygulamasının olumlu etkisi görülmektedir. Benzer şekilde, Yu ve ark. (2009) domates bitkisinde yaptıkları bir çalışma da 16⁰C (gündüz)/8⁰C (gece) sıcaklık değerlerinde kök ve gövde de özellikle yaş ağırlık değerlerinde belirgin bir azalma kaydetmişlerdir.

Şekil 3.8: T47657 domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda gövde yaş ağırlığındaki değişimler (g)

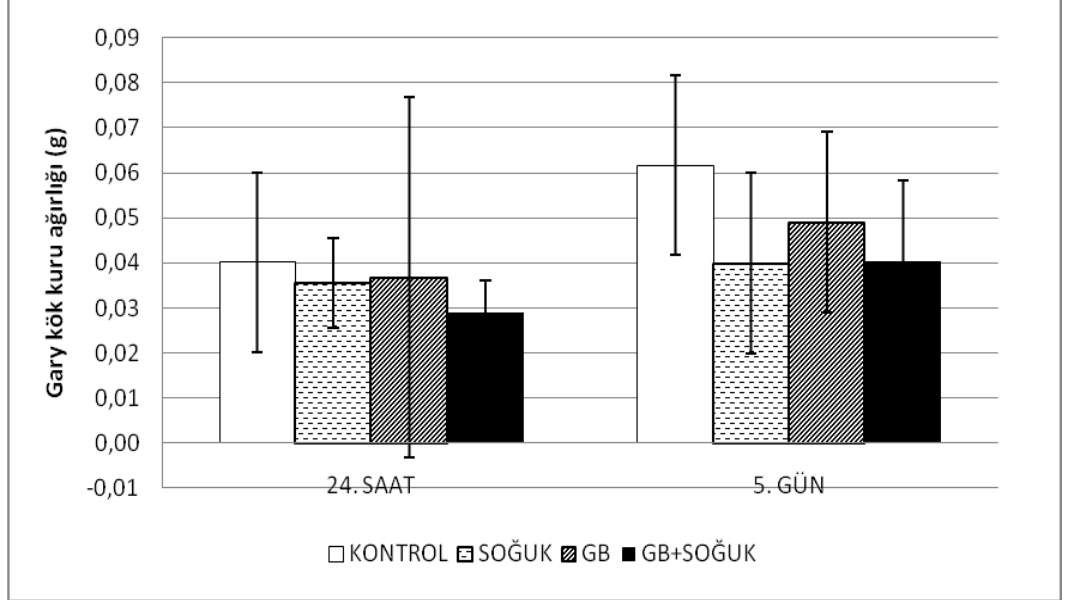


	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	2,71±0,65	2,55±1,11	2,8±0,72	2,33±0,58
5. GÜN	5,26±1,51	4,12±1,42	5,08±2,79	3,46±1,07

3.1.3. Kök ve Gövde Kuru Ağırlıkları

Soğuk stresine duyarlı (*Gary*) ve toleranslı (*T47657*) domates çeşitlerinde kök ve gövde kuru ağırlıkları soğuk stresi uygulamasının 0., 1. ve 5. günlerinde tartılarak, kaydedildi. Kök ve gövde kuru ağırlık değişimlerine ait veriler sırasıyla Şekil 3.9, 3.10, 3.11 ve 3.12’de verilmiştir. Soğuk stresi uygulamasının 5. gününde *Gary* çeşidinde, kök kuru ağırlık değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında soğuk stresi uygulanan grupta %33,3; GB uygulanan grupta %16,6; GB ve soğuk stresinin birlikte uygulandığı grupta ise %33,3 oranında azaldı (Şekil 3.9).

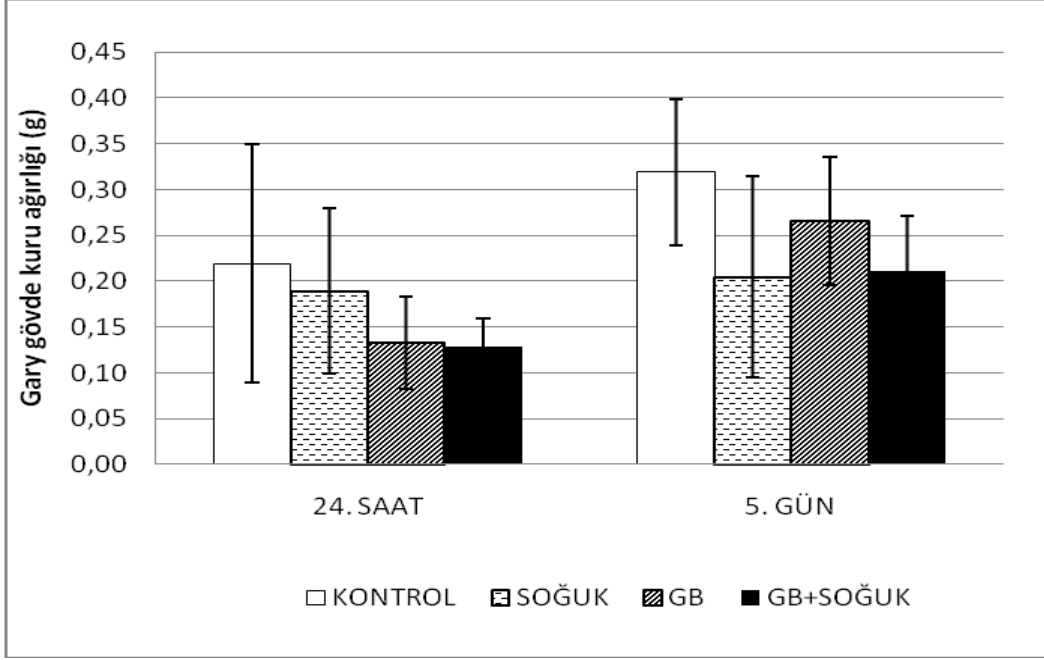
Şekil 3.9: Gary domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kök kuru ağırlığındaki değişimler (g)



	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	0,04±0,02	0,036±0,01	0,04±0,04	0,03±0,007
5. GÜN	0,06±0,02	0,04±0,02	0,05±0,02	0,04±0,018

Soğuk stresine duyarlı çeşidin gövde kuru ağırlıkları incelendiğinde, kontrol grubuna göre tüm uygulama gruplarında belirgin bir azalma gözlemlendi. Gövde kuru ağırlığı stresin 5. gününde, yalnız soğuk stresi uygulanan grupta %37,5; yalnız GB uygulanan grupta %16; GB ile birlikte soğuk stresi uygulanan grupta ise %34 oranında azaldı (Şekil 3.10).

Şekil 3.10: Gary domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda gövde kuru ağırlığındaki değişimler (g)

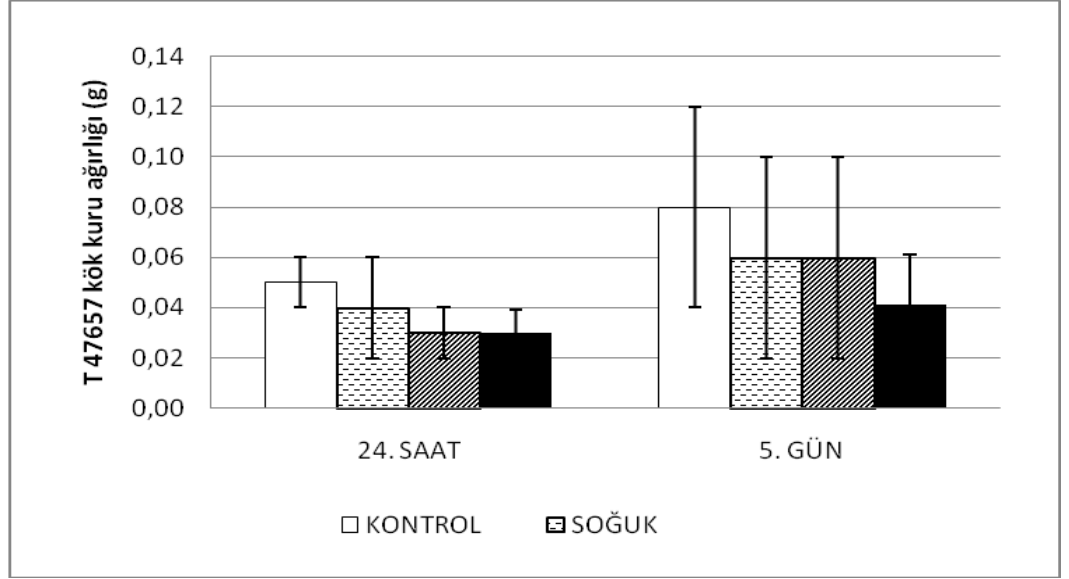


	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	0,22±0,13	0,19±0,09	0,13±0,05	0,13±0,03
5. GÜN	0,32±0,08	0,2±0,11	0,27±0,07	0,21±0,06

Genel olarak duyarlı çeşitte (*Gary*) düşük sıcaklık uygulaması kök ve gövde kuru ağırlıklarını daha önceden belirtilen büyüme parametrelerinde olduğu gibi azaltmıştır. Ancak ölçülen tüm değerler karşılaştırıldığında en önemli farklılık glisin betainin iyileştirici etkisinin sadece gövde kuru ağırlık değerleri üzerinde görülmesidir.

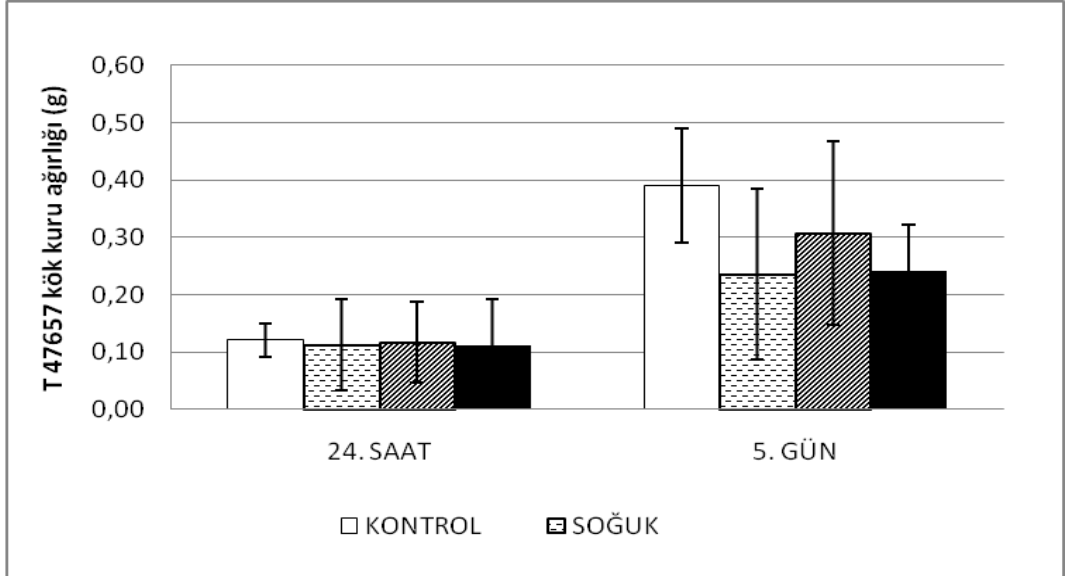
Soğuk stresi uygulaması toleranslı çeşitte de kök ve gövde kuru ağırlık değerlerini olumsuz etkiledi. Soğuk stresinin 5. gününde, *T47567* çeşidinde, kontrol grubuna göre kök kuru ağırlıkları; yalnız soğuk stresi uygulanan grupta %25, yalnız GB uygulanan grupta %25, GB ile birlikte soğuk stresi uygulanan grupta %50 oranında azaldı (Şekil 3.11). Soğuk stresine dayanıklı çeşidin gövde kuru ağırlıkları 5. günde, kontrol bitkilerinde göre soğuk stresi, GB ve GB ile birlikte soğuk stresi uygulanan gruplarda sırasıyla; %38; %20,5; %38 oranında azaldı (Şekil 3.12). Kuru ağırlık değerlerinde gözlenen azalma soğuk stresinin genel etkisini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte eksojen glisin betain uygulaması kuru ağırlık değerleri açısından hem kök de hem de gövde de iyileştirici bir etki göstermemiştir.

