

**NOHUT (*Cicer arietinum* L.) ÇEŞİT VE HATLARININ
SOĞUK STRESİNE KARŞI TOLERANSININ
FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELER İLE
BELİRLENMESİ**

**DETERMINATION OF THE TOLERANCE OF CHICKPEA
(*Cicer arietinum* L.) CULTIVARS AND LINES TO COLD
STRESS BY PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL
PARAMETERS**

ÖZLEM TURAN

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

NOHUT (*Cicer arietinum* L.) ÇEŞİT VE HATLARININ SOĞUK STRESİNE KARŞI TOLERANSININ FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELER İLE BELİRLENMESİ

Özlem Turan

ÖZ

Bu araştırmanın amacı, soğuğa toleranslı nohut (*Cicer arietinum* L.)'un bazı çeşit ve hatlarını belirlemek ve düşük sıcaklığın ve soğuk uyumunun bitki büyümesi, fotosentetik aktivite, zar bütünlüğü üzerindeki etkisi ile soğuğa karşı oluşturulan içsel savunma sistemleri (prolin içeriği ile antioksidant enzim aktivitelerindeki değişim) arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır.

Toprak kültüründe büyütülen 12 günlük nohut fideleri ya soğuk uyumlandırılmış (10°C, 7 gün) ya da uyumlandırılmamış olarak düşük sıcaklıklara (4°C ve 2°C, 12 gün) maruz bırakılmıştır. Soğuk uygulamaları nohut çeşit (Gökçe ve Canitez) ve hatlarının (AkN 87 ve AkN 290) ölçülen büyüme parametrelerini (gövde büyümesi, yaprak sayısı, taze ve kuru ağırlık) olumsuz yönde etkilemiştir. Gökçe çeşidinin, büyüme parametreleri düşük sıcaklıktan diğer genotiplere göre daha çok etkilenirken, AkN 290 hattı daha az etkilenmiştir. Soğuk uygulamalarında genotiplerin yaprak dokularındaki oransal ve gerçek su içeriği uyumlandırılan fidelerde uyumlandırılmayanlara göre daha fazladır ve çeşitler hatlara göre suyu daha fazla muhafaza etme yeteneklerine sahiptirler. Artan düşük sıcaklık şiddetine bağlı olarak genotiplerin yapraklarındaki MDA ve antosiyanin içerikleri artmıştır. Soğuk; genotiplerin özellikle AkN 290'nın toplam klorofil (a+b) içeriklerini azaltırken, genotiplerdeki karotenoid içeriğini benzer oranda artırmıştır. Bunun yanı sıra, düşük sıcaklık tüm çeşit ve hatlarda PSII'nin fotokimyasal aktivitesini önemli ölçüde etkilemiştir. Ancak bu etki genotiplerin hiç birinde PSII aktivitesini durduracak düzeyde olmamıştır. Tüm klorofil floresans parametreleri dikkate alındığında; genotipler soğuğa karşı dayanıklıdan duyarlıya doğru Gökçe, Canitez, AkN 87 ve AkN 290 olarak sıralanmıştır. Genotiplerin soğuğa karşı oluşturdukları içsel savunma sistemleri olarak bilinen antioksidant enzimlerin (SOD, APX, GR ve POD) aktivitelerindeki değişim incelendiğinde, bu enzimlerin uygulanan düşük sıcaklık derecesine, fidelerin uyumlandırılıp uyumlandırılmamasına ve bitkinin genotipine göre farklı tepkiler oluşturduğu görülmüştür. Gökçe çeşidi antioksidant enzim savunmasında diğer genotiplere göre daha başarılı olmuştur. Soğuk şiddetindeki artışa bağlı olarak serbest prolin içeriği önemli derecede artış göstermiştir; ancak şiddetli soğuk stresinde bile genotipler arasında prolin birikimi açısından önemli bir fark belirlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidant enzimler, büyüme, klorofil a floresansı, nohut (*Cicer arietinum* L.) çeşit ve hatları, MDA, prolin, soğuk dayanıklılığı, soğuk uyumu.

Danışman: Doç. Dr. Yasemin EKMEKÇİ, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı

DETERMINATION OF THE TOLERANCE OF CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.) CULTIVARS AND LINES TO COLD STRESS BY PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS

Özlem Turan

ABSTRACT

The aim of this study was to determine tolerance of some chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars and lines to cold and find out the relationship between the effect of low temperature and cold acclimation on plant growth, photosynthetic activity, membrane integrity and endogenous defence systems (proline content and changes in the activity of antioxidant enzymes) which generated against cold.

Chickpea seedlings were grown in soil culture for 12-days, exposed to low temperature (4°C and/or 2°C for 12 days) treatments either as cold acclimated (CA) (10°C for 7 days) or nonacclimated (NA). Cold treatments affected measured growth parameters (stem growth, number of leaves, fresh and dry weight) of chickpea cultivars (Gökçe and Canitez) and lines (AkN 87 and AkN 290) negatively. While growth parameters of the cultivar Gökçe were more affected than the other genotypes, the line AkN 290 were less affected. In the cold treatments, the relative and absolute water content of leaf tissues of the genotypes were greater in CA seedlings than NA ones and the cultivars maintained higher water content in comparison to the lines. MDA and anthocyanin contents of the leaves of all of the genotypes increased in relation to the increasing cold intensity. Cold decreased the total chlorophyll (a+b) content in the all genotypes, especially AkN 290, whereas the carotenoid content of the genotypes increased similarly. In addition to that, low temperature affected the photochemical activity of PSII in all of cultivars and lines significantly. However this effect has never reached the level at which the activity of PSII was blocked. Considering all of the chlorophyll fluorescence parameters; the genotypes were aligned from tolerant to sensitive as Gökçe, Canitez, AkN 87 and AkN 290. Analysis of the changes in activity of antioxidant enzymes (SOD, APX, GR and POD) which are known as endogenous defence systems against cold revealed that they responded differently to the variations of cold stress treatments (CA or NA) and genotypes. The cultivar Gökçe was more effective than the other genotypes according to the changes in antioxidant enzyme defence. Free proline content increased significantly with increasing cold intensity; however no difference was determined among the genotypes with regard to the accumulation of proline as a response even to severe cold stress.

Key Words: Antioxidant enzymes, chlorophyll a fluorescence, cultivars and lines of chickpea (*Cicer arietinum* L.), cold tolerance, cold acclimation, growth, MDA, proline.

Advisor: Assoc. Prof. Yasemin EKMEKÇİ, Hacettepe University, Department of Biology, Botany Section

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu ile deneysel yöntemlerin belirlenmesi, deneysel çalışmaların yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilip tartışılması sırasında yaptığı katkılar ve yönlendirici desteğinden dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Yasemin EKMEKÇİ'ye (Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü), değerli önerilerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Serpil TERZİOĞLU'na (Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü), değerli önerileri ve sağladığı olanaklar için Sayın Doç. Dr. Hüsnü ÇAKIRLAR'a, toprak materyalinin temin ve analizindeki katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Süleyman TABAN'a (Ankara Üniversitesi, Toprak Bölümü), çeşit ve hatların temin edilmesindeki yönlendirici katkıları için Sayın Taner AKAR ve Sayın Abdulkadir AYDOĞAN'a (T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü), yardım ve desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Nuran ÇİÇEK'e, çalışmalarımın her aşamasında dostluğunu ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Arş. Gör. Tuğçe KALEFETOĞLU'na, enzim özütlemesi ve okunması sırasında yardımını gördüğüm Biyolog Seher POLAT'a, öneri ve eleştirileriyle bana destek olan Botanik Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma;

Bu araştırmayı, 0302601001 nolu proje kapsamında destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne;

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü desteğini esirgemeyen dostlarıma ve her zaman yanımda olduklarını hissettiğim değerli aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Nohudun Taksonomisi, Kökeni, Morfolojisi, Ekolojisi, Tarlaya Ekimi ve Hasat Edilmesi.....	5
2.1.1. Taksonomisi.....	5
2.1.2. Kökeni.....	5
2.1.3. Morfolojisi.....	5
2.1.4. Ekolojisi.....	7
2.1.5. Tarlaya ekimi.....	7
2.1.6. Hasat edilmesi.....	8
2.2. Nohudun Kimyasal İçeriği.....	8
2.3. Dünyada ve Türkiye’de Nohut Üretimi.....	8
2.4. Nohudun Kullanımı.....	10
2.5. Bitkilerde Stres Kavramı ve Nohudu Etkileyen Stres Faktörleri.....	11
2.5.1. Bitkilerde stres kavramı.....	11
2.5.2. Nohudu etkileyen stres faktörleri.....	11
2.6. Soğuk Stresi.....	13
2.6.1. Soğuk (Üşüme) stresinin bitkiler üzerine etkileri.....	14
2.6.1.1. Soğuk stresinin hücresel düzeyde etkileri.....	14
2.6.1.1.1. Soğuk stresinin hücre zarı üzerine etkisi.....	14
2.6.1.1.2. Soğuk stresinin organeller üzerine etkisi.....	16
2.6.1.2. Soğuk stresinin bitki organları üzerine etkileri.....	19
2.6.1.3. Soğuk stresinin bitkinin gelişim evreleri üzerine etkileri.....	19
2.6.2. Soğuk stresinin fotosentez üzerine etkileri.....	20

2.6.2.1. Fotoinhibisyon.....	21
2.6.2.2. Fotooksidatif stres.....	23
2.6.3. Soğuk stresi ve oksidatif stres.....	25
2.6.3.1. Reaktif oksijen türleri (ROS).....	26
2.6.3.2. Reaktif oksijen türlerine karşı geliştirilen savunma mekanizmaları.....	27
2.7. Soğuk Uyumu.....	34
2.8. Soğuk Stresinin Algılanması ve Soğuk Uyumu.....	37
2.9. Soğuğa Cevapta Gen İfadelerinin Düzenlenmesi.....	40
3. MATERYAL VE METOD.....	42
3.1. Bitki materyalleri.....	42
3.2. Yöntemler.....	42
3.3. Ölçüm ve analizler.....	46
3.3.1. Fizyolojik parametreler.....	46
3.3.1.1. Gövde uzunluğu ve yaprak sayısı.....	46
3.3.1.2. Taze ve kuru ağırlık miktarının belirlenmesi.....	46
3.3.1.3. Oransal ve gerçek su içeriğinin tayini	46
3.3.1.4. Klorofil a floresans ölçümü.....	47
3.3.2. Biyokimyasal parametreler.....	48
3.3.2.1. Yaprak dokularında Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi.....	48
3.3.2.2. Yaprak dokularındaki pigment miktarının belirlenmesi.....	49
3.3.2.3. Yaprak dokularındaki prolin miktarının belirlenmesi.....	51
3.3.2.4. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi.....	52
3.3.2.4.1. Protein içeriğinin belirlenmesi.....	52
3.3.2.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi.....	52
3.3.2.4.3. Askorbat Peroksidaz (APX) aktivitesinin belirlenmesi.....	53
3.3.2.4.4. Glutatyon Redüktaz (GR) aktivitesinin belirlenmesi.....	53
3.3.2.4.5. Peroksidaz (POD) aktivitesinin belirlenmesi.....	54
3.3.3. İstatistiksel analizler.....	54
4. BULGULAR.....	55
4.1. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının bazı fizyolojik parametreler üzerine etkisi.....	55
4.1.1. Gövde uzunluğu üzerine etkisi.....	55
4.1.2. Yaprak sayısı üzerine etkisi.....	56
4.1.3. Taze ağırlık üzerine etkisi.....	57

4.1.4. Kuru ağırlık üzerine etkisi.....	59
4.1.5. Yaprak oransal ve gerçek su içeriği üzerine etkisi.....	59
4.1.6. Yapraklardaki fotokimyasal etkinlik üzerine etkisi.....	62
4.2. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkisi.....	71
4.2.1. Yaprak dokularındaki MDA içeriği üzerine etkisi.....	71
4.2.2. Yapraklardaki pigment içeriği üzerine etkisi.....	72
4.2.3. Yaprak dokularındaki prolin içeriği üzerine etkisi.....	78
4.2.4. Yaprak dokularındaki enzimatik antioksidant savunma sistemleri üzerine etkisi.....	79
5. TARTIŞMA.....	86
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	101
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	107
EK.....	133
ÖZGEÇMİŞ.....	138