Şekil 3.11: T47657 domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kök kuru ağırlığındaki değişimler (g)



	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	0,05±0,01	0,04±0,02	0,03±0,01	0,03±0,009
5. GÜN	0,08±0,04	0,06±0,04	0,06±0,04	0,04±0,02

Şekil 3.12: T47657 domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda gövde kuru ağırlığındaki değişimler (g)



	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	0,12±0,03	0,11±0,08	0,12±0,07	0,11±0,08
5. GÜN	0,39±0,1	0,24±0,15	0,31±0,16	0,24±0,08

Kök ve gövde kuru ağırlıkları sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, soğuk stresinden her iki domates çeşidinin de etkilendiğini göstermektedir. Glisin betain uygulaması, hem *Gary*'de hem de *T47567*'de soğuk stresinin etkisini belirgin biçimde iyileştirememiştir.

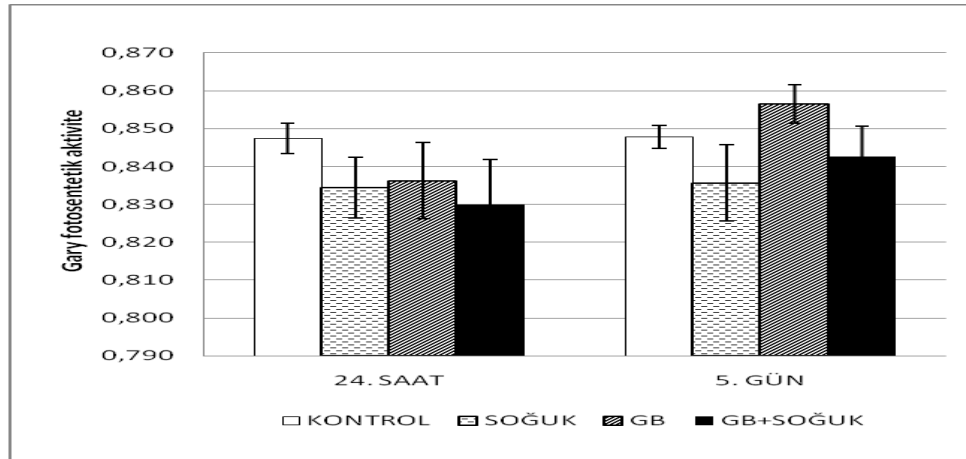
3.2. Fotosentetik Aktivite

Fotosentetik verim bitkilerin soğuk stresinden etkilenme derecelerini gösteren önemli parametrelerden biridir. Fotosentez etkinliğinin soğuk stresinden nasıl etkilendiğini gözlemleyebilmek için duyarlı çeşit *Gary*'de ve dayanıklı çeşit *T47567*'de Fv/Fm oranları stres uygulamasının 0., 1. ve 5. günlerinde ölçülerek kaydedildi (Şekil 3.13 ve 3.14). Fotosentetik verimin duyarlı çeşitte en çok 1. günde etkilendiği gözlemlendi. Kontrol bitkilerine göre; soğuk stresi uygulanan grupta fotosentetik verim 1. gününde, %1,42; 5. günde ise %1,3 oranında azaldı. GB uygulamasından sonra bitkiler GB alınımının arttırılması için literatürde önerildiği gibi 24 saat karanlıkta tutuldu bu nedenle 0. saat değerleri kontrol değerlerinin altında gözlemlendi. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında GB uygulanan grupta Fv/Fm değeri yaklaşık olarak % 2,75 oranında azaldı. Ancak GB uygulanan gruplardaki fotosentetik verim değeri 1. ve 5. günlerde kontrol fotosentetik verim değerlerine ulaştı. *Gary* çeşidinde, GB ve soğuk stresinin birlikte uygulandığı gruplarda soğuk stresinin 5. gününde Fv/Fm değerleri yalnız soğuk stresi uygulanan gruplara göre % 0,6 oranında artış gösterdi. Bu değer kontrol gruplarının Fv/Fm değerlerine çok yakındır ancak GB uygulanan grup ile karşılaştırıldığında %1,63 oranında azalmıştır (Şekil 3.13).

Soğuk stresine dayanıklı çeşidin fotosentetik verimi; kontrol grubuna göre; soğuk stresi uygulanan bitkilerde 1. ve 5. günlerde sırasıyla; %0,48 ve %0,047 oranında azaldı. GB uygulaması yukarıda anlatıldığı gibi yapıldığı için bu gruplarda da 0. gün Fv/Fm değerleri kontrol seviyelerinden oldukça düşük düzeyde belirlendi. *T47567* çeşidinde 0. günde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında GB uygulanan grupta Fv/Fm değeri yaklaşık olarak % 4,38 oranında azaldı. GB ve soğuk stresinin birlikte uygulandığı grupta ise Fv/Fm değeri; GB uygulanan grup ile karşılaştırıldığında 1. ve 5. günlerde sırasıyla %4

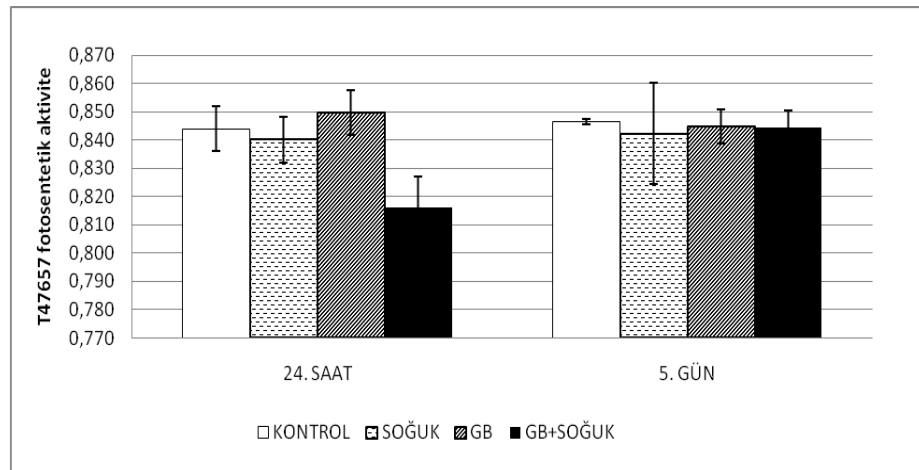
ve %0,12 oranında azaldı. Ancak yalnız soğuk stresi uygulanan grupla karşılaştırıldığında 5. günde % 0,26 oranında arttı (Şekil 3.14).

Şekil 3.13: Gary domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda fotosentetik verim değerlerindeki değişim (Fv/Fm)



	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	0,847±0,004	0,835±0,008	0,836±0,01	0,83±0,012
5. GÜN	0,848±0,003	0,836±0,01	0,857±0,005	0,843±0,008

Şekil 3.14: T47567 domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda fotosentetik verim değerlerindeki değişim (Fv/Fm)



	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	0,844±0,008	0,840±0,008	0,850±0,008	0,816±0,011
5. GÜN	0,846±0,001	0,842±0,018	0,845±0,006	0,844±0,006

Literatürde farklı abiyotik streslerin bitkilerde fotosentez üzerinde oluşturduğu olumsuz etkilerin ekzojen GB uygulaması ile giderilmesine yönelik çeşitli çalışmalar bulun-maktadır. Örneğin Mısır bitkisinde yapılan bir çalışmada, farklı tuz stres koşullarında konsantrasyonlarda tuz stresi ile birlikte GB uygulaması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre GB uygulanmış bitkilerde fotosentetik verim en yüksek seviyede elde edilmiştir. Ayrıca tuz stresi ile birlikte GB uygulanmış bitkilerdeki fotosentetik verim değerlerinin yalnız tuz stresi uygulananlara göre, daha yüksek düzeyde olduğu kaydedilmiştir (Yang and Lu, 2005).

Domates bitkisinde yapılan bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda GB uygulamasının fotosentez verimliliği üzerine etkisi incelenmiş ve sonuçta en yüksek konsantrasyonda (10 mM) GB uygulanmış gruptaki fotosentetik verimin en yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada, soğuk stresine karşı GB'nin fotosentez verimini artırıcı rolü olduğu gösterilmiştir. Ancak bu iyileştirici etkinin zamana bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. Bu çalışmada soğuk stresinin ilk günlerinde GB uygulamasının fotosentetik verim açısından daha etkili olduğu vurgulanmıştır (Park ve ark. 2006). Bizim çalışmamızda belirlediğimiz fotosentetik verim sonuçları ile bu çalışmada elde edilen veriler birbirine paralellik göstermektedir. Çalışmamızda her iki çeşitte de GB uygulamasının fotosentetik verimi arttırdığı kaydedildi. Ayrıca, GB ve soğuk stresi birlikte uygulandığında, hem *Gary* çeşidinde hem de *T47567* çeşidinde, yalnız soğuk stresi uygulanan gruplara göre daha yüksek fotosentez verimi gözlemlendi. Deneme süresi dikkate alındığında soğuk stresi koşullarında, GB uygulamasının fotosentez verimi üzerinde daha iyi bir koruma sağlaması, Park ve ark. (2006) tarafından öngörülen glisin betainin kısa süreli koruyucu etkisini destekler niteliktedir.

3.3. Yaprak Ozmotik Potansiyeli

Yaprakların ozmotik potansiyelindeki değişimlerin belirlenmesi bitkilerin çeşitli streslere karşı verdikleri yanıtların anlaşılması açısından önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda, soğuk stresine duyarlı çeşit *Gary*'de ve dayanıklı çeşit *T47567*'de yaprak ozmotik potansiyel değişimleri soğuk stresi uygulamasının 0., 1. ve 5. günlerinde ölçülerek kaydedildi (Şekil 3.15 ve 3.16). Duyarlı çeşidin yaprak ozmotik potansiyeli, 1. günde kontrol grubu bitkilerine göre tüm uygulama gruplarında artış gösterdi. Yaprak ozmotik potansiyelindeki artış oranı, soğuk stresi uygulanan, yalnız GB uygulanan ve GB ile birlikte soğuk stresi uygulanan grupta sırasıyla; %4,19; %9,36 ve %16,77 olarak kaydedildi.

Gary çeşidinde soğuk stresinin 5. gününde, yalnız soğuk stresi uygulanan bitkilerde yaprak ozmotik potansiyeli %5,76 oranında arttı. Bununla birlikte yaprak ozmotik potansiyeli yalnız GB uygulanan bitkilerde %2,03 oranında azaldı. GB ile birlikte soğuk stresi uygulanan bitkilerde ise yaprak ozmotik potansiyeli %13,56 oranında artış gösterdi (Şekil 3.15).