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Dünyada en çok nohut üretimi yapan ülkelerin 2005 yılındaki üretim yüzdeleri.....	9
Şekil 2.2.	Soğuk hasarı modeli.....	16
Şekil 2.3.	Soğuk duyarlı bir bitkinin kloroplastlarındaki soğuk hasarı belirtileri...	18
Şekil 2.4.	Ksantofil döngüsü ve enerjinin fotokimyasal olmayan dağılımı.....	23
Şekil 2.5.	Soğuk-duyarlı bitkilerde, kısa soğuk uygulaması periyodunun, ışıkta ve karanlıkta fotosentez üzerine birincil etkileri.....	24
Şekil 2.6.	Moleküler oksijenden (O ₂) türeyen ROS'ların kendi içlerindeki dönüşümleri.....	28
Şekil 2.7.	Bitkilerde ROS uzaklaştıran metabolik yollar.....	31
Şekil 2.8.	α-tokoferol'un yeniden oluşumu ve alkil peroksil radikalının yakalanması.....	33
Şekil 2.9.	Bitkilerde soğuk uyumu ile indüklenen hücresel değişiklikler.....	36
Şekil 3.1.	Deneme planı.....	45
Şekil 3.2.	12 günlük Cicer arietinum L. çeşit ve hatlarının (a-b) kontrollü iklim odasındaki ve (c-d) kontrollü soğuk odadaki genel görünüşleri.....	45
Şekil 3.3.	Modüle floresans ölçüm sisteminin genel görünümü.....	48
Şekil 3.4.	Modüle floresans ölçüm sisteminden alınan klorofil a floresans sinyalleri.....	49
Şekil 4.1.	Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının yaprak oransal su içeriği (OSİ) (A) ve gerçek su içeriği (GSİ) (B) üzerine etkisi.....	61
Şekil 4.2.	Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının karanlığa adapte edilmiş yapraklardaki minimum floresans, F _o (A); maksimum floresans, F _M (B); PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliği, F _V /F _M (C) üzerine etkisi.....	64
Şekil 4.3.	Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının ışığa adapte edilmiş yapraklardaki PSII'nin gerçek fotokimyasal etkinliği, ΦPSII üzerine etkisi.....	66
Şekil 4.4.	Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının ışığa adapte edilmiş yapraklardaki PSII'nin enerji yakalama etkinliği (F _V '/F _M ') üzerine etkisi.....	67
Şekil 4.5.	Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının ışığa adapte edilmiş yapraklardaki elektron taşıma hızı (ETH) üzerine etkisi.....	68
Şekil 4.6.	Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının yapraklarındaki fotokimyasal qP (A) ve fotokimyasal olmayan kullanım NPQ (B) üzerine etkisi.....	70

Şekil 4.7.	Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının yaprak dokularındaki MDA içeriği üzerine etkisi.....	72
Şekil 4.8.	Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının yapraklardaki prolin içeriği üzerine etkisi.....	79
Şekil 4.9.	Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının yaprak dokularındaki toplam SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	80
Şekil 4.10.	Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının yaprak dokularındaki toplam APX enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	81
Şekil 4.11.	Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının yaprak dokularındaki toplam GR enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	83
Şekil 4.12.	Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının yaprak dokularındaki toplam POD enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	84
Şekil 6.1.	Farklı düşük sıcaklık uygulamalarında, nohut çeşit ve hatlarında belirlenen bazı fizyolojik ve biyokimyasal parametreler arasındaki etkileşiminin radar-çizimi (Biolyzer HP ₃) ile gösterimi	105
Şekil 6.2.	Farklı düşük sıcaklık uygulamalarında, nohut çeşit ve hatlarında belirlenen antioksidant enzim aktiviteleri arasındaki etkileşiminin radar-çizimi (Biolyzer HP ₃) ile gösterimi	106

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Dünyada 2000-2005 yılları arasındaki nohut üretimi.....	9
Çizelge 2.2. Türkiye’de 2000-2005 yılları arasındaki nohut üretimi.....	10
Çizelge 2.3. Bitkilerin maruz kaldıkları çeşitli biyotik ve abiyotik stresler.....	12
Çizelge 2.4. Soya fasulyesinin (Glycine max) büyüme ve gelişimi için kritik eşik sıcaklıkları.....	20
Çizelge 3.1. Kullanılan toprağın bazı fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları.....	43
Çizelge 4.1. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının bazı büyüme parametreleri üzerine etkisi.....	58
Çizelge 4.2. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının pigment içeriği üzerine etkisi.....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AsA	Askorbik asit
ANOVA	Varyans analizi (Analyses of variance)
AÖF	Anlamlı önemli fark
APX	Askorbat peroksidaz
BSA	Sığır serum albümini (Bovine serum albumin)
CAT	Katalaz
dak	Dakika
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ETH	Elektron taşıma hızı
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
F_o	Karanlığa adapte olmuş yapraklardaki minimum fluoresans
F_M	Karanlığa adapte olmuş yapraklardaki maksimum fluoresans
F_V	Karanlığa adapte olmuş yapraklardaki değişken fluoresans
F_V/F_M	PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliği
F_V'/F_M'	PSII'nin eksitasyon enerjisini yakalama etkinliği
F_o'	Işık ile doygun durumdaki minimum fluoresans
F_M'	Işık ile doygun durumdaki maksimum fluoresans
F_s	Işık ile adapte edilmiş yapraklardaki dinamik denge durumundaki fluoresansı
GR	Glutatyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GSI	Gerçek su içeriği
GSSG	Yükseltgenmiş glutatyon
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HA	Hidrate ağırlık
KA	Kuru ağırlık
kl	Klorofil
MDA	Malondialdehit
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
mM	Milimolar
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid

NBT	Nitrobluetetrazolyum
nmol	Nanomol
NPQ	Fotokimyasal olmayan kullanım
OSİ	Oransal su içeriği
$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit radikali
1O_2	Singlet oksijen
OH^{\cdot}	Hidroksil radikali
POD	Peroksidaz
PVP	Polivinilpirolidon
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
s	Saniye
SOD	Süperoksit dismutaz
SPSS	Sosyal bilimler için istatistik paket programı (Statistical Package for the Social Sciences)
TA	Taze ağırlık
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloroasetik asit
UV	Ultraviyole
Φ PSII	PSII'nin gerçek fotokimyasal etkinliği
qP	Fotokimyasal kullanım

1. GİRİŞ

Düşük sıcaklık, bitkilerin yeryüzündeki dağılımını, gelişimini ve verimini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biri olup; günümüzde yeryüzündeki toplam kullanılabilir tarım alanlarının %6'sı soğuk stresine maruz kalmaktadır. Her yıl ortalama 90 milyonluk artış gösteren dünya nüfusunun 2050 yılında 8.5 milyara ulaşabileceği düşünüldüğünde; dünya nüfusundaki artış ile tarımsal alanların ve tarımsal üretimin biyotik ve abiyotik streslere bağlı olarak azalmasının, özellikle insan beslenmesi için bir tehlike oluşturacağı beklenmektedir. Bu nedenle; tarım yapılamayan soğuk bölge topraklarının tarıma açılmasına, yüksek besin içeriğine sahip olan tarla bitkilerinin soğuğa karşı dayanıklılıklarının araştırılmasına ve soğuğa dayanıklı bitkilerin geliştirilmesine ihtiyaç doğmuştur. Ayrıca bitkilerde soğuğa dayanıklılığı ve uyumu sağlayan fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaların aydınlatılması tarımsal üretimin artırılması ve dayanıklı bitkilerin geliştirilebilmesi bakımından büyük önem taşımaktadır.

Her bitkinin normal büyüme ve gelişim gösterebilmesi için, belirli bir optimum sıcaklık derecesi gerekmekte ve bu sıcaklık derecesinin altındaki sıcaklıklar bitkilerde, soğuk stresi olarak algılanmaktadır (Mahajan and Tuteja, 2005). Düşük sıcaklık; özellikle tropik ve yarı tropik bölge bitkilerindeki ürün miktarını ve kalitesini en çok kısıtlayan abiyotik stresler arasında yer almaktadır (Yang et al., 2005a). Bununla beraber, bitkilerin düşük fakat donma derecesinde olmayan sıcaklıklara belirli bir süre maruz kalarak soğuğa karşı dayanıklılığı artırma yeteneği olarak tanımlanan soğuk uyumunun, çeşitli bitki türlerinde soğukun neden olduğu hasarı azalttığı bilinmektedir (Thomashow, 1999). Bitkilerde soğuk stresinin; büyüme ve gelişmeyi (Domisch et al., 2002; Provar, et al., 2003; Hu et al., 2006; Lundmark et al., 2006; Bertamini et al., 2007; Rymen et al., 2007), zar yapısını (Kratsch and Wise, 2000; Mahajan and Tuteja, 2005; Posmyk et al., 2005; Martz et al., 2006; Morsy et al., 2007) ve fotosentetik aktiviteyi (Allen and Ort, 2001; Huang and Guo, 2005; Goulas et al., 2006; Bertamini et al., 2007) olumsuz etkilediğini ve soğuk uyumunun ise soğukun neden olduğu bu olumsuz etkileri azalttığını bildiren (Scebba et al., 1999; Venema et al., 2000; Kuk et al., 2003; Nayyar et al., 2005a) pek çok araştırma bulunmaktadır.

Düşük sıcaklık, bitkilerde zar lipidlerinin peroksidasyonuna, proteinlerin denatürasyonuna ve yığılmalarına, DNA zincirlerinin kırılmasına, ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) [süper oksit radikali (O_2^-), singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^\cdot) gibi] oluşumuna neden olarak oksidatif hasarlara yol açmaktadır (Bowler et al., 1992). Özellikle lipid peroksidasyonu (Bailly et al., 1996; Kuk et al., 2003; Posmyk et al., 2005; Nayyar et al., 2005a; Hu et al., 2006) ve dehidrasyon (Mahajan and Tuteja, 2005) sonucu oluşan zar bütünlüğünün bozulması, soğuk stresinin bitkiler üzerindeki en önemli etkilerinden biridir. Düşük sıcaklıklara maruz kalan bitkilerde, fotosentetik kapasitede de bir azalma görülmekte ve bu azalmanın, PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliğinde, PSI aktivitesinde, ATP sentezinde ve karbon indirgenme döngüsündeki stroma enzim aktivitelerindeki inhibisyonlar ve fotosentetik pigmentlerdeki degradasyonlar ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Venema et al., 2000; Allen and Ort, 2001; Tambussi et al., 2004; Huang and Guo, 2005; Bertamini et al., 2007). Ayrıca ışıkta düşük sıcaklığa maruz kalma sonucunda ROS [PSI'in verici bölgesinde oksijenin indirgenmesi ile süperoksit radikali veya uyarılmış (eksite olmuş) klorofil molekülünün enerjisini oksijene transfer ederek singlet oksijen oluşumu] üretiminin artmasının, hücre sel bileşenlerde oksidatif reaksiyonlara ve fotosentetik aparatlarda fotoinhibisyona neden olduğu bilinmektedir (Wise, 1995; Kratsch and Wise, 2000; Foyer et al., 2002; Hogewoning and Harbinson, 2007).

Fotokimyasal olmayan yol ile enerjinin ısı olarak dağıtıldığı ışık-koruyucu mekanizmalar, düşük sıcaklık stresi sırasında oluşan ışık zararlarına karşı savunmaya katkıda bulunabilirler, ancak bu mekanizma tek başına hücre sel hasarları önlemek için yeterli olmamaktadır. Yüksek bitkiler, sahip oldukları süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT), peroksidaz (POD) (Choi et al., 2002) gibi enzimatik ve askorbik asit (AsA) ve glutatyon (GSH) gibi düşük moleküler ağırlıklı enzimatik olmayan antioksidantlardan oluşan savunma sistemleri sayesinde (Bowler et al., 1992) ROS'ları uzaklaştırarak, hücrelerini oksidatif hasara karşı koruyabilmektedirler. Çeşitli bitkilerde, soğuğa karşı dayanıklılığın kazanılmasında artan antioksidant savunma sistemlerinin önemli role sahip olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (Yang et al., 2001; Posmyk et al., 2005; Morsy et al., 2007). Antioksidant savunma

sistemlerinin yanı sıra, gölgeleyici pigmentler olarak bilinen antosiyaninlerin klorofil pigmentlerini maskeleyerek fotooksidasyonu engellediği (Farrant, 2000); karotenoidlerin ise klorofil-oksijen etkileşimini engelleyerek zarları koruduğu bildirilmiştir (Young, 1991).

Bitkilerin düşük sıcaklığa maruz kalması su noksanlığına neden olmakta ve bitkiler, dehidrasyon sırasında topraktaki çözünen maddelerin alımı ya da birbirinin yerine geçebilen osmotik-koruyucuların sentezi sayesinde osmotik dengelerini sürdürmeye çalışmaktadırlar (Tester and Davenport, 2003). Osmolitler olarak da bilinen bu maddeler, bitki metabolizmasına zarar vermeksizin yüksek konsantrasyonlarda birikerek hem osmotik potansiyeli düşürmek suretiyle bitkinin su alımını sağlamakta hem de subselular bileşenlerin (zarlar ve proteinler gibi) yapısal bütünlüklerinin korunmasına ve serbest radikallerin uzaklaştırılmasına yardım etmektedirler (Williamson et al., 2002). Soğuk stresi sırasında çeşitli bitkilerde prolin, şeker gibi osmolitlerin arttığını gösteren birçok çalışma mevcuttur (Savitch et al., 2000; Ruiz et al., 2002; Nayyar et al., 2005a).

Yüksek protein ve karbohidrat içeriğine sahip olan tohumları nedeniyle insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan nohut (*Cicer arietinum* L.), dünyadaki en önemli yemelik baklagillerden biridir. *Rhizobium* bakterileriyle simbiyotik ilişki sonucu oluşan kök nodülleri sayesinde atmosferik azotu bağlayarak toprağın azotça zenginleşmesini sağlamakta ve bir rotasyon bitkisi olarak tarımda sürekliliğe yardımcı olmaktadır. Türkiye'nin güney doğusu ve Suriye'den köken aldığı bilinen nohut bitkisi (*Cicer arietinum* L.) (Lev-Yadun et al., 2000), ıslah edilmiş ilk baklagillerden biridir. Nohut; **soya fasulyesi, fasulye ve bezelyeden sonra dünyada en çok yetiştirilen dördüncü tane baklagil (9.1 milyon ton/11.2 milyon hektarlık ekim alanı) olup**; Türkiye, dünyada en çok nohut üretimi yapan ülkeler arasında 3. sırada yer almaktadır (Anonymous, 2006). Son yıllarda, nohut veriminin ve kalitesinin önemli derecede azalması, bitkinin büyüme ve gelişim sırasında karşı karşıya kaldığı biyotik (*Ascochyta rabiei*, *Fusarium oxysporum*, *Liriomyza cicerina* gibi patojenler) ve abiyotik (düşük ve yüksek sıcaklık ile kuraklık gibi) faktörlerden kaynaklanmaktadır. Nohudun düşük sıcaklığa duyarlı bir bitki olduğu bildirilmiş olsa da, nohut bitkisinin soğuk stresine karşı göstermiş olduğu fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerle ilgili oldukça sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır (Singh, 1997; Nayyar et al, 2005a;b). Ülkemizde yazlık

olarak ekimi yapılan ve genellikle de, antraknozdan [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.] kaçınmak için bahar yağışlarından sonraki döneme ekimi kaydırılan nohudun, gelişme periyodunun sıcak ve kurak döneme denk gelmesi önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Yazlık ekim yerine yapılacak bir güzlük ekim ile nohut veriminin arttırılabileceği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Hawtin and Singh, 1984; Saxena, 1984; Singh, 1987). Aynı zamanda küresel iklim değişiklikleri ve kuraklık ülkemizde birçok üründe güzlük ekimi zorunlu kılmaktadır. Ancak, güzlük ekimlerde en büyük abiyotik stresin soğuk zararı olması, nohut verimini ve kalitesini arttırmak amacıyla ülkemizde nohut çeşit ve hatlarının özellikle soğuk streslerine karşı geliştirdikleri dayanıklılık ile ilgili fizyolojik, biyokimyasal, moleküler ve genetik temellerin aydınlatılmasına ve sonuçta etkin yetiştirme programlarının uygulamaya geçirilmesine gereksinim doğurmuştur.

Bu araştırmanın amacı, soğuk stresine dayanıklı ve değişik ekolojik bölgelere adapte olabilecek uygun nohut (*Cicer arietinum* L.) çeşit ve hatlarını belirlemektir. Ayrıca, düşük sıcaklığın ve soğuk uyumunun bitki büyümesi, fotokimyasal aktivite ve fotosentetik pigmentler, zar bütünlüğü üzerindeki etkisi ile soğuğa karşı oluşturulan içsel savunma sistemleri (serbest prolin amino asiti içeriği ile antioksidant enzim aktivitelerindeki değişim) arasındaki ilişki ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Tez kapsamında dört farklı genotipe ait (iki çeşit ve iki hat) nohut (*Cicer arietinum* L.) tohumları saksılara ekilerek, toprak kültüründe, 25°C sıcaklıkta, 16 saat ışık/ 8 saat karanlık fotoperiyotta ve 150 $\mu\text{mol m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde, %40-50 nemde, kontrollü iklim odasında 12 gün süre ile büyütülmüştür. Nohut genotipleri, 12 günlük fidelerde farklı düşük sıcaklık uygulamalarının (uyumlandırma, uyumlandırılmaksızın uygulanan 4°C ve 2°C, uyum periyotlu uygulanan 4°C ve 2°C ve bu uygulamalarla ait kontroller) etkileri (gövde uzunluğu, yaprak sayısı, taze ve kuru ağırlık, su, MDA ve pigment içerikleri ve fotokimyasal aktivitedeki değişiklikler) ve strese karşı oluşturulan cevaplar (prolin birikimi ve antioksidant enzim sistemleri) esas alınarak, soğuğa dayanıklılıklarına ve uyum yeteneklerine göre sınıflandırılmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nohudun Taksonomisi, Kökeni, Morfolojisi, Ekolojisi, Tarlaya Ekimi ve Hasat Edilmesi

2.1.1. Taksonomisi

Nohut (*Cicer arietinum* L.), Anthophyta şubesinin, Dicotyledonae alt şubesinin, Rosales takımının, Leguminosae familyasının, Papilionideae alt familyasının, *Cicer* cinsine aittir. *Cicer* cinsi, 9 tek yıllık ve 34 çok yıllık tür içerir (van der Maesen, 1972; Muehlbauer, 1996; Ahmad, 1999). Türler arasındaki çaprazlamalarda hibritlerin çaprazlanma yeteneği ve verimliliği tek yıllıkları 4 çaprazlanabilme grubuna sınıflandırmada temel olarak kullanılmıştır. Bu 4 gruptan ilkinin nohudun kültüre alınmış (*Cicer arietinum* L.) ve yabancı (*Cicer reticulatum*) formu oluşturur (Ladizinsky et al., 1988).

2.1.2. Kökeni

Kültüre alınmış nohut, *Cicer arietinum* L., ıslah edilmiş ilk tane baklagillerinden biridir (Singh, 1997). Yakın akraba türlerinin, *C. reticulatum* ve *C. echinospermum*, varlığına dayanılarak nohudun kökeni ile ilgili muhtemel merkezin Türkiye'nin güney doğusu ve Suriye'nin Türkiye'ye komşu olan kesimleri olduğu bildirilmiştir (van der Maesen, 1987; Lev-Yadun et al., 2000). Yabancı form *C. reticulatum*, kültür formu *C. arietinum*'la döllenabilir ve *C. arietinum*'a morfolojik olarak çok benzer; bu nedenle, nohudun yabancı atası olarak kabul edilmektedir (Ladizinsky, 1975). Botanik ve arkeolojik deliller nohudun ilk olarak Orta Doğu'da ıslah edilmiş olduğunu ve ilk çağdan beri Hindistan'da, Akdeniz Bölgesi'nde, Orta Doğu'da ve Etiyopya'da ekildiğini göstermektedir. Yabancı türlerin ise, Türkiye, İran, Afganistan ve Orta Asya'da bulunduğu bildirilmiştir (Duke, 1981).

2.1.3. Morfolojisi

Nohutta plumulanın gelişmesi ile dik ya da sürünücü, bazen çok dallanmış çalimsı, 0.2-1 m boyunda, salgı tüyleri ile kaplı, zeytin yeşili, koyu yeşil ya da tirşe (mavi-yeşil) renkte gövdeler meydana gelir (Cubero, 1987; van der Maesen, 1987).

Hipogeik çimlenme gösteren nohut, primer kökten oluşan güçlü bir kazık kök sistemine sahiptir. Kökler 2 m kadar derine inebilir, fakat büyük bir kısmı 60 cm derinlikte yer alır. Nohut köklerinde, diğer baklagillerin köklerinde de olduğu gibi, *Rhizobium* bakterileriyle simbiyotik ilişki sonucu oluşan kök nodülleri görülmektedir (Duke, 1981; Singh, 1997).

Yapraklar sarmal dizilişindedir, her noddan birer yaprak çıkar ve bu yapraklar imparipinnat bileşik yaprak şekline sahiptirler. Yapraklar da gövde gibi salgı tüyleri ile kaplıdır. Her yaprakta orta damar üzerine dizilmiş 3-8 çift yaprakçık ve bir uç yaprakçığı bulunur. Yaprakçıkların şekilleri ovalden eliptiğe değişir, kenarları tırtıklı, uç kısımları sivri ve taban kısımları üçgenimsidir. Yaprakçıklar 0.6-2.0 cm uzunluğunda ve 0.3-1.4 cm genişliğindedir (Duke, 1981; Cubero, 1987; van der Maesen, 1987). Kulakçıklar (stipul) genellikle 3-5 mm uzunluğunda ve 2-4 mm genişliğinde olup bazen kulakçık bulunmayabilir (van der Maesen, 1987; Singh, 1997).

Çiçekler karakteristik olarak küçük kelebeksidir (papilionaceous) (Singh, 1997). Koltuk altından çıkan çiçekler tek ve bazen ikili infloresans şeklindedir. Çiçek durumu sapları (pedunkul) 0.6-3 cm ve çiçek sapları (pedisel) 0.5-1.3 cm uzunluğundadır. Brakteler üçgen ya da üç parçalıdır. Kaliks 7-10 mm, korolla ise 0.8-1.2 cm uzunluğundadır. Korolla beyaz, pembe, maviye çalan mor ya da mavi renktedir. Stamenlerden 9'u bileşik 10. stamen ise serbesttir (9-1) (diadelphous). Ovaryum sapsız, şişkin ve tüylüdür (Cubero, 1987; van der Maesen, 1987).

Legümen meyvelere sahiptir ve legümenler paralel kenar, dikdörtgen ya da oval şekilli ve şişkin olup salgı tüyleri ile kaplıdır (Singh, 1997). Her legümende en fazla 3 tohum bulunur. Tohumlar gagalı, çoğunlukla köşeli ve buruşuk, nadiren bezelye gibi yuvarlaktır ve renkleri krem rengi, sarı, kahverengi, yeşil ya da siyah olabilir (Duke, 1981; Cubero, 1987; van der Maesen, 1987). Nohut tohumlarının iki yaygın çeşidi vardır: *Desi* tipleri küçük, köşeli, lifli ve koyu pigmentli (yeşil, açık kahverengi, kahverengi ya da siyah) tohumlar olarak karakterize edilirken; *kabuli* tipleri daha büyük, daha yuvarlak, daha az lif içeriğine sahip ve krem ya da sarı renkli tohumlar olarak karakterize edilir. *Desi* tipi çoğunlukla Hindistan, İran, Etiyopya ve Orta Amerika'nın bir kısmında bulunurken, *kabuli* tipi çoğunlukla

Avrupa'nın güney kesimleri, Doğu Asya, Kuzey Afrika, Güney Amerika ve ülkemizde bulunur (Malhotra et al., 1987).

2.1.4. Ekolojisi

Nohut kendi kendine tozlaşan bir bitkidir. Çapraz tozlaşma nadirdir; sadece % 0-1 oranında görüldüğü bildirilmiştir (Smithson et al., 1985; Singh, 1987). Genellikle yağışlı ve serin iklim bitkisi ya da yarı kurak bölgelerde kuru iklim bitkisi olarak yetişir. 21-29°C gündüz ve 18-26°C gece sıcaklıkları ve 600-1000 mm yıllık yağış nohudun yetiştirilmesi için optimum olan koşullardır (Duke, 1981; Smithson et al., 1985). Nohut kuru ve serin iklimde güneş gören drenajı yüksek topraklarda iyi yetişir (Smithson et al., 1985). Nohut genellikle pH'sı 5.5 ve 8.6 arasında olan kırmızı ve ağır siyah topraklarda yetişir. Don, dolu ve aşırı yağış bitkiye zarar verir. Soğuğa duyarlı olmasına karşın, bazı çeşitler erken evrelerde ya da kar altındayken -9.5°C gibi düşük sıcaklık derecelerini tolere edebilirler. %21-41 bağıl nem oranı tane dolumu için optimumdur (Duke, 1981). "Nötr gün bitkisi" olarak adlandırılmasına rağmen, nohut nicelik bakımından bir uzun gün bitkisidir; fakat çiçekleri her fotoperiyotta uyarılabilir (Smithson et al., 1985).

2.1.5. Tarlaya ekimi

Nohutlar tohumdan üretilir. Tohumlar saçılarak ya da (daha sıkça) her tohum arasında 10 cm boşluk bırakılarak, 2-12 cm derinliğe ve her sıra arasında 25-60 cm uzaklık olacak şekilde iyi bastırılmış toprağa ekilir. Toprak, kaba pürüzlerden arındırılmış, büyük parçaları kırılmış ve eğimi dengelenmiş olmalıdır.