Şekil 3.15: *Gary* domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda ozmotik potansiyel değerlerindeki değişim (mmol kg^{-1})

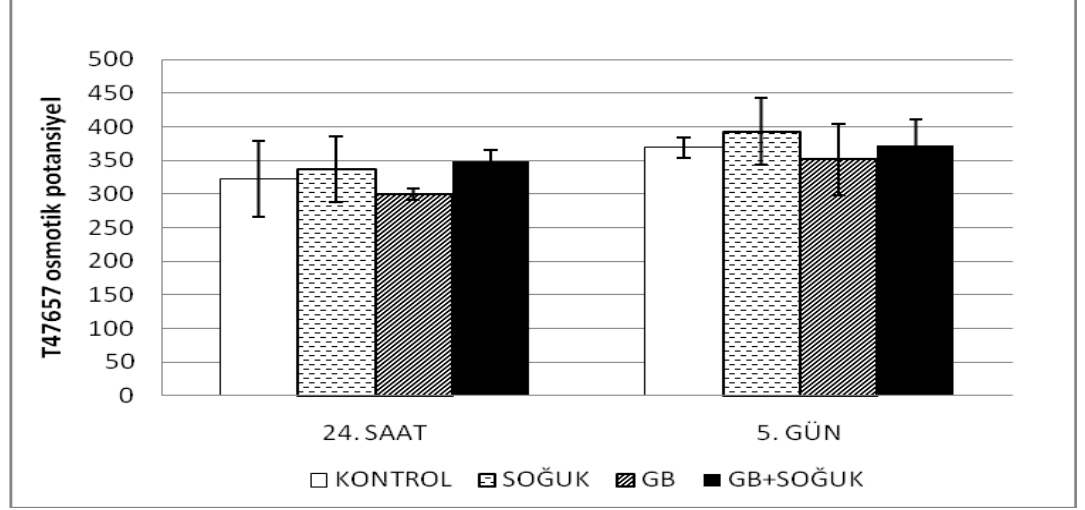


	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	310±23	323±29	339±51	362±15
5. GÜN	295±4	312±9	289±3	335±21

Soğuk stresine dayanıklı çeşitte (*T47567*) yaprak ozmotik potansiyellerindeki değişim incelendiğinde duyarlı çeşitten (*Gary*) farklılık gösterdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; 1. günde yalnız soğuk stresi uygulanan grupta yaprak ozmotik potansiyeli %4,66 oranında artış gösterirken, GB uygulanan grupta %6,83 oranında azaldı. Bununla birlikte, GB ve soğuk stresinin birlikte uygulandığı grupta yaprak ozmotik potansiyeli %8,08 oranında artış gösterdi. Yaprak ozmotik potansiyeli 5. gününde, soğuk stresi uygulanan grupta %6,5 oranında arttı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaprak ozmotik potansiyeli yalnız GB uygulanan grupta %4,88 azalırken, GB ve soğuk stresinin birlikte uygulandığı grupta %0,81 oranında artış görüldü (Şekil 3.16). Son gruptaki ozmotik potansiyel değerlerinin kontrol değerlerine çok yakın olması, düşük sıcaklık koşullarında eksojen GB uygulamasının dayanıklı çeşitte koruyucu etkisini ortaya koymaktadır.

Bitkilerin, çeşitli abiyotik stres koşulları altında en kısa sürede verdikleri yanıtlardan biri yaprak ozmotik potansiyelindeki artıştır. Bu bağlamda, soğuk stresi uygulandığında ilk 24 saatlik dönemde, hem dayanıklı hem de duyarlı domates çeşitlerinin yaprak ozmotik potansiyellerinin artması beklenen bir durumdur. Benzer yanıtlar farklı abiyotik streslerle yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir. Örneğin, tuz stresi uygulanmış domates bitkileri ile yapılan bir çalışmada tuz konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak osmotik potansiyel de artış göstermiştir. Aynı çalışmada tuz stresi uygulanmadan GB uygulaması yapılmış bitkilerde yaprak osmotik potansiyeli GB konsantrasyonundaki artmasına bağlı olarak artmıştır. Tuz stresi ve GB birlikte uygulandığında ozmotik potansiyelde azalma gözlenmiştir (Heuer, 2003).

Şekil 3.16: *T47567* domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda ozmotik potansiyel değerlerindeki değişim (mmol kg^{-1})

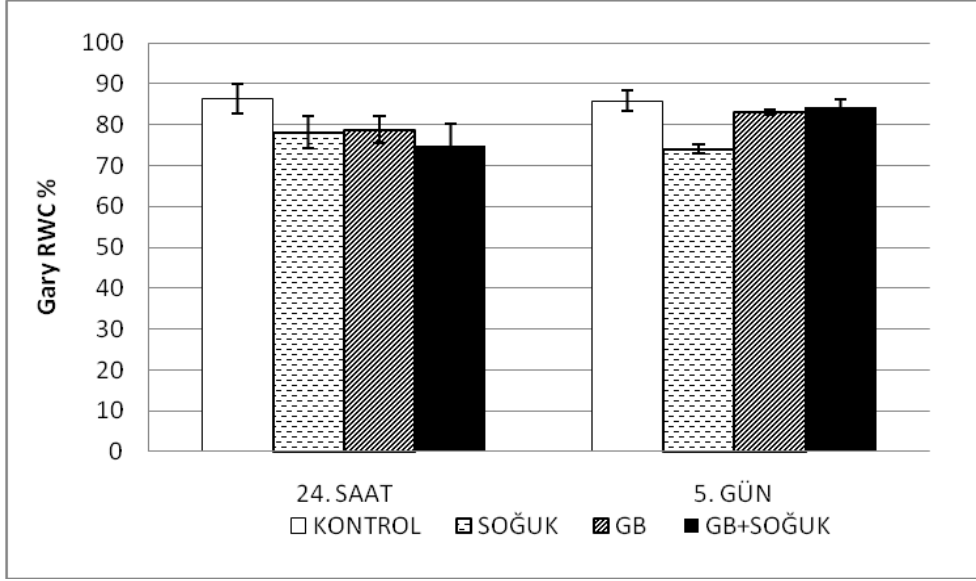


	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	322±56	337±49	300±8	348±18
5. GÜN	369±15	393±50	351±53	372±38

3.4. Bağlı Su İçeriği (RWC)

Soğuk stresine duyarlı çeşit *Gary*'de ve dayanıklı çeşit *T47567*'de yaprak bağlı su içeriği değişimleri soğuk stresi uygulamasının 0., 1. ve 5. günlerinde ölçülerek kaydedildi (Şekil 3.17 ve 3.18). Soğuğa duyarlı çeşitte stres uygulamasının 1. ve 5. günlerindeki RWC sonuçları kontrol grubuna göre belirgin bir azalma gösterdi. Soğuk stresi uygulamasının 1. gününde RWC değerleri yalnız soğuk stresi uygulanan, yalnız GB uygulanan ve GB ile birlikte soğuk stresi uygulanan gruplarda sırasıyla; %9,75, %9,00 ve %13,40 oranlarında azaldı. Bununla birlikte stres uygulamasının 5. gününde RWC değerleri yalnız soğuk stresi uygulanan grupta %13,73; yalnız GB uygulanan grupta %3,12 ve GB ile birlikte soğuk stresi uygulanan grupta %1,64 oranında azaldı (Şekil 3.17).

Şekil 3.17: *Gary* domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda bağıl su içeriği (RWC) değerlerindeki değişim (%)



	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	86,52±3,63	78,08±3,92	78,73±3,26	74,93±5,34
5. GÜN	85,77±2,53	73,99±1,105	83,09±0,52	84,36±1,81

Soğuk stresine dayanıklı çeşit *T47567*'de de soğuk stresinin 1. ve 5. günlerindeki RWC sonuçları duyarlı çeşitteki sonuçlara benzer bir değişim gösterdi. Soğuk stresinin 1. gününde RWC değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yalnız soğuk stresi uygulanan grupta %8,64 oranında azaldı. Yalnız GB uygulanan grupta bu düşüş %5,85 oranında, GB ile birlikte soğuk stresi uygulanan bitkilerde ise %9,44 oranında gerçekleşti. Soğuk stresinin 5. gününde RWC değerlerindeki azalma yalnız soğuk stresi uygulanan grupta %9,44; yalnız GB uygulanan grupta %6,12; GB ile birlikte soğuk stresi uygulanan grupta %4,22 olarak kaydedildi (Şekil 3.18).

Her iki çeşitte de glisin betain uygulamasının soğuk stresine karşı koruyucu etkisi 5. günde daha belirgin olarak görülmektedir. Yaprak bağıl su içeriğindeki değişim, hem duyarlı (*Gary*) çeşitte hem de dayanıklı (*T47567*) çeşitte GB ve soğuk stresinin birlikte uygulandığı gruplarda kontrol değerlerine yakın düzeyde değerlere sahiptir. GB ve soğuk stresinin birlikte uygulandığı grupların RWC değerleri, yalnız soğuk stresi uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında *Gary*

çeşidinde %14 oranında; *T47567* çeşidinde %5,77 oranında artış gösterdi. Mısırdaki yapılan bir çalışmada, 72 saat soğuk stresine maruz kalan bitkilerin RWC oranı toleranltı çeşitte %89; duyarlı çeşitte ise %69 oranında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Equiza M., et. al., 2001).

Şekil 3.18: *T47657* domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda bağıl su içeriği (RWC) değerlerindeki değişim (%)



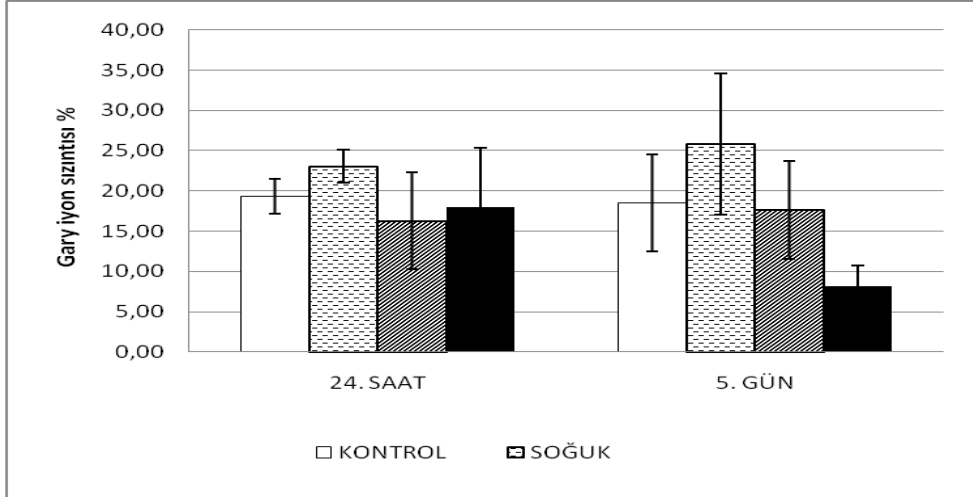
	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. Saat	85,95±3,86	78,52±3,80	80,92±1,05	77,83±2,67
5. Gün	85,74±4,44	77,65±5,69	80,49±6,05	82,13±3,18

3.5. Yaprak Elektriksel Sızıntı Ölçümleri

Soğuk stresinin hücre düzeyinde oluşturduğu en önemli hasarlardan biri hücre zarının bütünlüğünün bozulmasıdır. Hücre zarının bütünlüğünün bozulması elektrolit (iyon) sızıntısına neden olduğu için yaprakların elektrik iletkenliği değerleri değişir. Yapraklarda elektriksel iletkenliğin değişimin göreceli olarak tespit edilerek soğuk stresinin oluşturduğu hasar miktarı tayin edilebilir. Çalışmamızda, soğuk stresine duyarlı çeşit *Gary*'de ve dayanıklı çeşit *T47567*'de yaprak elektriksel iletkenlik değerlerindeki değişimler soğuk stresi uygulamasının 0., 1. ve 5. günlerinde ölçülerek kaydedildi (Şekil 3.19 ve 3.20).

Duyarlı çeşitte soğuk stresi uygulamasının her iki gününde de yalnız soğuk stresi uygulanan gruplarda, elektriksel iletkenlik değerleri kontrol gruplarına göre belirgin bir artış gösterdi. Bu artış 1. günde %16,33 oranında, 5. günde ise %28,28 oranında belirlendi. Yalnız GB uygulaması yapılan gruplarda elektriksel iletkenlik değerleri kontrol gruplarına göre 1. ve 5. günlerde sırasıyla %15,64 ve %4,59 oranlarında azaldı. GB ve soğukun birlikte uygulandığı gruplarda 1. ve 5. günlerde yaprak elektriksel iletkenlik değerleri kontrol grubu bitkilerine göre sırasıyla %7,1 ve %55,81 oranında azaldı (Şekil 3.17).

Şekil 3.19: Gary domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda yaprak elektriksel iletkenlik değerlerindeki değişim (%)



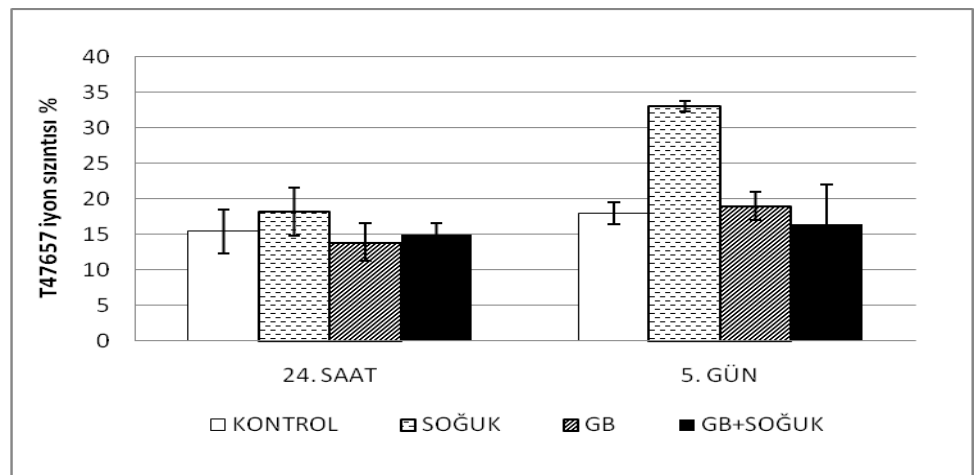
	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	19,31±2,16	23,08±2,02	16,29±6,02	17,94±7,42
5. GÜN	18,51±6,02	25,81±8,77	17,66±6,07	8,18±2,5

Soğuğa dayanıklı T47567 çeşidimizde de soğuk stresinin tek başına uygulandığı gruplarda elektriksel iletkenlik belirgin bir biçimde artış gösterdi. Soğuk stresinin 1. gününde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yapraklardaki elektriksel iletkenlik değişimi, yalnız soğuk stresi uygulanan grupta % 18,36 artış gösterdi. Bununla birlikte elektriksel iletkenlik değerleri yalnız GB uygulanan grupta ve GB ile birlikte soğuk stresi uygulanan grupta sırasıyla, %9,93 ve %3,24 oranında azaldı. Dayanıklı çeşitte soğuk stresi uygulamasının 5. gününde ise,

yalnız soğuk stresi uygulanan gruplarda elektriksel iletkenlik %84,53 oranında ve yalnız GB uygulanan grupta %5,62 oranlarında artış gösterdi. GB ile birlikte soğuk stresi uygulanan grupta ise yaprak elektriksel iletkenliği %8,46 oranında azaldı.

Yaprak elektronik sızıntı değerlerindeki değişim sonuçları her iki çeşitte yalnız soğuk stresinin uygulandığı gruplarda stres etkisini belirgin bir biçimde göstermektedir. Sonuçlarımızda soğuk stresinin iletkenliği önemli şekilde arttırdığı görülmektedir. Özellikle 5. gün sonuçları incelendiğinde elektrolit (iyon) sızıntısının duyarlı çeşitte %28,28 dayanıklı çeşitte ise %84,53 oranında arttığı görüldü. GB uygulamasının ve GB ile birlikte soğuk stresi uygulamasının yapraklardaki elektrik iletkenliğinin korunması için önemli olduğu özellikle stres uygulamasının 5. günde her iki çeşitte de elektriksel iletkenlik değerlerinin azalması ile belirlendi. Bu durum, GB'nin membran kararlılığını koruduğunu gösteren literatürdeki birçok çalışma ile uyum göstermektedir. Örneğin, Park ve ark tarafından (2006) domates bitkisinde yapılan bir çalışmada, düşük sıcaklık stresi koşullarında, GB uygulamasının elektrik iletkenliğini koruduğu saptanmıştır.

Şekil 3.20: T47567 domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda yaprak elektriksel iletkenlik değerlerindeki değişim (%)

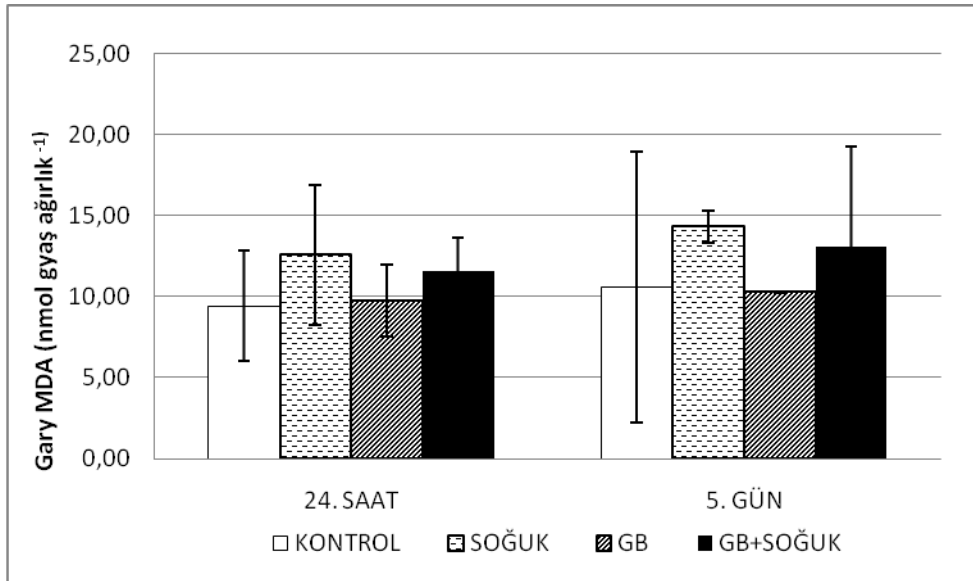


	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. Saat	15,41±3,11	18,24±3,40	13,88±2,62	14,91±1,73
5. Gün	17,97±1,55	33,11±0,74	18,98±2,005	16,45±5,52

3.6. Lipid Peroksidasyonu

Yapraklardaki lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için malondialdehid (MDA) miktarındaki değişimler soğuk stresine duyarlı çeşit *Gary*'de ve dayanıklı çeşit *T47567*'de soğuk stresi uygulamasının 0., 1. ve 5. günlerinde ölçülerek kaydedildi (Şekil 3.21 ve 3.22). Soğuğa duyarlı bitkilerin 1. Günde MDA sonuçları kontrole göre karşılaştırıldığında yalnız soğuk stres uygulanan grupta %83,48; GB uygulanan grupta %19,30 ve GB ile birlikte soğuk stresinin uygulandığı grupta %47,22 oranlarında arttı. Aynı uygulama gruplarına ait 5. gün MDA değerleri sırasıyla kontrol gruplarına göre %115,33, % 48 ve %31,37 olarak artış gösterdi. GB uygulanan soğuk stresine duyarlı gruplarda soğuk stresi bitkileri daha az etkilemiştir.

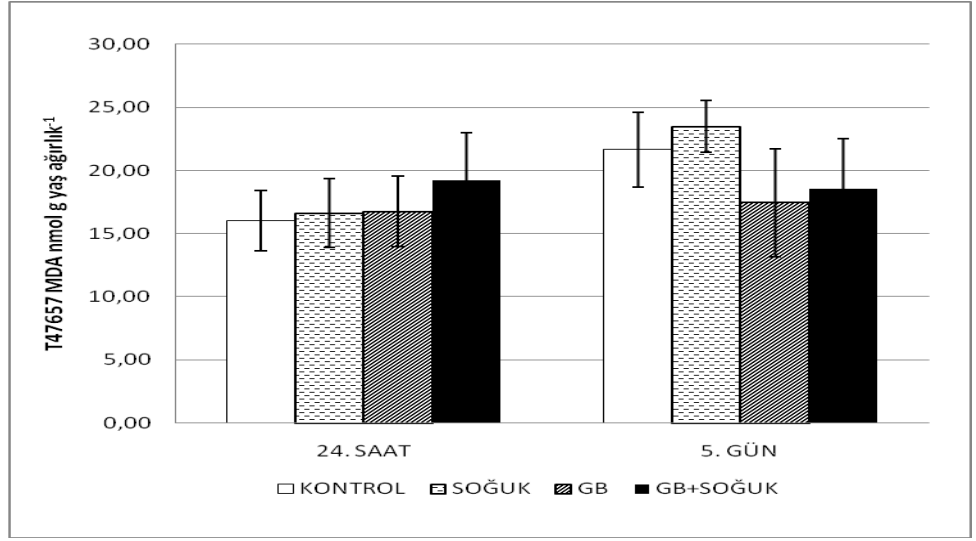
Şekil 3.21: *Gary* domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda lipid peroksidasyonu (MDA miktarı) sonuçları (nmol g yaş ağırlık⁻¹)



	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	9,42±3,43	12,55±4,29	9,75±2,24	11,56±2,1
5. GÜN	10,57±8,35	14,29±1,01	10,25±0,03	13,06±6,16

Soğuğa dayanıklı olan çeşidin MDA miktarları 0. saat, 12. saat, 24. saat ve 5. günde belirlenmiştir. Sonuçlar; kontrol grubuna göre soğuğa maruz kalan bitkilerin MDA değerlerine göre sırasıyla; %6,44, %3,68 ve %8,40 oranında artmıştır. GB uygulanan gruplarda ise 12. saatteki artış önemli değildir. 24. Saatte %14,72; 5. Günde ise %6,42 oranında artış gözlenmiştir (Şekil 3.20).

Şekil 3.22: T47567 domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması, GB uygulaması, GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda lipid peroksidasyonu (MDA miktarı) sonuçları (nmol g yaş ağırlık⁻¹)



	KONTROL	SOĞUK	GB	GB+SOĞUK
24. SAAT	16,03±2,38	16,62±2,72	16,78±2,8	19,25±3,71
5. GÜN	17,09±1,23	23,48±2,04	17,45±4,26	18,57±3,98

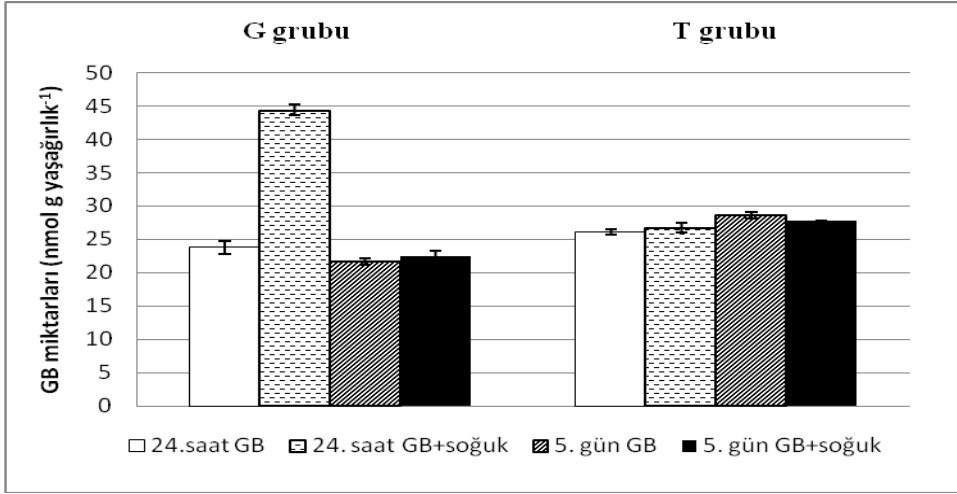
Chen (2000) tarafından yapılan bir çalışmada dışarıdan GB uygulanmış mısır bitkisi 4⁰C soğuk stresine maruz bırakılmıştır. Sonuçlar; GB uygulanmadan strese maruz kalan bitkilerin MDA miktarlarının GB ile birlikte soğuk uygulananlara göre daha yüksek olduğunu gösterir. Membran yapısının kararlılığının belirlenmesinde iki önemli parametre olan elektriksel iletkenlik ve MDA sonuçları birbiriyle örtüşmektedir. Her iki parametre soğuk stresine maruz kalan bitkilerin kararlılığının azaldığını gösterir. Ama iletkenlik 24. Saatte 5. güne göre daha fazla etkilenirken, MDA sonuçlarına göre soğuk stresinin membran bütünlüğü üzerindeki olumsuz etkisi giderek artış gösterdi.