Tohumlar bölgeye bağlı olarak ilkbaharda (Türkiye ve Birleşik Devletler'de Mart sonu-Nisan ortasında; Akdeniz çevresinde Şubat-Mart-Nisan'da), toprak ısınınca ya da yağmurlar bittiği zaman (Hindistan ve Pakistan'da Eylül ortasından Kasım'a, nadiren daha geç; Etiyopya'da Eylül-Ocak ya da Nisan'da) ekilir (Smithson et al., 1985). Nohut tek başına ya da arpa, keten tohumu, hardal, bezelye, mısır, kahve, patates ya da buğday ile karışık olarak ekilebilir. Dönüşümlü ekimde ise genellikle buğday, arpa ya da pirinci takip eder (van der Maesen, 1972).

2.1.6. Hasat edilmesi

Nohutlar 3-7 ay içinde olgunlaşır ve olgunlaşma sırasında yapraklar kahverengi/sarıya döner. Kuru tohum elde edebilmek için, bitkiler olgunlaşmışken ya da olgunlaşmadan hemen önce toprağa yakın yerden kesilerek ya da sökülerek hasat edilir. Bitkiler kurumaları için birkaç gün tarlada istif edilir ve daha sonra ürün çırpılarak ya da makinelerde harman edilir.

2.2. Nohudun Kimyasal İçeriği

Nohut, protein ve karbohidrat bakımından zengindir ve nohut proteininin kalitesi bezelye, siyah fasulye ve yeşil fasulye gibi baklagillerden daha yüksektir (Kaur et al., 2005; Kaur and Singh, 2007). Ayrıca, kilogram başına ortalama 220 g protein, 670 g toplam karbohidrat, 470 g nişasta, 50 g yağ, 80 g lif ve 36 g kül miktarı ile yemeklik baklagillerin arasında besin içeriği açısından en zenginlerinden biridir (Nayyar et al., 2006). Çiğ tohumlar her 100 gramda: 357 kalori, %4.5-15.69 nem, 14.9-24.6 g protein, %0.8-6.4 yağ, 2.1-11.7 g lif, 2-4.8 g kül, 140-440 mg Ca, 190-382 mg P, 5.0-23.9 mg Fe, 0-225 µg β-karoten, 0.21-1.1 mg thiamin, 0.12-0.33 mg riboflavin, ve 1.3-2.9 mg niasin içerir. Haşlanmış ve kavrulmuş tohumlar bu miktarları benzer oranda içerir (Duke, 1981; Huisman and van der Poel, 1994). Tohumdaki yağ asidi bileşim yüzdeleri ise *Desi* tipte: oleik 52.1, linoleik 38.0, miristik 2.74, paktik 5.11 ve steatik 2.05; *Kabuli* tipte: oleik 50.3, linoleik 40.0, miristik 2.28, palmitik 5.74, stearik 1.61 ve arakidik 0.07'dir. Yapraklar %4-8 protein içerirler (Duke, 1981).

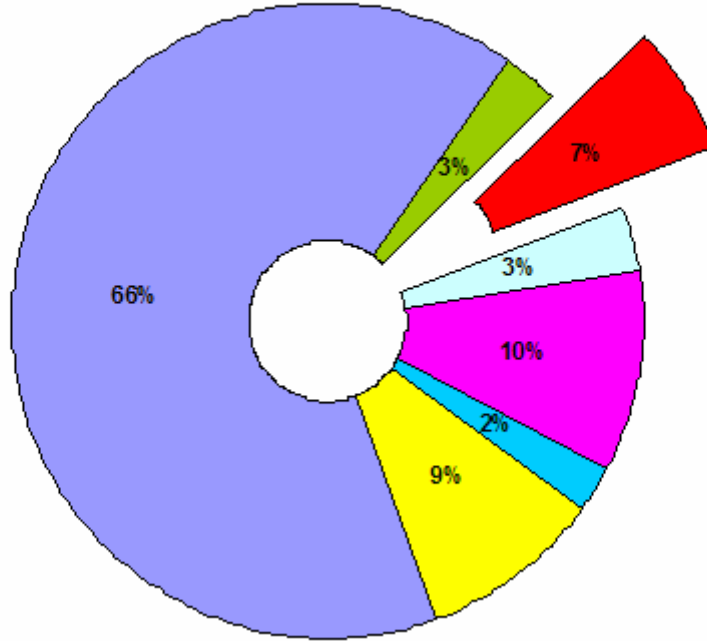
2.3. Dünyada ve Türkiye' de Nohut Üretimi

2005 yılı verilerine göre dünyadaki nohut ekim alanları toplam 11.2 milyon hektar ve üretimi yaklaşık 9.1 milyon ton olarak bildirilmiştir (Çizelge 2.1) (Anonymous, 2006). Dünyada yüksek kaliteli nohudun toplam üretiminin yaklaşık %66'sını karşılayan Hindistan'ı sırasıyla Pakistan, Türkiye, İran ve Meksika izlemektedir (Kaur and Singh, 2007). Dünyada en çok nohut üretimi yapan ülkeler arasında 3. sırada yer alan Türkiye (Şekil 2.1), 2005 yılı verilerine göre, 630 bin hektarlık alanda 610 bin ton nohut üretimi yapmaktadır (Çizelge 2.2) (Anonymous, 2006).

Çizelge 2.1. Dünyada 2000-2005 yılları arasındaki nohut üretimi (Ha: Hektar; Hg/Ha: Hektogram/Hektar; T: Ton) (Anonymous, 2006).

Yıllar	Hasat Alanı (Ha)	Ürün (Hg/Ha)	Üretim (T)	Tohum (T)
2000	10.103.870	7.865	7.946.948	476.670
2001	9.435.870	7.306	6.893.512	532.368
2002	10.415.787	7.953	8.284.014	497.425
2003	9.499.638	7.488	7.113.073	535.499
2004	11.127.866	7.752	8.625.894	540.010
2005	11.210.818	8.182	9.172.530	539.910

■ Hindistan ■ Meksika ■ Türkiye ■ İran ■ Diğer ■ Avustralya ■ Pakistan



Şekil 2.1. Dünyada en çok nohut üretimi yapan ülkelerin 2005 yılındaki üretim yüzdeleri (Anonymous, 2006).

Çizelge 2.2. Türkiye’de 2000-2005 yılları arasındaki nohut üretimi (Ha: Hektar; Hg/Ha: Hektogram/Hektar; T: Ton) (Anonymous, 2006).

Yıllar	Hasat Alanı (Ha)	Ürün (Hg/Ha)	Üretim (T)	Tohum (T)
2000	636.000	8.616	548.000	77.400
2001	645.000	8.295	535.000	79.200
2002	660.000	9.848	650.000	75.600
2003	630.000	9.524	600.000	79.200
2004	660.000	9.394	620.000	75.600
2005	630.000	9.683	610.000	75.600

2.4. Nohudun Kullanımı

Nohut dünyada oldukça farklı kullanım alanlarına sahiptir. Nohut tohumları yeşil sebze olarak taze yenir, kavrulur, kızartılır ve haşlanır; çerez, tatlı ve çeşni olarak tüketilir; tohumlar öğütülüp un, çorba ve ekmek yapmak için kullanılabilir. Filizlenmiş tohumlar sebze olarak yenir ya da salatalara katılır.

Genç bitkiler ve yeşil meyve kabukları ıspanak gibi yenir. Konserve edilmiş nohut, Türkiye ve Latin Amerika’da mayalanmış yiyecek üretmek için kullanılır. Birçok gelişmiş ülkede nohudun taze ya da kuru gövdeleri, yaprakları ve tohumları hayvan yemi olarak da kullanılır. Her ne kadar suya dayanıklı olmasa da, nohuttan kontrplak için uygun bir yapıştırıcı da hazırlanabilir. Nohudun %21’lik nişasta verimi tekstil için uygun olup, ipek, yün ve pamuklu giysilere parlaklık verir (Duke, 1981).

Nohut kolesterol düşürücü etkiye sahiptir (Geervani, 1991). Yaprakların, gövdelerin ve meyve kabuklarının salgıları ekşi bir tada sahip olan malik ve oksalik asit içerirler. Bu asit salgıları afrodizyak, bronşit, nezle, kolera, sindirim sistemi rahatsızlıkları, yılan sokması ve güneş çarpması gibi tıbbi uygulamalarda kullanılır.

2.5. Bitkilerde Stres Kavramı ve Nohudu Etkileyen Stres Faktörleri

2.5.1. Bitkilerde stres kavramı

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

Bitkide stres kavramını tanımlayan üç terim vardır. Bunlar stres, tepki ve zarardır. Stres, bitki büyüme ve gelişmesini engelleyen madde veya durumdur. Tepki, bitkinin maruz kaldığı olumsuz koşula karşı gösterdiği cevaptır. Zarar ise bitkide daha fazla üstesinden gelinemeyen çok yüksek stresin sonucudur (Lichtenthaler, 1998).

Bitki büyümesi ve verimliliği çeşitli abiyotik ve biyotik stres faktörlerinden önemli derecede etkilenir (Çizelge 2.3). Bitkiler tuz, kuraklık, sel, yüksek ve düşük sıcaklık, oksidatif stres ve ağır metal toksisitesi gibi stres koşullarına sık sık maruz kalırlar. Birçok insan kaynaklı aktivite de bu stres faktörlerinin ortaya çıkmasına katkıda bulunur. Bitkiler bu stres faktörlerinin yanı sıra bakteri, mantar ve virüs gibi patojenlere ve otçullara da dayanmak zorundadır. Tüm bu stres faktörleri bitkiler için birer tehdittir, onların genetik potansiyellerine ulaşmalarını engeller ve ürün verimliliğini sınırlar. Dünyada ürün başarısızlığının temel nedeni olan abiyotik stresler, en önemli ürünlerin ortalama verimini %50 ya da daha fazla düşürür (Bray et al., 2000).

Bitkilerin çeşitli stres faktörlerine verecekleri tepkiler, maruz kalınan stresin süresine ve şiddetine, strese mazur kalan doku, organ ve bitki çeşidine ve özellikle bitkinin gelişim evresine bağlıdır (Bray et al., 2000).

2.5.2. Nohudu etkileyen stres faktörleri

Nohut verim ve kalitesindeki önemli düzeydeki düşüş, bitkinin büyüme ve gelişimi sırasında karşı karşıya kaldığı biyotik (*Ascochyta rabiei*, *Fusarium oxysporum*, *Liriomyza cicerina* gibi patojenler) ve abiyotik (düşük ve yüksek sıcaklık ile kuraklık gibi) stres faktörlerinden kaynaklanmaktadır (Singh, 1997). Biyotik ve abiyotik

streslerin nohut üretimini engelleme oranları sırasıyla %58 ile %42'dir (Singh et al., 1994).

Çizelge 2.3. Bitkilerin maruz kaldıkları çeşitli biyotik ve abiyotik stresler (Mahajan and Tuteja , 2005'ten modifiye edilerek alınmıştır).

Biyotik Stresler	Patojenler (virüsler, bakteriler, mantarlar)
	Böcekler
	Otçullar
	Kemirgenler
	İnsan tahribatı
	Rekabet

Abiyotik Stresler	Düşük (üşüme ve donma) sıcaklık
	Yüksek sıcaklık
	Tuzluluk (tuz)
	Kuraklık (su kıtlığı koşulları)
	Aşırı su (sel)
	Işımalar (UV ve görünür ışığın yüksek yoğunlukları)
	Kimyasallar ve kirleticiler (ağır metaller, pestisitler, herbisitler ve aerosoller)
	Oksidatif stres (aktif oksijen türleri ve ozon)
	Rüzgar (rüzgardaki kum ve toz partikülleri)
	Topraktaki besin eksikliği

Biyotik faktörler arasında yer alan ve nohut üretimini %46 oranında azaltan mantarlardan en önemlileri bitkinin solmasına neden olan *Fusarium oxysporum* ve antraknoza neden olan *Ascochyta rabiei*'dir (Smithson et al., 1985). Antraknoz yaprakların, gövdelerin ve tohumların üzerinde kahverengi noktaların oluşmasına neden olur (Kaiser, 1992). Özellikle Kuzey Hindistan, Pakistan, Amerika ve Orta Doğu'da geniş çapta etkili olan bir hastalık olan antraknoz Türkiye'de de nohut üretimini kısıtlayan en önemli hastalıktır.

Abiyotik stresler arasında yer alan kuraklık %30'luk payı ile nohut verimini azaltmada ilk sırayı alırken, düşük ve yüksek sıcaklıklar %6'lık paya sahiptirler (Singh et al., 1994).