3.7. Glisin betain miktarı

Çalışmamızda domates yapraklarına uygulanan yapraklarda soğuk uygulamasının 24. saatindeki ve 5. günündeki GB değeri belirlenmiştir. GB uygulaması sonuçları bitkilerin GB'yi yapraklarından aldığını göstermiştir. Soğuk stresine duyarlı grupta, GB uygulanmış ve soğukta tutulmuş bitkilerdeki GB miktarı normal şartlarda tutulmuş bitkilerdeki miktara göre 24. Saat ve 5. Günde sırasıyla %99,62 ve 3,77 oranında artmıştır.

Soğuğa dayanıklı çeşitte ise, soğuk stresi uygulanmış bitkilerin GB miktarı kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında 24. Saate ve 5. Günde sırasıyla; %2,53 ve 52,39 oranında azaldığı görülmüştür.

Şekil 3.23: Gary ve T47567 domates çeşitlerinde glisin betain (GB) uygulaması yapılan gruplarda soğuk stresi uygulamasının 1. ve 5. günündeki glisin betain miktarları (nmol g yaş ağırlık⁻¹)



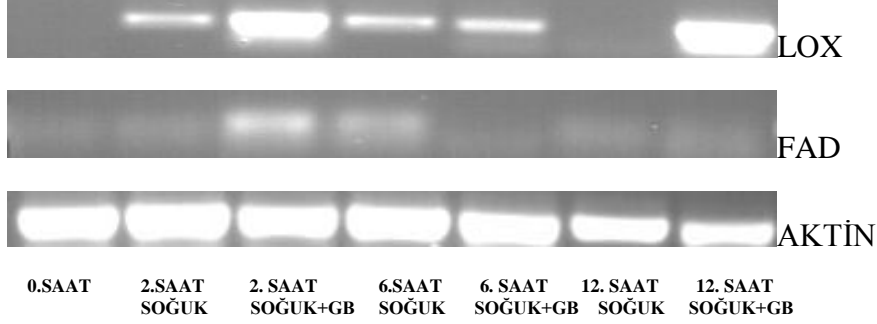
	G grubu	T grubu
24. saat GB	23,82±0,99	26,13±0,40
24. saat GB+soğuk	44,42±0,79	26,79±0,70
5. gün GB	21,73±0,49	28,63±0,52
5. gün GB+soğuk	22,55±0,68	27,75±0,09

3.8 LOX ve FAD Genlerinin İfadesindeki Değişimlerin Belirlenmesi

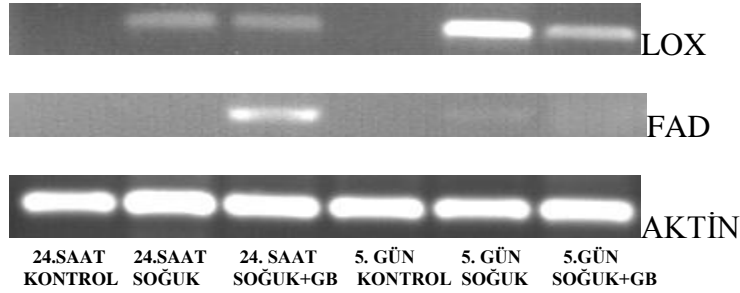
Tez projemiz kapsamında, soğuk stresinin ve soğuk stresi ile birlikte glisin betain uygulamasının, *Gary* ve *T47567* domates çeşitlerinde kısa (0., 2. 6. ve 12. saatlerde) ve uzun sürede (1. ve 5. günlerde) LOX ve FAD genlerinin ifadeleri üzerine etkisi de incelendi. RT-PCR ile belirlenen gen ifadesi değişim profillerine ait jel sonuçları şekiller 3.24, 3.25, 3.26 ve 3.27 'de verildi. Gen ifadelerinin standardizasyonu ve cDNA miktarının eşit yüklendiğini teyit etmek için referans gen olarak “Aktin” geni kullanıldı. Jel profilleri incelendiğinde her iki çeşitte de soğuk stresi ve soğuk stresi ile birlikte glisin betain uygulamasının gen ifadesi değişimlerinde farklılıklara neden olduğu görüldü.

Gary'de çeşidinde hem kısa hem de uzun dönemde LOX geninin ifadesi FAD genine göre daha belirgin bir biçimde artış gösterdi (Şekil 3.24 ve 3.25). Soğuk stresi uygulamasının 2. saatinde hem soğuk stresi uygulamasında hem de soğuk stresi ile birlikte glisin betain uygulamasında LOX geninin ifadesi artış gösterdi. Ancak bu artış soğuk stresi ile glisin betain uygulanan grupta daha belirgin ortaya çıktı. Soğuk stresi uygulamasının 6. saatinde LOX ifadesi 2. saate göre azalma gösterdi. FAD profilleri incelendiğinde *Gary* çeşidinde 2. saatte soğuk stresi ile birlikte glisin betain uygulamasında artış gözlemlendi. Diğer saatlerde FAD geninin ifadesinde belirgin bir değişim gözlenmedi. LOX geninin 1. ve 5. günlerdeki ifade değişim profilleri incelendiğinde 1. günde hem soğuk uygulaması yapılan grupta hem de soğuk stresi ile birlikte glisin betain uygulanan grupta ifade değişimi aynı derecedeydi. Denemenin 5. gününde her iki uygulamada da LOX ifadesi artarken bu artış yalnız soğuk uygulanan grupta daha belirgin ortaya çıktı. FAD geninin ifadesi incelendiğinde 1. günde soğuk stresi ile birlikte glisin betain uygulanan grupta artış gözlemlendi.

Şekil3.24: *Gary* domates çeşidinde soğuk uygulaması ve GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kısa dönemde (0, 2, 6, 12 saat) LOX ve FAD72 genlerinin ifade değişimlerinin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi. Standardizasyon için referans gen olarak aktin geni kullanıldı



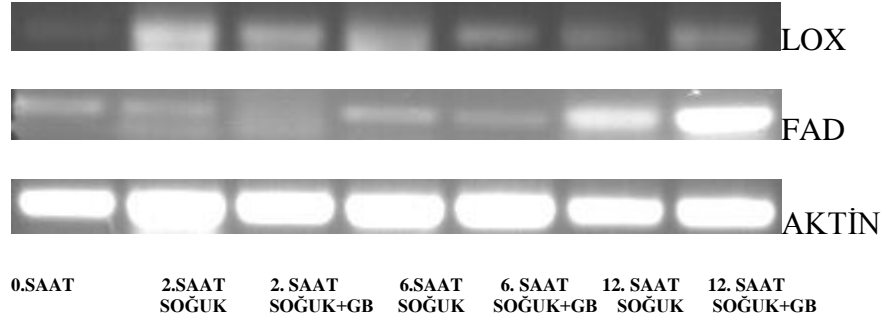
Şekil3.25: *Gary* domates çeşidinde soğuk uygulaması ve GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda uzun dönemde (1. ve 5. günler) LOX ve FAD72 genlerinin ifade değişimlerinin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi. Standardizasyon için referans gen olarak aktin kullanıldı.



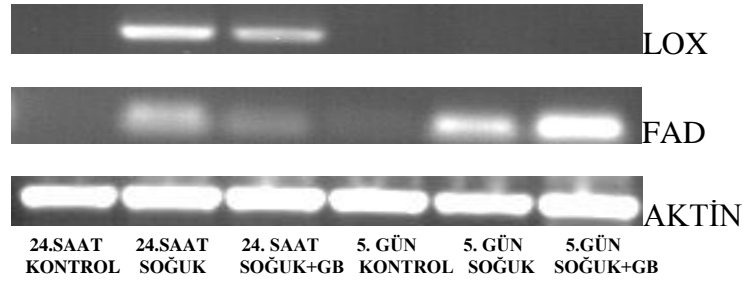
Çalışmamızda kullandığımız ikinci çeşit *T47657*'de LOX ve FAD genlerinin değişim profilleri incelendiğinde kısa ve uzun dönemde *Gary* çeşidine göre farklı bir profil gözlemlendi (Şekil 3.26 ve 3.27). LOX genin stres uygulamasının 2. saatinden itibaren hem soğuk uygulanan hem de soğuk stresi ile birlikte glisin betain uygulanan gruplarda artış gösterdi. Bu değişim 1. günde de devam etti ancak 5. günde gen ifadesinde herhangi bir artış gözlemlenmedi. FAD geninin belirlenimi incelendiğinde soğuk stresine yanıtta bu çeşitte bu genin daha belirgin bir ifade değişimi gösterdiği görüldü. FAD geninin ifadesi soğuk stresi uygulanan ve soğuk stresi ile birlikte glisin betain uygulanan gruplarda 2. ve 6. saatlerde benzer düzeylerde gözlemlenirken 12. Saatte özellikle soğuk stresi ile

birlikte glisin betain uygulanan grupta belirgin bir artış saptandı. FAD geninin ifadesi, 5. günde de soğuk stresi uygulanan ve soğuk stresi ile birlikte glisin betain uygulanan gruplarda artış gösterdi.

Şekil3.26: *T47657* domates çeşidinde soğuk uygulaması ve GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda kısa dönemde (0, 2, 6, 12 saat) LOX ve FAD72 genlerinin ifade değişimlerinin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi. Standardizasyon için referans gen olarak aktin geni kullanıldı.



Şekil3.27: *T47657* domates çeşidinde kontrol, soğuk uygulaması ve GB+soğuk uygulaması yapılan gruplarda uzun dönemde (1. ve 5. günler) LOX ve FAD72 genlerinin ifade değişimlerinin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi. Standardizasyon için referans gen olarak aktin kullanıldı.



Her iki çeşitte de kısa ve uzun dönemde gen ifadesi değişim profilleri belirgin farklılıklar göstermektedir. Bu durum duyarlı ve dayanıklı çeşitlerin soğuk stresine verdiği yanıtlar açısından ele alındığında *Gary*'de LOX geninin ifadesi ile ilişkili süreçlerin aktif hale geldiğini, *T47567*'de ise FAD genin ile ilişkili yanıtların aktif olduğunu göstermektedir. Soğuk stresine verilen yanıtlar açısından, tüm parametrelerle birlikte değerlendirdiğimizde LOX ve FAD genlerinin ifade değişim profilleri her iki çeşitte de belirgin bir uyum göstermektedir.

KAYNAKLAR

Abak, K. ve Güler (Dasgan), H.Y., 1994, Pollen fertility and the vegetative growth of various eggplant genotypes under low temperature greenhouse conditions, *Acta Horticulturae*, 366, 85-91 pp.