2.6. Soğuk Stresi

Sıcaklık, mevsimden mevsime değişen ve günlük dalgalanmalara uğrayan çevresel bir faktördür. Canlılar çevresel sıcaklıkları kontrol edemediklerinden, ekstrem sıcaklıklarda hayatta kalmak için iki strateji geliştirirler; ya stresten kaçınırlar ya da stresi tolere ederler. Yerleşimi sabit (sesil) organizmalar olan bitkiler, sıcaklıktaki mevsimsel değişiklikleri algıladıkları gibi geçici dalgalanmaları da algılama yeteneğinde olmalı ve bir sonraki sıcaklık rejimine hazır olmak için bu değişikliklere kendi biyolojilerini etkin şekilde uyarlayarak karşılık verebilmelidirler (Saltveit and Morris, 1990; Browse and Xin, 2001). Bitkiler, soğuk (üşüme) streslerini tolere edebilmek için stratejiler geliştirirler fakat, aşırı düşük sıcaklıklarda bitkilerde hasar meydana gelir.

Kuraklık, yüksek ışık ya da hava kirliliği gibi diğer çevresel streslerden farklı olarak soğuk, bir bitkinin her bir hücresindeki her bir molekülün termodinamik ikliminde büyük, anlık ve eş zamanlı değişikliği gösterir (Kratsch and Wise, 2000).

Soğuk stresi ürün verimini, kalitesini, hasat sonrası dayanıklılığını ve türlerin dağılımını kısıtlayan çevresel streslerden biridir (Pearce, 1999 ; Chinnusamy et al., 2006). Her bitki kendi büyüme ve gelişmesi için optimum olan belirli sıcaklık ihtiyacına sahiptir. Belirli sıcaklık koşulları bir bitki için optimum olurken, diğer bitki için strese neden olabilir (Mahajan and Tuteja, 2005). Bir bitkinin doğal soğuk duyarlılığı, bazı türlerin soğuğa karşı uyum yeteneği olsa da, zamanlama etkisi ve yapısal hasarın ortaya çıkmasına göre hafif, orta ya da şiddetli olarak sonuçlanır (Kratsch and Wise, 2000). Bitkiler soğuk stresinden etkilenmelerine göre 3 gruba ayrılırlar; soğuğa hassas olanlar (12°C'nin altındaki sıcaklıklardan zarar görürler), soğuğa dayanıklı fakat dona duyarlı olanlar (12°C'nin altındaki sıcaklıklara uyum sağlayabilir, fakat donma sıcaklıklarında hayatta kalamazlar) ve dona dayanıklı olanlar (donma sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda hayatta kalabilirler ve bu sıcaklıklara uyum sağlayabilirler). Soğuk (üşüme) ve donma streslerinin doğası

farklıdır. Soğuk stresi hücreler üzerine düşük sıcaklığın doğrudan etkisidir. Donma ise dolaylı olarak rol oynar, hücreleri buz oluşumu ile hasara uğratar (Pearce, 1999).

2.6.1. Soğuk (Üşüme) stresinin bitkiler üzerine etkileri

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

On iki derecenin altındaki sıcaklıklarda meydana gelen soğuk (üşüme) hasarı, bitkinin soğuğa maruz kalmasıyla tetiklenen fiziksel ve fizyolojik değişikliklerdir. Fizyolojik değişiklikler birincil (primer) ve ikincil (sekonder) olarak düşünülür. Birincil hasar, bitkide bir fonksiyon bozukluğuna neden olan ilk hızlı tepkidir. Fakat, bu fonksiyon bozukluğu geri dönüşümlü olup sıcaklığın normal koşullara yükselmesi sonucunda kolayca düzelebilir. İkincil hasar, birincil hasarın bir sonucu olarak oluşan fonksiyon bozukluklarıdır. Geri dönüşümlü olmayabilir. Karakteristik soğuk hasarının görsel belirtileri, ikincil soğuk hasarından kaynaklanır. Soğuk hasarının belirtileri, bitkinin maruz kalma süresinin artması ve sıcaklığının azalmasıyla artar (Rab and Saltveit, 1996).

Soğuk hasarı belirtileri; sıcaklığa, maruz kalma süresine, bitkiye (genotipe), bitkinin gelişim evresine, soğuk uygulanan dokuya, rüzgara, suya, besinlere ve ışık gibi diğer çevresel koşullara bağlı olarak değişir (Saltveit and Morris, 1990).

Genel olarak soğuk hasarı belirtileri bitki büyüme hızının azalması, yaprak genişliğinin azalması, hücresel otolizin ve yaşlanmanın artması, programlanmış hücre ölümleri, ışıkta fotooksidasyonun sonucu olarak klorofilin kaybı nedeniyle klorozis oluşumu, hücre zar yapılarının bozulması ve bunun sonucunda hücresel bütünlüğün bozulması, protoplazmik akışın en az düzeye inmesi ve nekrozis olarak özetlenebilir (Kratsch and Wise, 2000; Mahajan and Tuteja, 2005).

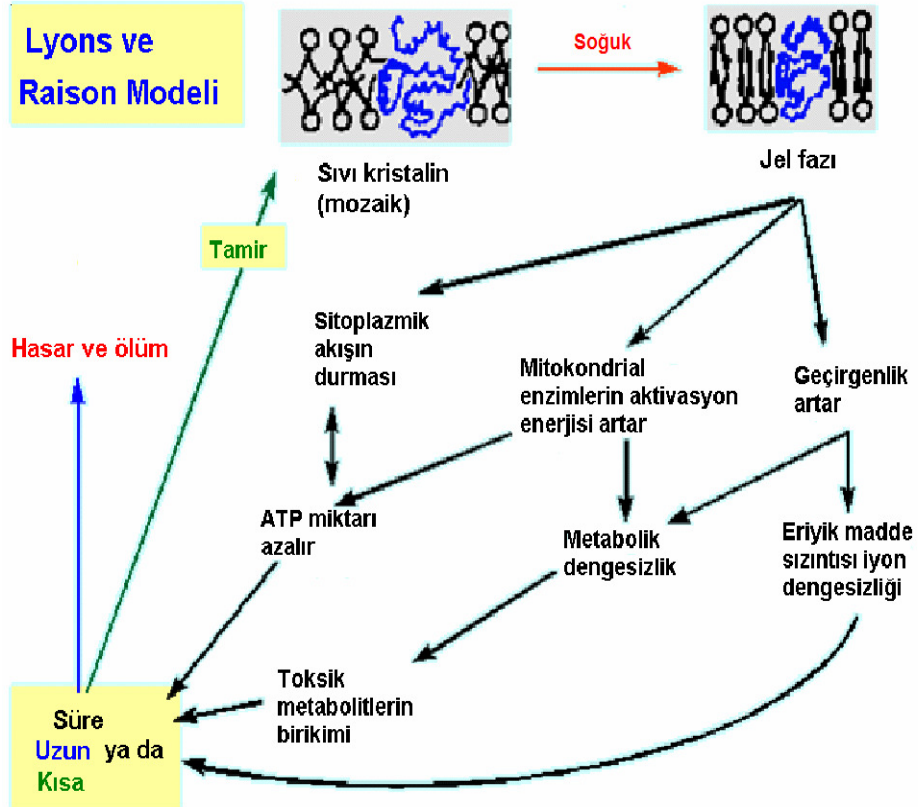
2.6.1.1. Soğuk stresinin hücresel düzeyde etkileri

2.6.1.1.1. Soğuk stresinin hücre zarı üzerine etkisi

Soğğun bitkiye en kötü etkisi hücre zarı hasarına yol açmasıdır. Bu hasar büyük ölçüde dehidrasyon nedeniyledir. Hücre zarı lipidleri soğuk duyarlılığında ya da dayanıklılığında önemlidir (Mahajan and Tuteja, 2005). Birçok farklı bitkinin hücre zarlarından izole edilen lipid içerikleri ortak özelliklere sahiptir; fakat bitki organel zarlarıyla (örn; mitokondri zarı, kloroplast zarları) karşılaştırıldığında hücre zarı lipid içeriği tamamiyle farklıdır. Hücre zarı karakteristik olarak yüksek oranda fosfolipid, serbest ve glikozlanmış sterol ve serebrosidler (monoglikosilseramidler) içerirler. Mitokondri zarı, kloroplast zarları ve tilakoidleri içeren diğer hücre zarları (organel zarları) steroller ve serebrosidleri içermezler. Tüm hücre zarları aynı lipid çeşitlerine sahip olsa da fosfolipid, sterol ve serebrosid oranları farklı bitki türleri arasında oldukça değişiktir. Soğukla muamele sırasında hücre zarının lipid içeriğinde bir dizi değişiklik meydana gelir. Öncelikle birçok türde ortak olarak, hücre zarının fosfolipid oranında artış gözlenir. İkinci olarak, artan soğuk stresi uygulamasında soğuk dayanıklılığının maksimum olduğu seviyede hücre zarındaki serebrosidlerin oranı azalır, fakat azalmanın miktarı bitki türlerine göre çeşitlilik gösterir (Uemura and Steponkus, 1999).

Türler arasında hücre zarı yağ asidi doygunluğu ve soğuk duyarlılığı birbirleriyle ilişkilidir. Hücre zarı lipidlerinin faz ve akışkanlık özellikleri yağ asidi doygunluk derecesinden etkilenir. Zar lipidleri iki çeşit yağ asidinden oluşur: doymamış ve doymuş yağ asidi. Doymamış yağ asitleri iki karbon atomu arasında bir ya da daha fazla çift bağ içerirler (-CH=CH-), oysa doymuş yağ asitlerinin karbon atomları tamamıyla H atomlarıyla doyurulmuştur (-CH₂-CH₂-). Doymuş yağ asidi içeren yağlar, doymamış yağ asidi içeren yağlardan daha yüksek sıcaklıklarda katılaşırlar. Bu yüzden, zardaki doymamış yağ asitlerinin bağıl oranı zar akışkanlığını önemli derecede etkiler. Zarın yarı kristalin (sıvı-mozaik) fazdan jel fazına değiştiği sıcaklık, geçiş sıcaklığı olarak bilinir. Soğğa duyarlı bitkiler daha yüksek doymuş yağ asidi oranına ve böylece daha yüksek geçiş sıcaklığına sahiptirler. Bu durum soğuk duyarlı bitkilerin zarlarının sıvı mozaik fazdan katı jel fazına geçme eğilimini arttırmakta ve zar sızıntılarına neden olmaktadır. Diğer bir taraftan soğuk dayanıklı türler daha yüksek doymamış yağ asidi oranıyla göze çarparlar ve daha düşük bir geçiş sıcaklığına sahiptirler (Mahajan and Tuteja, 2005; Bakht et al., 2006; Uemura et al., 2006; Wang et al., 2006).

Düşük sıcaklık hücre zarlarındaki fosfolipid moleküllerinin açıl kuyrukları tarafından algılanır ve sıvı mozaik fazdaki bölge (domain)'ler jel fazı domainlerine dönüşür. Jel fazı domainleri sıkı ve düşük kinetikli lipidleri ve sert paketlenmiş açıl zincirlerini içerir. Düşük sıcaklığın algılanmasıyla fosfolipidlerin polar başları birbirine yaklaşır. Zar çift tabakasında bir jel faz domaininin bulunması dahi integral zar proteinlerinin doğru fonksiyon göstermesini engeller ve zar etkili geçirgenlik özelliğini devam ettiremez (Lyons, 1973; Bakht et al., 2006). Düşük sıcaklığın zar lipidlerinin faz özellikleri üzerine bu etkisi yüzünden turgorun kaybı, sitoplazmik sıvı sızıntısı meydana gelir ve hücre bütünlüğü bozulur (Martz et al., 2006). Devam eden stres ise enerji metabolizmasının eksikliği, fotosistemlerin bozulması, hücre otolizi ve ölüm gibi hasarların birbiri ardına oluşmasına neden olur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Soğuk hasarı modeli (Lyons, 1973).