Abak, K., Güler (Dasgan), H. Y., ve Baytorun, N., 1995, A comparative study in heated and unheated plastic greenhouses of the Mediterranean Coastal Region of Turkey: Tomato plant growth, yield dynamics, crop quality and fuel consumption, *Acta Horticulturae*, 412, 335-341 pp.

Agarwal, M. et al., 2006, A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance, *J. Biol. Chem.*, 281, 37636–37645pp.

Arakawa T. and Timasheff S.N., 1983, Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 224, 169–177pp.

Arimura, G.-i., Matsui K. and Takabayashi, J., 2009, Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions, *Plant Cell Physiol.* 50, 911–923 pp.

Aroca R., Tognoni F., Irigoyen J.J., Sanchez-Diaz M. and Pardossi A., 2001, Different root low temperature response to two maize genotypes differing in chilling sensitivity. *Plant Physiology and genotypes differing in chilling sensitivity. Plant Physiology and Biochemistry* 39, 1067–1073pp.

Behzadipour, M., Ratajczak, R., Faist, K., Pawlitschek, P., Tremolie`res, A. and Kluge, M., 1998, Phenotypic adaptation of tonoplast fluidity to growth temperature in the CAM plant *Kalanchoe daigremontiana* Ham. et Per. Is accompanied by changes in the membrane phospholipid and protein composition, *Journal of Membrane Biology*, 166, 61–70pp.

Benedict, C. et al., 2006, Consensus by democracy. Using meta-analyses of microarray and genomic data to model the cold acclimation signaling pathway in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 141, 1219–1232pp.

Bessie`res AM, Gibon Y, Lefeuvre JC and Larher F., 1999, A single step purification for glycine betaine determination in plant extracts by isocratic HPLC, *J Agric Food Chem*, 47, 3718–22pp.

KAYNAKLAR (devam)

- Blée, E.**, 1998, Phytooxylipins and plant defense reactions, *Prog. Lipid Res.* 37, 33–72 pp.
- Blokhina O., Virolainen E. and Fagerstedt K.**, 2003, Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review, *Ann. Bot. – London* 91, 179–194 pp.
- Borsani, O. et al.**, 2005, Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*, *Cell*, 123, 1279–1291pp.
- Brash, A. R.**, 1999, Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate, *J. Biol. Chem.*, 274, 23679–23688 pp.
- Brüggemann, W., Klauke, S. and Maas-Kantel, K.**, 1994, Long-term chilling of young tomato plants under low light. V. Kinetic and molecular properties of two key enzymes of the Calvin cycle in *Lycopersicon esculentum* Mill. And *L. peruvianum* Mill., *Planta*, 194, 160–168pp.
- Campos PS and Thi ATP**, 1997, Effects of an abscisic acid pretreatment on membrane leakage and lipid composition of *Vigna unguiculata* leaf discs subjected to osmotic stress, *Plant Sci* 130:11–18pp.
- Campos, P. S., Quartin, V., Ramalho, J. C. and Nunes, M. A.**, 2003, Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of CoVeia SP. Plants, *Journal of Plant Physiology*, 160, 283–292pp.
- Chen W.P., Li P.H. and Chen T.H.H.**, 2000, Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L., *Plant, Cell and Environment*, 23, 609–618pp.
- Chen, G., Hackett, R., Walker, D., Taylor, A., Lin Z. and Grierson, D.**, 2004, Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavour compounds, *Plant Physiol.* 136, 2641–2651 pp.
- Chinnusamy, V. et al.**, 2003, ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*, *Genes Dev.*, 17, 1043–1054pp.
- Chinnusamy, V., Zhu, J. and Zhu, J.**, 2007, Cold stress regulation of gene expression in plants

KAYNAKLAR (devam)

Collodos R. et. at., 2006, A light-sensitive mechanism differently regulates transcription and transcript stability of x3 fatty-acid desaturases (FAD3, FAD7 and FAD8) in soybean photosynthetic cell suspensions, *Febs Letters*, 580, 4934-4940pp.

Coughlan S.J. and Heber U., 1982, The role of glycinebetaine in the protection of spinach thylakoids against freezing stres, *Planta*, 156, 62–69pp.

Creelman RA, and Mullet, JE, 1995, Jasmonic acid distribution and action in plants; regulation during development and response to biotic and abiotic stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4114–4119 pp.

Croft, KPC, Jüttner F, and Slusarenko, AJ, 1993, Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*, *Plant Physiol.*, 101, 49–62 pp.

Dasgan, H.Y., Abak, K. ve Baytorun, N., 1994. İki farklı gece sıcaklığına sahip serada yetisen domates bitkilerinin çiçek tozu canlılık ve çimlenmeleri. Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Adana-1995, Cilt II, S.12-16 pp.

Dasgan, H.Y., Özdoğan, A.O., Abak, K. ve Kaftanoğlu, O., 1999. Comparison of honey bees (*Apis mellifera* L.) and Bumble bees (*Bombus terrestris*) as pollinators for melon (*Cucumis melo* L.) grown in greenhouse,. *Acta Horticulturae*, 492, 131-134 pp.

Davy de Virville, J., Cantrel, C., Bousquet, A. L., HoVelt, M., Tenreiro, A. M., Vaz Pinto, V., Arrabaca, J. D., Caiveau, O., Moreau, F. and Zachowski, A., 2002, Homeoviscous and functional adaptations of mitochondrial membranes to growth temperature in soybean seedlings, *Plant, Cell and Environment*, 25, 1289–1297pp.

Demiral, T. and Turkan I., 2005, Comparative lipid peroxidation, antioxidant defence systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 53(3) 247-257.

Deshnium, P., Gombos, Z., Nishiyama, Y. and Murata, N., 1997, The action in vivo of glycine betaine in enhancement of tolerance of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 to low temperature, *J. Bacteriol.*, 179, 339-344pp.

KAYNAKLAR (devam)

- Dong, C.H. et al.**, 2006, A putative Arabidopsis nucleoporin AtNUP160 is critical for RNA export and required for plant tolerance to cold stress, *Mol. Cell. Biol.*, 26, 9533–9543pp.
- Dong, C.H. et al.**, 2006, The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103, 8281–8286pp.
- Dowgert, M. F. and Steponkus, P. L.**, 1984, Behavior of the plasma membrane of isolated protoplasts during a freeze-thaw cycle, *Plant Physiology* 75, 1139–1151pp.
- Ensminger, I., Busch, F. and Huner, N. P. A.**, 2006, Photostasis and cold acclimation: Sensing low temperature through photosynthesis, *Physiologia Plantarum*, 126, 28–44pp.
- Equiza M., Mirave J. and Tognett J.**, 2001, Morphological, anatomical, and physiological responses related to differential shoot vs root growth inhibition at low temperature in spring and winter wheat. *Ann. Bot.* 87: 67–76pp.
- Ferrie, B.J., Beaudoin, N., Burkhart, W., Bowsher, C.G. and Rothstein, S.J.**, 1994, The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening, *Plant Physiol.*, 106, 109–118 pp.
- Feussner and C. Wasternack**, 2002, The lipoxygenase pathway, *Annu Rev Plant Biol*, 53, 275–297 pp.
- Fournier, J, Pouénat, M, Rickauer, M, Rabinovitch-Chable, H, Rigaud M, and Esquerré-Tugayé, M.**, 1993 Purification and characterisation of elicitor-induced lipoxygenase in tobacco cells, *Plant J.* 3, 63–70 pp.
- Fowler, S. and Thomashow, M.F.**, 2002, Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway, *Plant Cell*, 14, 1675–1690pp.
- Fukutaku, Y. and Yamada, Y.**, 1984, Source of proline nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*) Part II. Fate of ¹⁵N-labeled protein, *Plant Physiology*, 61, 622–628 pp.
- Funk, C.D.**, 1996, The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice, *Biochim Biophys Acta* 1304, 65–84 pp.

KAYNAKLAR (devam)

Furbank, R. T., Foyer, C. H. and Walker, D. A., 1987, Regulation of photosynthesis in isolated spinach chloroplasts during orthophosphate limitation, *Biochimica Biophysica Acta*, 894, 552–561pp.

Gibson, S., Arondel, V., Iba, K. and Somerville, C., 1994, Cloning of a temperature regulated gene encoding a chloroplast omega-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiology*, 106, 1615–1621pp.

Gillmor, S. A., Villasenor, A., Fletterick, R., Sigal, E. and Browner, M. F., 1997, The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity, *Nat. Struct. Biol.*, 4, 1003–1009 pp.

Gombos, Z., Wada, H. and Murata, N., 1994, The recovery of photosynthesis from low temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane lipids: A mechanism of chilling tolerance, *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91, 8787–8791pp.

Gonzales-Aguilar, G.A., 2004, Pepper. In: K.C. Gross, C.Y. Wang, and M. Saltveit (eds.). *The commercial storage of fruits, vegetables and florist and nursery stocks*. Agr. Hdbk. No. 66, US Dept.Agr., Washington, DC. May 2007.

Gorham J., 1995, Betaines in higher plants – biosynthesis and role in stress metabolism, In *Amino Acids and Their Derivatives in Higher Plants* (ed. R.M. Wallsgrave), Cambridge University Press, Cambridge, 171–203pp.

Griffiths, A., Barry, C., Alpuche-Solis A. and Grierson, D., 1999, Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening, *J. Exp. Bot.* 50, 793–798 pp.

GriYth, M., Elfman, B. and Camm, E. L., 1984, Accumulation of plastoquinone A during low temperature growth of winter rye, *Plant Physiology*, 74, 727–729pp.

Gusta, L. V., Wisniewski, M., Nesbitt, N.T. and Gusta, M. L., 2004, The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves, *Plant Physiology*, 135, 1642–1653pp.

H.H. Chen and P.H. Li, 1980, Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing *Solanum* species, *Plant Physiol.*, 65, 1146–1148pp.

KAYNAKLAR (devam)

Hannah, M.A. et al., 2005, A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*, PLoS Genet., 1, e26, 180–196pp.

Harwood, J. L., 1980, Plant acyl lipids: structure, distribution and analysis, in: P.K. Stumpf, E.E. Conn (Eds.), *The Biochemistry of Plants*, cilt. 4, Academic Press, New York, 1–55 pp.

Havaux, M. and Niyogi, K. K., 1999, The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism, *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96, 8762–8767pp.

Heitz T, Bergey DR, and Ryan CA, 1997, A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate, *Plant Physiol.*, 114:1085–1093 pp.

Hendrickson, L., Vlckova, A., Selstam, E., Huner, N., Oquist, G. and Hurry, V., 2006, Cold acclimation of the *Arabidopsis* *dgd1* mutant results in recovery from photosystem I-limited photosynthesis, *FEBS Letters*, 580, 4959–4968pp.

Heuer, B., 2003, Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants, *Plant Sci.*, 165, pp. 693–699 pp.

Hildebrand, D.F., Afithile M., and Fukushige, H., 2000, Lipids and signalling: further reactions for oxylipin production, *Biochem. Soc. Trans.* 28, 847–849 pp.

Hoagland, D. R. and Arnon, D. I., 1950, The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular 347 1–32.

Horiguchi, G., Kodama, H., Nishimura, M., and Iba, K., 1996, [Role of \$\omega\$ -3 fatty acid desaturases in the regulation of the level of trienoic fatty acids during leaf cell maturation](#), *Planta*, 199, 439–442pp.

<http://faostat.fao.org>

Huner, N. P. A., Öquist, G., Hurry, V. M., Krol, M., Falk, S. and GriYth, M., 1993, Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants, *Photosynthesis Research*, 37, 19–39pp.

Hurry, V. M., Gardeström, P. and Öquist, G., 1993, Reduced sensitivity to photoinhibition following frost-hardening of winter rye is due to increased phosphate availability, *Planta*, 190, 484–490pp.

KAYNAKLAR (devam)

Hurry, V., Strand, A., Furbank, R. and Stitt, M., 2000, The role of inorganic phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperature is revealed by the pho mutants of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal*, 24, 383–396pp.

Hutchison, R. S., Groom, Q. and Ort, D. R., 2000, Differential effects of chilling induced photooxidation on the redox regulation of photosynthetic enzymes, *Biochemistry*, 39, 6679–6688pp.

Iba, K., Gibson, S., Nishiuchi, T., Fuse, T., Nishimura, M., Arondel, V., Hugly, S., and Somerville, C., 1993, A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the fad7 mutant of *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.*, 268, 24099–24105pp.

Ivanov, A. G., Hendrickson, L., Krol, M., Selstam, E., Oquist, G., Hurry, V. and Huner, N. P. A., 2006, Digalactosyl-diacylglycerol deficiency impairs the capacity for photosynthetic intersystem electron transport and state transitions in *Arabidopsis thaliana* due to photosystem I acceptor-side limitations, *Plant and Cell Physiology*, 47, 1146–1157pp.

Ivanov, A. G., Morgan, R. M., Gray, G. R., Velitchkova, M. Y. and Huner, N. P. A., 1998, Temperature/light dependent development of selective resistance to photoinhibition of photosystem I, *FEBS Letters*, 430, 288–292pp.

J.L. Harwood, 1980, Plant acyl lipids: structure, distribution and analysis, in: P.K. Stumpf, E.E. Conn (Eds.), *The Biochemistry of Plants*, 4th ed., Academic Press, New York, 1–55 pp.

Jones-Rhoades, M.W. et al., 2006, MicroRNAs and their regulatory roles in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 19–53pp.

Kadpel, R. and Rao, N., 1985, Alterations in the biosynthesis of proteins and nucleic acids in finger millet (*Eleusine coracana*) seedlings during water stress and the effect of proline on protein biosynthesis, *Plant Science*, 40, 73–79 pp.

Kamata, T. and Uemura, M., 2004, Solute accumulation in heat seedlings during cold acclimation: Contribution to increased freezing tolerance, *Cryo Letters*, 25, 311–322pp.

KAYNAKLAR (devam)

- Kaplan, F. and Guy, C. L.** 2004, beta-Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock, *Plant Physiology*, 135, 1674–1684 pp.
- Kaplan, F., Kopka, J., Sung, D. Y., Zhao, W., Popp, M., Porat, R. and Guy, C. L.**, 2007, Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content, *Plant Journal*, 50, 967–981 pp.
- Kim, J.C. et al.**, 2001, A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants, *Plant J.*, 25, 247–259pp.
- Kim, T. E., Kim, S. K., Han, T. J., Lee, J. S. and Chang, S. C.**, 2002, ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum*), *Physiologia Plantarum*, 115, 370–376 pp.
- Kishitani S., Watanabe K., Yasuda S., Arakawa K. and Takabe T.**, 1994, Accumulation of glycinebetaine during cold acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants, *Plant, Cell and Environment*, 17, 89–95pp.
- Klotke, J., Kopka, J., Gatzke, N. and Heyer, A. G.**, 2004, Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation—evidence for a role of raffinose in cold acclimation, *Plant, Cell and Environment*, 27, 1395–1404 pp.
- Kodama, H., Horiguchi, G., Nishiuchi, T., Nishimura, M. and Iba, K.**, 1995, Fatty acid Desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves, *Plant Physiology*, 107, 1177–1185pp.
- Kolomiets, M.V., Hannapel, D.J., Chen, H., Tymeson M. and Gladon, R.J.**, 2001, Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development, *Plant Cell*, 13, 613–626 pp.
- Korn, M., Peterek, S., Mock, H. P., Heyer, A. G. and Hinch, D. K.**, 2008, Heterosis in the freezing tolerance, and sugar and flavonoid contents of crosses between *Arabidopsis thaliana* accessions of widely varying freezing tolerance, *Plant Cell and Environment* 31, 813–827 pp.
- Koster, K. L. and Lynch, D. V.**, 1992, Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of Puma rye, *Plant Physiology* 98, 108–113 pp.

KAYNAKLAR (devam)

- Koster, K. L. and Lynch, D. V.**, 1992, Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of Puma rye, *Plant Physiology*, 98, 108–113pp.
- Kotzabasis, K., Christakis-Hampsas, M. D. and Roubelakis-Angelakis, K. A.**, 1993, A narrow-bore HPLC method for the identification and quantitation of free, conjugated, and bound polyamines, *Analytical Biochemistry*, 214, 484–489 pp.
- Kourtchenko, O., Andersson, MX, Hamberg, M, Ä. Brunnström, Ä., Göbel, C. McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Feussner I., and Ellerström M.**, 2007, Oxophytodienoic acid-containing galactolipids in Arabidopsis: jasmonate signalling dependence, *Plant Physiol.*, 145, pp. 1658–1669 pp.
- Lee, B.H. et al.**, 2006, STABILIZED1, a stress-upregulated nuclear protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in Arabidopsis, *Plant Cell*, 18, 1736–1749pp.
- Lee, B-H. et al.**, 2005, The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1, *Plant Cell*, 17, 3155–3175pp.
- Lee, H. et al.**, 2001, The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning, *Genes Dev.*, 15, 912–924pp.
- Lee, H. et al.**, 2002, LOS2, a genetic locus required for cold responsive transcription encodes a bi-functional enolase, *EMBO J.*, 21, 2692–2702pp.
- Leverentz, MK., Wagstaff, C., Rogers, HJ., Stead, AD., Chanasut, U., Silkowski, H., Thomas, H., Weichert, H., Feussner I. and Griffiths, G.**, 2002, Characterisation of a novel lipoxygenase-independent senescence mechanism in *Alstroemeria peruviana*, *Plant Physiol.* 130, 1–11 pp.
- Levitt, J.** 1980, ‘‘Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses’’. 2nd edn., Academic Press, New York.
- Liavonchanka A. and Feussner, I.**, 2006, Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis, *J. Plant Physiol.*, 163, 348–357 pp.
- Liu, Q. et al.**, 1998, Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain, separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis, *Plant Cell*, 10, 1391–1406pp

KAYNAKLAR (devam)

Lukatkin A.S., 2003, Contribution of oxidative stress to the development of cold-induced damage to leaves of chilling-sensitive plants. 3. Injury of cell membranes by chilling temperatures, *Russian Journal of Plant Physiology*, 50, 271–274pp.

Madhava Rao K.V. et. al., 2006, *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*, Springer, 1-14 pp.

Madhava, Rao K.V. and Sresty TVS., 2000, Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses, *Plant Science*, 157 113–128.

Mamedov M.D., Hayashi H., Wada H., Mohanty P.S., Papageorgiou G.C. and Murata N., 1991, Glycinebetaine enhances and stabilizes the evolution of oxygen and the synthesis of ATP by cyanobacterial thylakoid membranes, *FEBS Letters* ,294, 271– 274pp.

Maruyama, K. et al., 2004, Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems, *Plant J.*, 38, 982–993pp.

Mastrangelo, A.M. et al., 2005, Low temperature promotes intron retention in two e-cor genes of durum wheat, *Planta*, 221, 705–715pp.

Matos AR, Hourton-Cabassa C, Ciçek D, Rezé N, Arrabaça JD, Zachowski A and Moreau F., 2007, Alternative oxidase involvement in cold stress response of *Arabidopsis thaliana* fad2 and FAD3 cell suspensions altered in membrane lipid composition, *Plant and Cell Physiology*, 48, 856–865pp.

McConn M, Browse J., 1996, The Critical Requirement for Linolenic Acid 1s Pollen Development, Not Photosynthesis, *Plant Cell*, 8:403–16pp.

Mc Kersie, B.D. and Leshem, Y.Y., 1994. Salt Stress. *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*. Pages 55–78. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

Minor, W.; Steczko, J.; Stec, B.; Otwinowski, Z.; Bolin, J. T.; Walter, R. and Axelrod, B., 1996, Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochemistry*, 35, 10687-10701 pp.

Miquel, M., James, D., Jr, Dooner, H. and Browse, J., 1993, Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival, *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90, 6208–6212pp.

KAYNAKLAR (devam)

Mita, G., Fasano, P., De Domenico, S., Perrone, G., Epifani, F., Iannacone, R., et al., 2007, 9-Lipoxygenase metabolism is involved in the almond/*Aspergillus carbonarius* interaction, *Journal of Experimental Botany*, 58, 1803–1811 pp.

Miura, K. et al., 2007, SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 19, 1403–1414pp.

Mohanty P.S., Hayashi H., Papageorgiou G.C. and Murata N., 1993, Stabilization of the Mn-cluster of the oxygen-evolving complex by glycinebetaine, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1144, 92–96pp.

Nakano, R., Ishida, H., Makino, A. and Mae, T., 2006, In vivo fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species in an intact leaf of cucumber under chilling-light conditions, *Plant and Cell Physiology*, 47, 270–276pp.

Nemchenko A, Kunze S, Feussner I and Kolomiets M, 2006, Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments, *J Exp Bot*, 57,3767–3779 pp.

Nikolopoulos, D. Y. and Manetas, Y. 1991, Compatible solutes and in vitro stability of *Salsola soda* enzymes: Proline incompatibility. *Phytochemistry* 30, 411–413 pp.

Novillo, F. et al., 2004, CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 3985–3990pp.

Nyysölä A., Kerovuo J., Kaukinen P., von Weymarn N. and Reinikainen T. 2000, Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 22196–22201pp.

Ohlrogge, J., and Browse, J., 1995, Lipid Biosynthesis, *Plant Cell*, 7, 957–970pp.

KAYNAKLAR (devam)

Oldham M.L., Brash A.R. and Newcomer M.E., 2005 Insights from the X-ray crystal structure of coral 8R-lipoxygenase: calcium activation via a C2-like domain and a structural basis of product chirality, *J Biol Chem*, 280, 39545–39552 pp.

Orvar, B.L. et al., 2000, Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity, *Plant J.*, 23, 785–794pp.

P.Vrinten, Z.Hu, M.A.Munchinsky, G. Rowland and X. Qiu, 2005, Two FAD3desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed, *Plant Physiol.*, 139, 79-87pp.

Page, T., Griffiths G. and Buchanan-Wollaston, V., 2001, Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli, *Plant Physiol.* 125, 718–727 pp.

Paliyath, G., and Droillard, M.J., 1992, The mechanisms of membrane deterioration and disassembly during senescence, *Plant Physiol. Biochem.* 30, 789–812 pp.

Palta, J. P., Whitaker, B. D. and Weis, L., 1993, Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of *Solanum* species, *Plant Physiology*, 103, 793–803pp.

Palusa, S.G. et al., 2007, Alternative splicing of pre-mRNAs of Arabidopsis serine/arginine-rich proteins: regulation by hormones and stresses, *Plant J.*, 49, 1091–1107pp.

Papageorgiou G.C. and Murata N., 1995, The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving Photosystem II complex, *Photosynthesis Research*, 44, 243–252pp.

Papageorgiou G.C., Fujimura Y. and Murata N., 1991, Protection of the oxygen-evolving Photosystem II complex by glycinebetaine, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1057, 361–366pp.

Park, E. J., Jeknic, Z. and Chen, T. H., 2006, Exogenous application of glycinebetaine increases chilling tolerance in tomato plants, *Plant and Cell Physiology* 47, 706–714pp.

KAYNAKLAR (devam)

Park, E. J., Jeknic', Z., Sakamoto, A., DeNoma, J., Yuwansiri, R., Murata, N. And Chen, T. H., 2004, Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage, *Plant Journal*, 40, 474–487pp.