2.6.1.1.2. Soğuk stresinin organeller üzerine etkisi

Soğuk stresinde ilk ve en şiddetli etkilenen organel kloroplasttır. Tipik olarak soğuk hasarının belirtileri kloroplast şişmesi, tilakoidlerin biçim değiştirmesi ve şişmesi,

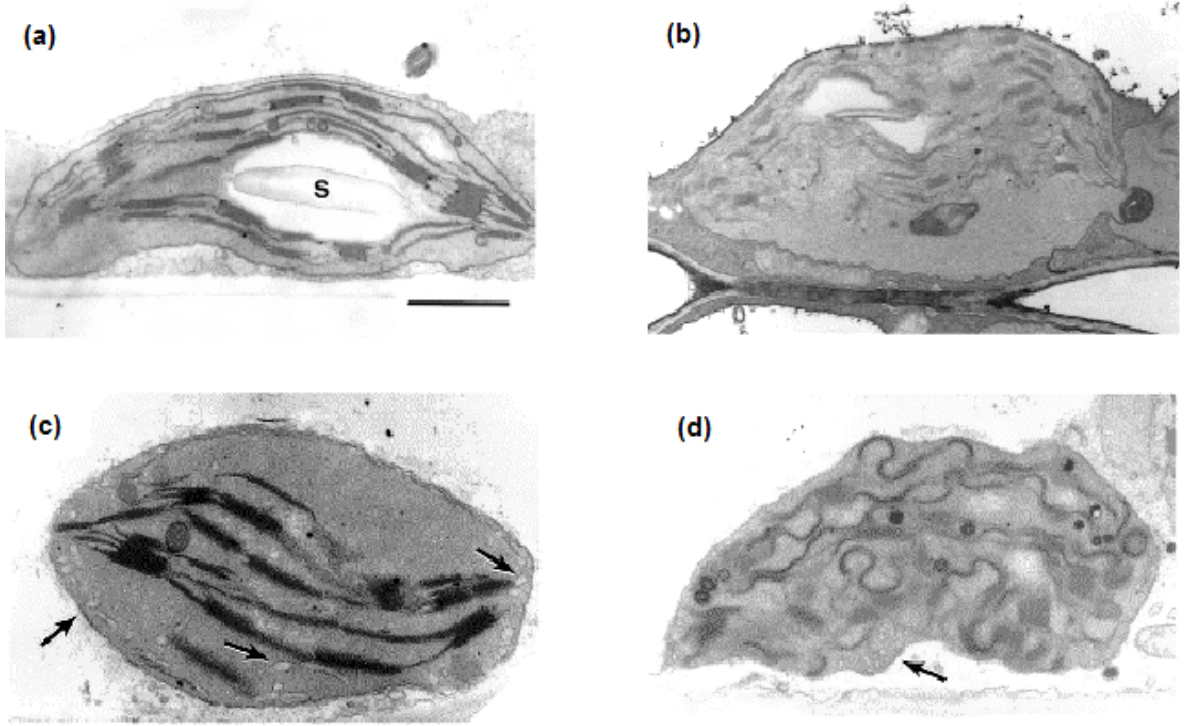
nişasta granüllerinin boyutunda ve sayısında bir azalma ve kloroplast zarından periferal retikulum denilen küçük çıkıntıların oluşumudur (Kratsch and Wise, 2000).

Kloroplast şişmesi, soğğun hücrel etkileri çalışmalarında hemen hemen evrensel bir belirti olup, stromal osmolitlerdeki artış ile kendini gösterir (Sfakianaki et al., 2006).

Kloroplast şişmesine yol açan ve osmotik olarak aktif olan ajanlar nişasta bozulma ürünleriyle ilişkilidir. Nişasta soğuk stresi sırasında çözünür şekerlere dönüştürülür (Kaplan et al., 2006) ve bu nedenle yaprak çözünür şekerleri soğuk stresinde artma eğilimindedirler (Strand et al., 1997; Nayyar et al., 2005a). Nişasta granülleri soğuk-dayanıklı olan ve hatta soğuk duyarlı türlerde bile, kloroplastik amilazlar tarafından çözünür ve şekerlere yıkılırlar (Şekil 2.3 b-d) (Kratsch and Wise, 2000).

Tilakoid zarlar yüksek organizasyonlu bitkilerde 4 gliserolipid içerirler. Bunlar monogalaktosil diaçil gliserol, digalaktosil diaçilgliserol, sülfokinovosil diaçilgliserol ve fosfatidilgliseroldür. Fosfatidilgliserol (PG) bitkinin düşük sıcaklığa duyarlılığı ile yakından ilişkilidir. Tilakoid zarlardaki fosfatidilgliseroller türleri daha yüksek erime sıcaklığına dolayısı ile daha yüksek donma sıcaklığına sahip olup, soğuk duyarlı türlerde, soğuk dayanıklı türlerde olduğundan daha yüksektir (Xu et al., 2003). Ayrıca, soğuk stresi sırasında fotooksidatif koşullar yüzünden tilakoid genişlemesi meydana gelir. Soğuk duyarlı bitkiler ışıpta soğuk uygulaması sırasında şiddetli fotooksidasyona uğrarlar ve tilakoid genişlemesi bu gibi çevresel koşullar altında ortak bir belirtidir (Şekil 2.3 b). Tilakoid genişlemesi paraquat (PQ) ve antrazin gibi fotooksidatif herbisit uygulamalarında da görülür (Kratsch and Wise, 2000).

Kloroplastta periferal retikulum genellikle soğuk hasarının bir sonucu olarak ortaya çıkar (Şekil 2.3 c-d). Taşıma kapasitesinde soğukla indüklenmiş bir azalma olduğunda kloroplast iç zarının yüzey alanını arttırmak için periferal retikulum gelişir. Periferal retikulum, metabolitlerin kloroplast içine veya dışına hızlı taşınımında görev alır ve Ca^{+2} iyonlarının tutunmasında da rol oynar. Periferal retikulum düşük sıcaklıklara uyum sırasında kloroplast zarından tilakoidlere yağların ve tilakoid bileşenlerinin taşınımını arttırmaya hizmet eder (Kratsch and Wise, 2000).



Şekil 2.3. Soğuk duyarlı bir bitkinin kloroplastlarındaki soğuk hasarı belirtileri. (a) optimum koşullardaki bitkinin kloroplastı. (b) yüksek ışık şiddetinde 9 saat 5°C'ye (c) karanlıkta 72 saat 5°C'ye (d) 144 saat 5°C'ye ve bunun 16 saati yüksek ışığa maruz bırakılmış kloroplastı. (s) nişasta granülünü, oklar ise periferik retikulumu göstermektedir (Kratsch and Wise, 2000).

Mitokondri, kloroplastın aksine soğuk stresine daha dayanıklıdır ve sadece soğuğa karşı aşırı duyarlı bitkilerin mitokondrileri düşük sıcaklıklardan görünür şekilde etkilenir. Aşırı duyarlı türlerde, (örneğin mısır), mitokondri zarının fiziksel durumunun değiştiği ve bu nedenle sitokrom c oksidaz aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (De Virville et al., 2002).

Nukleus, düşük fakat donma derecesinde olmayan sıcaklık stresinde nadiren görünür değişikliklere uğrar. Aşırı duyarlı bitkilerin soğuk stresine maruz bırakılmış hücre kültürlerinde kromatinin yoğunlaşması (Yun et al., 1996), kromatin ve çekirdekçiklerdeki parçalanma nedeniyle çekirdekte meydana gelen şişme ve mikofilamentlerde yığılma gözlenmiştir (Ishikawa, 1996). Tüm bunlara ek olarak, düşük sıcaklıklara maruz kalan hücrelerde golgi vezikülleri genişler ve endoplazmik retikulum irileşir (Ishikawa, 1996).

2.6.1.2. Soğuk stresinin bitki organları üzerine etkileri

Soğuk duyarlı fidelerin, 10°C'nin altında donma derecesinde olmayan sıcaklıklara maruz bırakılması kök iletiminin ve su alınımının azalmasına, kök ucunun düşmesine (abortion) ve kök büyümesinin azalmasına neden olur (Rab and Saltveit, 1996; Aroca et al., 2001). Kökler, rizomlar ve soğanlar soğuğa, toprak üstü organlarından daha duyarlıdır, fakat toprağın soğuğu hafifletme kapasitesi nedeniyle tarladaki bu dokular sürgünlerin maruz kaldığı soğuğa maruz kalmazlar. Bununla birlikte, deneyler saksıda yapıldığında bu hafifletici etkinin ortadan kalktığı gösterilmiştir (Fennell and Markhart, 1998).

Soğuk hasarının ilk belirtilerinden biri de kökten su alımı ve transpirasyon arasındaki dengenin değişmesi nedeniyle meydana gelen gövde dehidrasyonudur (Vernieri et al., 2001). Ayrıca, kökte olduğu gibi gövdede de büyüme hızı azalır. Soğuk uygulaması sonucu bitkilerin yaprak genişliği azalır. Daha şiddetli soğuk stresi hücresel otolizi ve yaşlanmayı artırır. Otoliz ve yaşlanma tüm dokuda ya da dokuların yüzeyinde lezyonlara sebep olabilir. Fakat bu lezyonlar genellikle hücre çöküşüne bağlı olarak yaprak epidermisinde çukur ya da batık alanları olarak görülmektedir. Soğuk stresi sırasında, ışıkta fotooksidasyon sonucu klorofilin bozulması nedeniyle yapraklar sararır (klorozis) ve nekrozis görülür (Saltveit and Morris, 1990).

Düşük sıcaklıklara en duyarlı organlar üreme organlarıdır. Soğuk çiçek indüksiyonunu, polen üretimini ve çimlenme zamanını olumsuz etkileyebilir ve bazı duyarlı türlerde çiçek açma zamanında düşük sıcaklığa maruz kalma, kısırlığa neden olabilir.

2.6.1.3. Soğuk stresinin bitkinin gelişim evreleri üzerine etkileri

Düşük sıcaklıklardan etkilenen bitkilerde soğuğa duyarlılık, bitkinin gelişim evresine bağlıdır (Çizelge 2.4). Tohum, düşük nem içeriği ve dinlenme halinde (dormant) olması nedeni ile uzun süreli düşük sıcaklıklara çok dayanıklıdır. Suyun tohumla buluşmasıyla birlikte tohum, soğuk duyarlı hale gelebilir. Soğuk, suyun emilimini geciktirir (Bois et al., 2006) ya da ilk emilimi sırasında zar bütünlüğünü bozar, elektrolit sızıntısını artırır ve çimlenmeyi önler.

Belirme ve erken fide gelişim evreleri düşük sıcaklıklardan önemli şekilde etkilenirler. Büyüme ve gelişme baskılanır, hatta aşırı duyarlı türlerde tepe tomurcuğu zarar görür (Prasad et al., 2006). Vegetatif evrede fideler genellikle soğuğa olgun bitkilerden daha duyarlıdır.

Reprodaktif evrenin her safhası (üreme organlarının oluşumu, çiçeklenme ve tohum oluşumu) soğuk stresine duyarlıdır. Düşük sıcaklıklarda polen çimlenmesi ve polen tübü oluşumu baskılanır (Clarke and Siddique, 2004). Çiçeğin erkek ya da dişi kısımlarında soğuk stresi nedeni ile meydana gelen herhangi bir bozukluk çiçek dökülmesine sebep olur (Nayyar et al., 2005b).

Çizelge 2.4. Soya fasulyesinin (*Glycine max*) gelişim evreleri için kritik eşik sıcaklıkları (Holmberg, 1973).

Gelişim evresi	Minimum sıcaklık (°C)
Çimlenme	6-7
Ortaya çıkma (belirme)	8-10
Üreme organlarının oluşumu	16-17
Çiçeklenme	17-18
Tohum oluşumu	13-14
Olgunlaşma	8-9

2.6.2. Soğuk stresinin fotosentez üzerine etkileri

Fotosentez, ışık enerjisini biyokimyasal olarak kullanılabilen kimyasal potansiyel enerjiye (ATP) ve redoks potansiyel enerjiye (NADPH) kloroplast tilakoid zarlarının bileşenleri aracılığıyla dönüştüren başlıca mekanizmadır. Fotosentezin birincil reaksiyonları sıcaklık bağımsızdır ve ışık enerjisini yakalamak ve bu enerjiyi redoks potansiyel enerjiye aktarmak için fotosistem (PS) I ve PSII tarafından

katalizlenirler. Buna karşılık, sıcaklık bağımlı biyokimyasal reaksiyonlar bu redoks potansiyel enerjisini kararlı NADPH formuna dönüştürür (Paul and Foyer, 2001; Ensminger et al., 2006). Bu sıcaklık bağımlı reaksiyonlar düşük sıcaklık stresi koşullarında inhibe olurlar (Allen and Ort, 2001; Foyer et al., 2002).