Parkin K.L. and Kuo S.-J., 1989, Chilling-induced lipid degradation in cucumber (*Cucumis sativa* L. cv. Hybrid C) fruit, *Plant Physiology*, 90, 1049–1056pp.

Porta H., Rueda-Benítez P., Campos F., Colmenero-Flores J. M., Colorado J. M., Carmona M. J., Covarrubias A. A. and Rocha-Sosa M., 1999, Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions, *Plant Cell Physiol*, 40:850–858 pp.

Prasad T.K., Anderson M.D. and Stewart C.R., 1994, Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings, *Plant Physiology*, 105, 619–627pp.

Prasad, T. K., Anderson, M. D., Martin, B. A. and Stewart, C. R., 1994, Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide, *Plant Cell*, 6, 65–74pp.

Prost, I., Dhondt, S. and Rothe, G. et al., 2005, Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens, *Plant Physiol.*, 139, 1902–1913 pp.

R. Collados, V. Andreu, R. Picorel and M. Alfonso, 2006, A light-sensitive mechanism differently regulates transcription and transcript stability of omega3 fatty-acid desaturases (FAD3, FAD7 and FAD8) in soybean photosynthetic cell suspensions, *FEBS Lett.*, 580 4934-4940pp.

Rhodes D. and Hanson A.D., 1993, Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44, 357–384pp.

Rohde, P., Hinch, D. K. and Heyer, A. G., 2004, Heterosis in the freezing tolerance of crosses between two *Arabidopsis thaliana* accessions (Columbia- 0 and C24) that show differences in non-acclimated and acclimated freezing tolerance, *Plant Journal*, 38, 790–799 pp.

KAYNAKLAR (devam)

Roughan, P. G., 1985, Phosphatidylglycerol and chilling sensitivity in plants, *Plant Physiology*, 77, 740–746pp.

Routaboul J-M, Fischer S and Browse J., 2000, Trienoic Fatty Acids Are Required to Maintain Chloroplast Function at Low Temperatures, *Plant Physiol.*, 124:1697–705pp.

Rudolph A.S., Crowe J.H. and Crowe L.M., 1986, Effects of three stabilizing agents – proline, betaine, and trehalose – on membrane phospholipids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 245, 134–143pp.

Ruelland E, Vaultier M-N, Zachowski A, and Hurry V., 2009, Cold signaling and cold adaptation in plants, *Advances in Botanical Research*, 49, 33-150pp.

Ruelland, E. and Miginiac and Maslow, M., 1999, Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: Activation or relief from inhibition?, *Trends in Plant Science*, 4, 136–141pp.

Sakamoto A, Murata N., 2002, The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants, *Plant Cell Environ.*, 25: 163–171pp.

Saltveit, M. E., 2002, The rate of ion leakage from chilling-sensitive tissue does not immediately increase upon exposure to chilling temperatures, *Postharvest Biol. Technol.* **26**, 295–304 pp.

Sangwan, V. et al. ,2001, Cold-activation of Brassica napus BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx, *Plant J.*, 27, 1–12pp.

Santino, A., Paolis, A. De., Gallo A., Quarta, A., Casey R. and Mita G., 2003, Biochemical and molecular characterisation of hazelnut (*Corylus avellana*) seed lipoxygenases, *Eur. J. Biochem.*, 270, 4365–4375 pp.

Sassenrath, G. F., Ort, D. R. and Portis, A. R., 1991, Impaired reductive activation of stromal bisphosphatases in tomato leaves following low-temperature exposure at high light, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 282, 302–308pp.

KAYNAKLAR (devam)

Schobert B., 1977, Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants?, *Journal of Theoretical Biology*, 68, 17–26pp.

Schulze et. al., 2005, *Plant Ecology*, Springer, 1-11 pp.

Scotti Campos P. and A. Thu Pham Thi, 1997, Effects of abscisic acid pretreatment on membrane leakage and lipid composition of *Vigna unguiculata* leaf discs subjected to osmotic stress, *Plant Sci.*, 130, 11–18 pp.

Siddiqui, K. S. and Cavicchioli, R., 2006, Cold-adapted enzymes, *Annual review of Biochemistry*, 75, 403–433pp.

Siedow, JN, 1991, Plant lipoxygenase: structure and function, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 145–188 pp.

Siegel, D. P., 1987, Membrane-membrane interactions via intermediates in lamellarto- inverted hexagonal phase transitions, In “Cell Fusion” (A. E. Sowers, ed.), Plenum Press, New York, 181–207pp.

Siminovitch, D., 1981, Common and disparate elements in the processes of adaptation of herbaceous and woody plants to freezing—a perspective. *Cryobiology* 18, 166–185 pp.

Smart, R. E., and Bingham, G. E., 1974, Rapid estimates of relative water content, *plant physiol.*, 53,258-260 pp.

Smolen' ska, G., and Kuiper, P. J. C., 1977, *Physiol. Plant*, 41, 29–35pp.

Sonoike, K. 1996, Photoinhibition of photosystem I: Its physiological significance in the chilling sensitivity of plants, *Plant and Cell Physiology*, 37, 239–247pp.

Stockinger, E.J. et al., 1997, *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 1035–1040pp.

Strand, A °., Foyer, C. H., Gustafsson, P., Gardestro"m, P. and Hurry, V., 2003, Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant, Cell and Environment* 26, 523–535 pp.

KAYNAKLAR (devam)

Strand, A., Hurry, V., Gustafsson, P. and Gardestroöm, P., 1997, Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates, *Plant Journal*, 12, 605–614 pp.

Strand, A., Hurry, V., Henkes, S., Huner, N., Gustafsson, P., Gardestroöm, P. and Stitt, M., 1999, Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway, *Plant Physiology*, 119, 1387–1398 pp.

Subbarao GV, Wheeler RM, Stutte GW and Levine LH., 1999, How far can sodium substitute for potassium in red beet?, *J Plant Nutr*, 22, 1745–61pp.

Sunkar, R. et al., 2007, Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation, *Trends Plant Sci.*, 12, 301–309pp.

Taiz L. and Zeiger E., 2003; *Plant physiology*, Sinauer Associates, Inc., Publishers.

Takagi, T., Nakamura, M., Hayashi, H., Inatsugi, R., Yano, R. and Nishida, I., 2003, The leaf-order-dependent enhancement of freezing tolerance in cold-acclimated *Arabidopsis* rosettes is not correlated with the transcript levels of the cold-inducible transcription factors of CBF/DREB1, *Plant and Cell Physiology*, 44, 922–931 pp.

Tasseva, G., de Virville, J. D., Cantrel, C., Moreau, F. and Zachowski, A., 2004, Changes in the endoplasmic reticulum lipid properties in response to low temperature in *Brassica napus*, *Plant Physiology Biochemistry*, 42, 811–822pp.

Tjus, S. E., Møller, B. L. and Scheller, H. V., 1998, Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures, *Plant Physiology*, 116, 755–764pp.

Tjus, S. E., Scheller, H. V., Andersson, B. and Møller, B. L., 2001, Active oxygen produced during selective excitation of photosystem I is damaging not only to photosystem I, but also to photosystem II, *Plant Physiology*, 125, 2007–2015pp.

Uemura, M. and Steponkus, P. L., 1989, Effect of Cold Acclimation on the Incidence of Two Forms of Freezing Injury in Protoplasts Isolated from Rye Leaves. *Plant Physiology* 91, 1131–1137pp.

KAYNAKLAR (devam)

Uemura, M. and Steponkus, P. L., 1994, A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance, *Plant Physiology*, 104, 479–496pp.

Uemura, M. and Steponkus, P. L., 1997., Effect of Cold Acclimation on the Lipid Composition of the Inner and Outer Membrane of the Chloroplast Envelope Isolated from Rye Leaves, *Plant Physiology*, 14, 1493–1500pp.

Uemura, M., Joseph, R. A. and Steponkus, P. L., 1995, Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (effect on plasma membrane lipid composition and freezeinduced lesions), *Plant Physiology*, 109, 15–30pp.

Vaultier, M.N. et al., 2006, Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in *Arabidopsis* cells, *FEBS Lett.*, 580, 4218–4223pp.

Vellosillo, M. Martínez, M.A. López, J. Vicente, T. Cascón, L. Dolan, M. Hamberg and C. Castresana, 2007, Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signalling cascade, *Plant Cell*, 19, 831–846 pp.

Venekamp, J. H., 1989, Regulation of cytosol acidity in plants under conditions of drought, *Physiologia Plantarum*, 76, 112–117 pp.

Vick, B.A., 1993, Oxygenated fatty acids of the lipoxygenase pathway. In: T.S. Moore, Editor, *Lipid Metabolism in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, 167–191 pp.

Vijayan, P. and Browse, J., 2002, Photoinhibition in mutants of *Arabidopsis* deficient in thylakoid unsaturation, *Plant Physiology*, 129, 876–885pp.

Vrinten et. al., 2005, Two FAD3 Desaturase Genes Control the Level of Linolenic Acid in Flax Seed, *Plant Physiology*, 139, 79-87pp.

Weber, H., Chételat, A., Caldelari D., and Farmer, E.E., 1999, Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves, *Plant Cell* 11, pp. 485–493 pp.

Willemot, C., Hope, H. J., Williams, R. J., and Michaud, R., 1977, Changes in fatty acid composition of winter wheat during frost hardening, *Cryobiology*, 14, 87–93pp.

KAYNAKLAR (devam)

Wyn Jones, R. G. and Storey, R., 1981, Betaines In The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants'' (L. G. Paleg and D. Aspinal, eds.), Academic Press, New York. 171–204pp.

Xin, Z. and Browse, J. 1998 *eskimo1* mutants of Arabidopsis are constitutively freezing tolerant, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95, 7799–7804pp.

Xin, Z. et al., 2007 Arabidopsis ESK1 encodes a novel regulator of freezing tolerance, Plant J., 49, 786–799pp.

Yamamoto, S., Suzuki H. and Ueda, N., 1997 Arachidonate 12-lipoxygenases, Prog. Lipid Res, 36, 23-41 pp.

Yang XH, Lu CM, 2005, Photosynthesis is improved by exogenous glycinebetaine in salt-stressed maize plants, Physiol Plant, 124:343–352 pp.

Yoshida, S., 1984, Chemical and biophysical changes in the plasma membrane during cold acclimation of mulberry bark cells (*Morus bombycis* Koidz. Cv Goroji), Plant Physiology, 76, 257–265pp.

Zhang, B., Chen, K., Bowen, J., Allan, A., Espley, R., Karunnairtnam S. and Ferguson, I., 2006, Differential expression within the LOX gene family in ripening kiwifruit, J. Exp. Bot., 57, 3825–3836 pp.

Zhang, S. and Scheller, H. V., 2004, Photoinhibition of photosystem I at chilling temperature and subsequent recovery in Arabidopsis thaliana, Plant and Cell Physiology, 45, 1595–1602pp.

Zhu, J. et al., 2004, An Arabidopsis homeodomain transcription factor gene, HOS9, mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 101, 9873–9878pp.

Zhu, J. et al., 2005, HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 102, 9966–9971pp.

ÖZGEÇMİŞ

13 Kasım 1985 yılında İzmir’de doğmuştur. Lisans eğitimini, Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümünde 2008 yılında tamamlamıştır. Aynı yıl Ege Üniversitesi Genel Biyoloji Bilim Dalı’nda yüksek lisansa başlamıştır. 2009 yılında LLP-Erasmus programı ile Hollanda Wageningen University moleküler biyoloji laboratuvarında 3 ay staj yapmıştır. 2011 yılında Stress responses-molecules, organisms and environments- Joint Meeting SEB toplantısına “contribution of GABA shunt to abiotic stres responsesin tobacco (*Nicotiana sylvestris*)” (Bor M., Akçay N., Karabudak T., Yıldız D., Özdemir F.) isimli poster sunumu ile katılmıştır.