Düşük sıcaklıklar kinetik etkiler yüzünden tüm metabolik reaksiyonları yavaşlatır. Ancak, özellikle fotosentez açısından iki duyarlı metabolik reaksiyon vardır; bunlar CO₂ fiksasyonu ve stoma açıklığını düzenleyen reaksiyonlardır. Bu nedenle, stomanın su kaybını düzenleme yeteneğinin ve CO₂ değişiminin engellenmesi yaprakların düşük sıcaklıklara maruz kalmalarının iki önemli sonucudur. Kök hücre zarlarının su geçirgenliğinin azalması nedeni ile stoma açıklığı düşük sıcaklıklarda genellikle azalır (Vernieri et al., 2001). Düşük sıcaklıklarda fotosentez ve transpirasyon ağı arasında karşılıklı bir ilişki birçok bitkide gözlemlenmiş olsa da, azalan stoma kontrolü azalan fotosentezin tek nedeni değildir. Alternatif olarak hasar CO₂ fiksasyonunda yer alan enzimlerde (Allen and Ort, 2001), fotosentezin geri bildirim inhibisyonunu sağlayan şekerlerin yapraklardan havuzlara yer değiştirmesinde ve/veya yavaş stomatal karşılık verme ya da köklerin su geçirgenliğinin azalması nedeniyle değişen su ilişkileri yüzünden (Yang et al., 2005b) meydana gelebilir.

2.6.2.1. Fotoinhibisyon

Işıқта düşük sıcaklık koşulları altındaki fotosentetik aygıtlar kimyasal enerji için gerekenden fazla foton yakaladıklarında, PSII boyunca elektron taşınımı inhibe edilir (Sfakianaki et al., 2006). Fotosentezin inhibe olmasına *fotoinhibisyon* denir. Bu inhibisyon ise PSII'nin D1 reaksiyon merkez proteininin degradasyonuna neden olur (Szilárd et al., 2005), bu durum fotohasar olarak adlandırılır.

Fotosentezin fotoinhibisyonu, düşük sıcaklıklara erken bir cevaptır ve sıcaklıklar düştükçe artar. Bu artışın asıl nedeni, düşük sıcaklıklarda eksitasyon enerjisinin karbon metabolizmasında kullanılmasındaki azalmadır. Fotoinhibisyon ışığın bitkiler için aşırı olduğu durumlarda meydana gelir. Sıcaklığın düşmesiyle Calvin döngüsündeki enzimlerin aktivitesi de düşer, sonuçta kullanılan fotonlarda bir düşüş ve fotoinhibisyonda bir artış meydana gelir. Soğuğa maruz kalma orta ya da

yüksek ışık yoğunlukları ile beraber meydana gelirse, fotosentezde soğuk hasarı çok daha şiddetli olur .

Düşük sıcaklıklar, CO₂ fiksasyonu gibi işlemlerde kimyasal enerji talebini azaltarak fotosistemlerin aşırı eksitasyonunu destekler. Fazla eksitasyon enerjisi ışıktan oksijene transfer edilir, böylece PSII'nin reaksiyon merkezindeki D1 proteininde fotooksidatif hasar meydana gelir. Aktive olmuş oksijeni uzaklaştıracak enzimlerin aktiviteleri düşer, bunun nedeni düşük sıcaklıklarda bu savunma sistemlerinin azalmasıdır. Örneğin, katalaz soğuk duyarlı bitkide düşük sıcaklıklarda fotoinaktive edilmiştir (Lukatkin, 2002). Bu durum, hidrojen peroksit birikimine ve aktif oksijenin degradatif reaksiyonları başlattığı diğer kloroplast ya da sitozol bölgelerine kaçmasına izin verir.

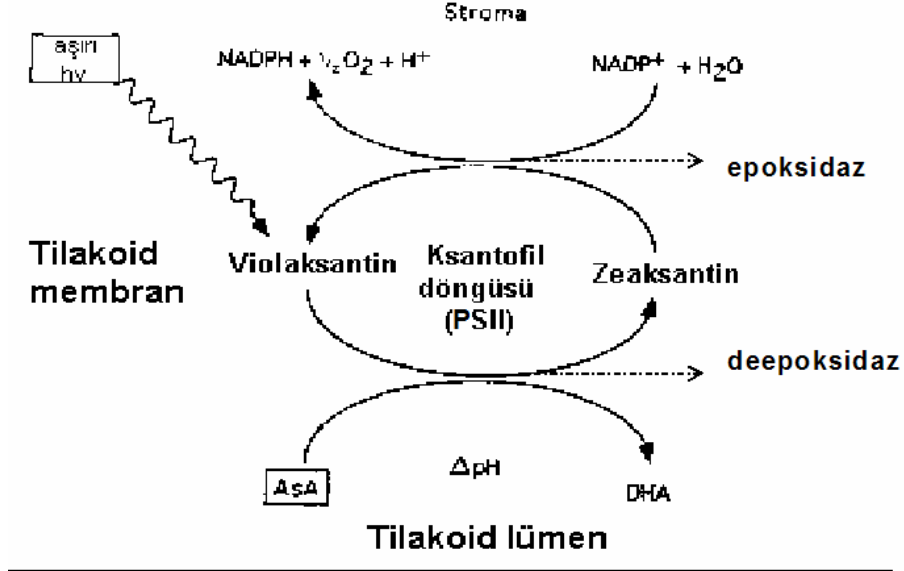
Düşük sıcaklıklar PSII'nin tamirini engeller. Reaksiyon merkezindeki D1 proteininin kendini onarması (turnover) düşük sıcaklıklarda yavaştır (Hull et al., 1997; Szilárd et al., 2005) ve bu nedenle bu proteinin yeni PSII kompleksi içindeki yerleşimi bloke edilir.

Düşük sıcaklıklar zeaksantin oluşumunu inhibe eder. Zeaksantin normalde PSII'nin anteninde eksitasyon enerjisini yakalar ve bunu ısı olarak dağıtır (Hirotzu et al., 2004). Ksantofil döngüsünde violaksantin, violaksantin deepoksidaz varlığında zeaksantine dönüşür (Şekil 2.4) (Logan et al., 2006). Zeaksantin violaksantinden üretimi normal koşullar altında yüksek ışık ve düşük tilakoid lümen pH'sı ile indüklenir, fakat bu işlem düşük sıcaklıklarda bloke edilir (Alscher et al., 1997; Hull et al., 1997; Pasini et al., 2005).

Tilakoid membran üzerindeki inhibisyonda zeaksantin aşırı eksitasyon enerjisini ısı enerjisine dönüştürme işlemi, hem ışıpta hem de karanlıkta düşük sıcaklık nedeniyle inhibe edilir (Flexas et al., 1999) ve ışık varlığında PSII'nin D1 proteini degradasyona uğrar (Bertamini et al., 2005; Ohira et al., 2005) (Şekil 2.5).

Stromadaki karbon indirgenmesi ise, hem ışıpta hem de karanlıkta düşük sıcaklığa bağlı olarak rubisco aktivitesinde meydana gelen azalma nedeniyle inhibe edilir (Şekil 2.5). Sitozolda karbohidrat kullanımının inhibe edilmesi, ışıpta ve düşük sıcaklıkta fonksiyonu bozulan sükroz fosfat sentaz nedeniyledir (Foyer et al., 2002). Bu enzim, stromadan sitozole taşınan tiroz fosfatları sükroz ve inorganik

fosfata ayırır. Fakat aktivitesinin bozulması tiroz fosfatların birikimine neden olur ve böylece son ürün inhibisyonu yaratarak fotosentezi baskılar (Bertamini et al., 2005) (Şekil 2.5).



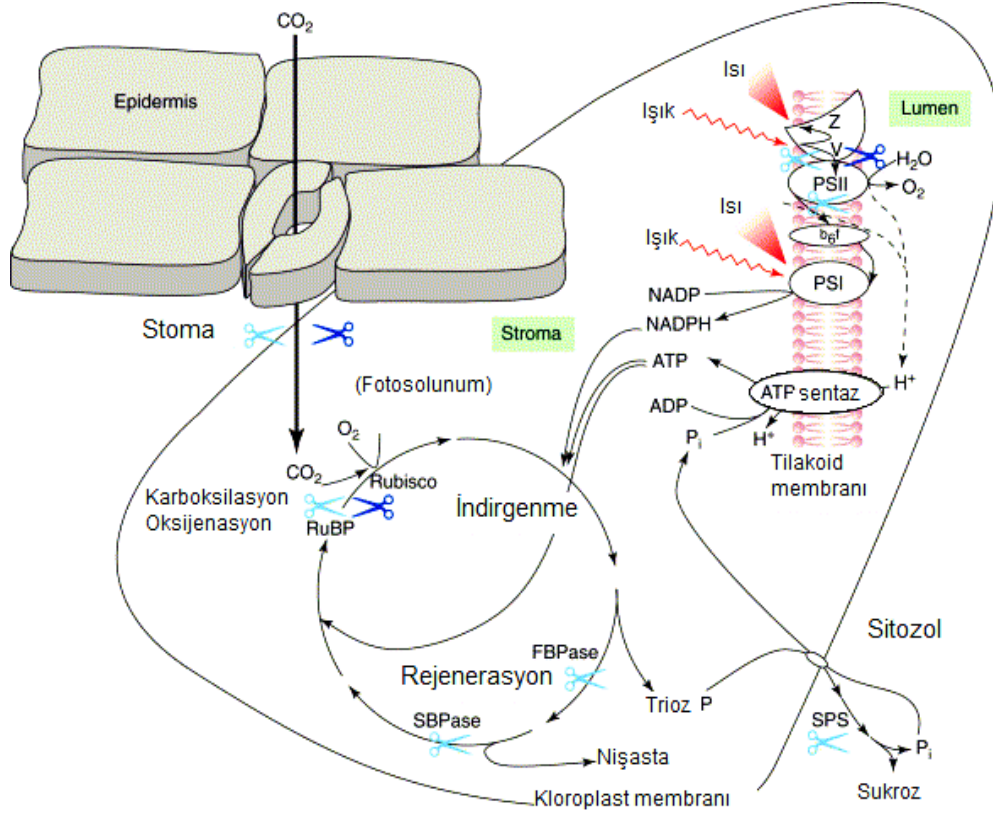
Şekil 2.4. Ksantofil döngüsü ve enerjinin fotokimyasal olmayan dağılımı. Aşırı ışık koşullarında violaksantin, PSII'de askorbatı kullanarak deepoksidasyonla zeaksantine dönüşür. Violaksantin daha sonra epoksidasyonla zeaksantinden tekrar oluşur (Alscher et al., 1997).

Soğuk (üşüme) stomaların hem ışıkta hemde karanlıkta kapanmasına neden olur. Soğuk ile indüklenen stoma kapanmasının iki nedeni vardır. Birincisi, mezofil fotosentezinin doğrudan inhibisyonu, içsel olarak CO₂'nin artışına ve sonuçta da stomaların kapanmasına neden olur. İkinci neden, su sıkıntısı olabilir, çünkü soğuk ile köklerde hidrolitik iletkenlik azalır ve topraktan su alımı önemli derecede inhibe olur ve su kaybını önlemek için stomalar kapanabilir (Yang et al., 2005b). Stomanın kapanması içsel CO₂'nin azalmasına ve fotosentezin inhibisyonuna neden olur (Şekil 2.5).

2.6.2.2. Fotooksidatif stres

Düşük sıcaklık gibi birçok çevresel stres, absorblanan ışık enerjisi ve yararlanılan ışık enerjisi arasındaki dengeyi bozar. Bu durum O₂'nin indirgenmesi yerine singlet O₂ (¹O₂) yani reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına neden olur (Logan et al.,

2006). ROS'un ışık-bağlı meydana gelmesine *fotooksidatif stres* denir. Bu olay iki yolla meydana gelebilir: 1- fotosentetik aktivitenin bir sonucu olarak enerjinin ya da elektronların doğrudan oksijene aktarılması, 2- dokuların ultraviyole ışımaya maruz kalması.



Şekil 2.5. Soğuk-duyarlı bitkilerde, kısa soğuk uygulaması periyodunun, ışıkta ve karanlıkta fotosentez üzerine birincil etkileri. Soğuk etkileri; tilakoid membranlardaki fotofosforilasyonda, stromadaki karbon redüksiyon döngüsünde, sitozoldeki karbohidrat kullanımında ve stomalardan kloroplasta doğru olan CO₂ miktarında ortaya çıkar (Allen and Ort, 2001).

Kısaltmalar: ATPsentaz, kloroplast ATPsentaz; b_{6f}, sitokrom b_{6f} kompleksi; FBPase, kloroplast fruktoz 1,6-bisfosfataz; P_i, inorganik fosfat; PSI, fotosistem-I kompleksi; PSII, fotosistem-II kompleksi; RuBP, ribuloz 1,5-bisfosfat; SBPase, sedoheptuloz 1,7-bisfosfataz; V, violaksantin; Z, zeaksantin; açık mavi makaslar ışıkta soğğun birincil etkilerini; koyu mavi makaslar, karanlıkta soğğun birincil etkilerini göstermektedir

Fotosentez sırasında reaktif oksijen türlerinin oluşumu birçok bileşen ile en aza indirgenir ve fotooksidatif stres düzenleyici mekanizmalarla giderilir. Reaktif oksijen

türleri üretildiklerinde hızlı ve verimli antioksidatif sistemler ile hızlıca yok edilir (Leipner et al.,1997; Foyer and Noctor, 2005).

2.6.3. Soğuk stresi ve oksidatif stres

Bitkiler, diğer fotosentetik organizmalar gibi, atmosferik oksijenin varlığında gelişirler; oksijenin büyük enerji potansiyelini kullanabilmek ve aynı zamanda bu oksidantın ve reaktif oksijen türleri olarak bilinen O_2 'den türemiş aktif moleküllerin yıkıcı etkilerini sınırlayabilmek için metabolik yollar geliştirmişlerdir (Navrot et al., 2007). Reaktif oksijen türleri [süperoksit molekülü ($O_2^{\cdot-}$), singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri (OH^{\cdot})] normal hücre metabolizması ürünleridir ve savunma mekanizmaları tarafından ortamdaki uzaklaştırılırlar (Scandalios, 2001). Normal koşullar altında ya da çeşitli streslere (soğuk ve donma, kuraklık, kuruma, sel, herbisit uygulamaları, patojen saldırılar ve radyasyon) maruz kalma sırasında hem kloroplast hem de mitokondri ROS üretir. Elektron taşıma zincirindeki aksaklıklara bağlı olarak CO_2 fiksasyonundaki kısıtlamalar kloroplastlarda ROS oluşumunun esas nedenidir. Mitokondride ise benzer olarak stres koşulları altında elektron taşıma zincirinde meydana gelen aksaklıklar ROS üretiminin başlıca mekanizmasıdır (Davidson and Schiestl, 2001; Suzuki and Mittler, 2006). ROS zar lipidlerinin peroksidasyonuna, DNA zincirlerinin kırılmasına ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olur (Cheng and Song, 2006).

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

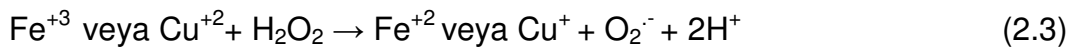
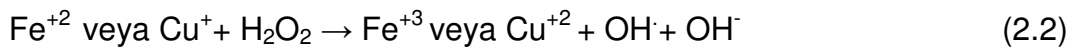
Genellikle kloroplastlar fotooksidasyon nedeniyle reaktif oksijen türlerinin ana kaynağıdır, fakat fotosentetik olmayan dokulardaki, diğer elektron taşıma sistemleri de ROS oluşumuna katkıda bulunabilirler. Örneğin; mitokondri, düşük sıcaklıklarda soğuk duyarlı bitki dokularındaki süperoksitin ana kaynağıdır ve antioksidant sistemlerdeki azalma sonucu organellerde hidrojen peroksit birikimine neden olur (Purvis et al., 1995; Zykova et al., 2002).

2.6.3.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Oksijenin tek elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan ilk oksiradikal ürün, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hücrede meydana gelen reaksiyonlar nedeniyle diğer reaktif oksijen türlerini, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi, oluşturabilir (Şekil 2.6) (Alscher et al., 1997). Süperoksit negatif yüklü bir moleküldür ve bu nedenle biyolojik zarlardan geçemez. Bu radikal kloroplastlarda meydana gelen Mehler reaksiyonu ve/veya mitokondrideki elektron sızıntıları sonucu oluşur. Orta dereceli reaktivite gösterir fakat devamında oluşturduğu hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri hasarın oluşmasında etkindir. İki molekül süperoksit radikali süperoksit dismutaz antioksidant enzimi ile ortamdaki uzaklaştırılır.



İki molekül süperoksit radikalinden meydana gelen hidrojen peroksit (H_2O_2) (Şekil 2.6) DNA kırılmalarına, protein denatürasyonlarına ve aynı zamanda kloroplast stromasının tioredoksin enzimleri gibi tiol içeren enzimlerin inaktivasyonuna neden olur ve bitki hücreleri için çok toksiktir (Hagar et al., 1996). Yüksüz bir moleküldür ve difüzyonla yer değiştirebilir. H_2O_2 , kloroplast ve mitokondride fotokimyasal ve solunum olayları sonucu oluşur. Ayrıca peroksisomlarda fotosolunum sırasında glikolat gliksilik aside yükseltgendiğinde de üretilir (Mittler et al., 2004). Hidrojen peroksitin ortamdaki uzaklaştırılmasını katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve peroksidaz (POD) enzimleri sağlar. Düşük sıcaklıklar, artan süperoksit radikali ve azalan antioksidant enzim aktiviteleri nedeniyle hücrede H_2O_2 birikimini indükler (O’Kane et al., 1996). Hidrojen peroksit Fenton reaksiyonu ile hidroksil ya da süperoksit radikale dönüştürülür (Bolwell and Wojtaszek, 1997).



Hidroksil radikalleri ya doğrudan suyun radyasyon veya ultraviyoleye maruz kalarak iyonize olmasıyla ya da hücredeki çeşitli reaksiyonlar sonucunda oluşurlar. Son derece reaktifler ve biyolojik açıdan önemli makromoleküllerin tüm çeşitlerinde, özellikle nükleik asitlerde, hasara neden olurlar. Demir ya da bakır

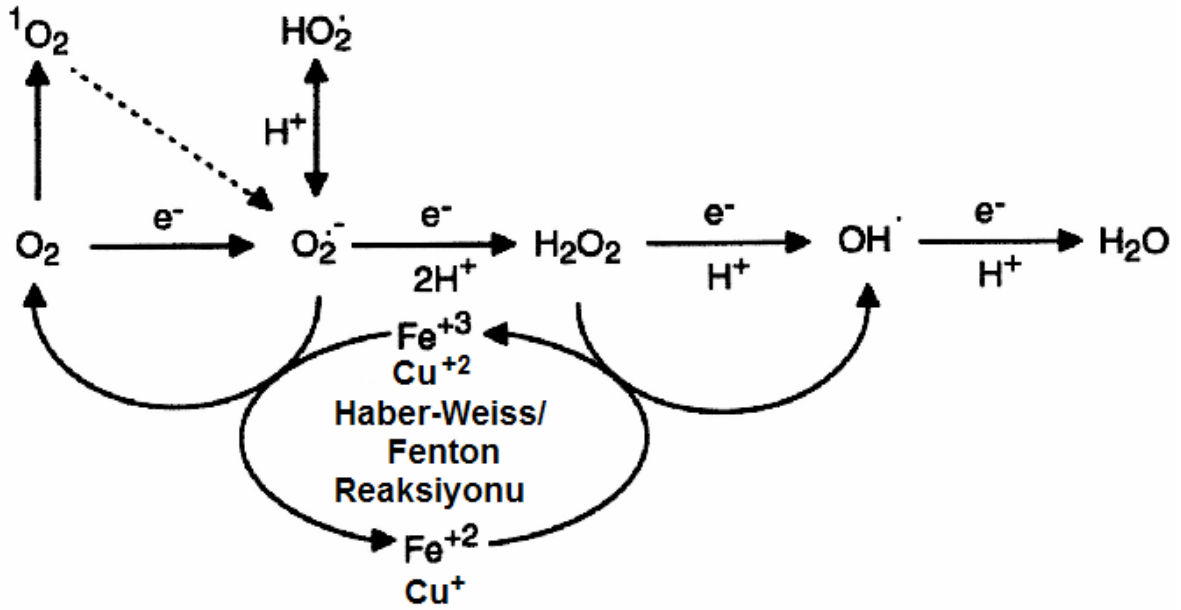
gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikali çok hızlı oluşur. Kloroplastlarda bakır ya da demirin varlığında oksijen dönüşüm aktivitesindeki hızlı azalmanın başlıca nedeninin bakır ya da demir ile katalizlenen Haber-Weiss mekanizmasıyla süperoksit iyonundan hidroksil radikallerinin oluşmasıdır (Şekil 2.6) (Yruela et al., 1996).



Singlet oksijen (1O_2) özellikle kloroplastlarda stres koşulları sırasında açığa çıkan aşırı eksitasyon enerjisinin O_2 'ye iletilmesi sonucunda oluşur (Şekil 2.6). Diğer ROS gibi reaktiftir ve elektronlarını verme eğilimindedir. Oluştuktan hemen sonra karotenoidler tarafından yok edilirler.

2.6.3.2. Reaktif oksijen türlerine karşı geliştirilen savunma mekanizmaları

Hüresel zar ve organelleri reaktif oksijen türlerinin zarar verici etkisinden korumak için bitkilerde antioksidant sistemleri oldukça önemlidir (Lee and Lee, 2000). Soğuk stresi gibi çevresel stresler metabolik fonksiyon bozukluklarına ve ROS üretiminin artmasına neden olurlar. Zararlı reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu için gereken yüksek verimli antioksidant savunma sistemleri tüm bitki hücrelerinde bulunur (Seppänen and Fagerstedt, 2000). Bu antioksidant savunma sistemleri enzimatik ve enzimatik olmayan olarak sınıflandırılır (Hernández-Nistal et al., 2002). Enzimatik savunma sistemleri süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), peroksidaz (POD), glutatyon redüktaz (GR) ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) enzimlerinden oluşurken, enzimatik olmayan savunma sistemlerini askorbat (AsA), glutatyon, karotenoid, α -tokoferol, antosiyanin ve flavonoidler oluşturur (Choi et al., 2002). Antioksidant savunma sistemlerinin stres koşullarına verecekleri cevaplar tamamıyla bitki türüne, stres çeşidine ve stresin uygulanma süresine bağlıdır. Sıcaklıktaki düşüşün enzimler üzerine etkisi, substrat doygunluğunda maximum katalitik aktivitedeki değişim olarak ifade edilir. Bu nedenle, düşük sıcaklıklar reaktif oksijen türlerini uzaklaştıran enzim sistemleri ve antioksidant metabolitler yoluyla sağlanan korumayı azaltır (Hull et al., 1997).



Şekil 2.6. Moleküler oksijenden (O_2) türeyen ROS'ların kendi içlerindeki dönüşümleri. O_2 aşırı enerjiyle çiftleşmemiş elektronlardan birinin ters dönmesi sağlanarak aktive edilebilir ve singlet oksijen oluşur (1O_2). Alternatif olarak, bir elektronun indirgenmesi süper oksit ($O_2^{\cdot -}$) radikalinin oluşumuna neden olur. $O_2^{\cdot -}$ konjuge asidi olan hidroperoksil radikali (HO_2^{\cdot}) denkleminde yer alır. Sonraki indirgenme basamaklarında ise hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ve su (H_2O) oluşur. Hücrelerde yükseltgenmiş formda bulunan metal iyonları (Fe^{+3} , Cu^{+2}) $O_2^{\cdot -}$ varlığında indirgenirler ve dolayısıyla, Fenton ya da Haber-Weiss reaksiyonları aracılığıyla H_2O_2 'nin OH^{\cdot} 'a dönüşümü katalizlenebilir (Vranová et al., 2002).

Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aerobik organizmaların tüm hücrelerinde bulunur ve süperoksit radikalinin hidrojen peroksite dönüşümünü katalizler (Şekil 2.7). Reaktif oksijen türlerinin enzimatik olarak bertaraf edilme sistemindeki ilk zinciri oluşturur (Møller, 2001). SOD, metalloenzimler grubundadır (Lee and Lee, 2000) ve metal kofaktörlerine ve hücre altı yerleşimlerine göre sınıflandırılır. Baskın olan formları mitokondrial mangan-süperoksit dismutaz (Mn-SOD), sitozolik ve kloroplastik bakır/çinko-süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD) ve birçok bitki türünde kloroplastik demir-süperoksit dismutaz (Fe-SOD)'dır. SOD'un bu üç formu biyokimyasal özellikleri ve hidrojen peroksit ve siyanid ile inhibisyonları açısından birbirlerinden farklıdır (Scandalios, 1993; Bowler et al., 1994; Allen, 1995). Native-poliakrilamid jel elektroforez (Native-PAGE) analizleri Cu/Zn-SOD ve Fe-SOD'un H_2O_2 tarafından inhibe olduklarını, Cu/Zn-SOD'un siyanide duyarlı olduğunu ve Mn-SOD'un H_2O_2 ve siyanidden etkilenmediğini göstermiştir (Biemelt et al., 2000;

Moran et al., 2003). SOD gen ifadeleri yüksek ışık ve /veya düşük sıcaklık, kuraklık, hava kirliliği, artan O_2^- konsantrasyonu ve fungal saldırılar gibi birçok stres koşulları tarafından indüklenebilir (Cheng and Song, 2006). SOD antioksidant savunma ağında ana göreve sahiptir. Artan SOD aktivitesi ile oksidatif stres yüzünden meydana gelen hasardan korunmanın artması birbirleriyle ilişkilidir (Hernández-Nistal et al., 2002).

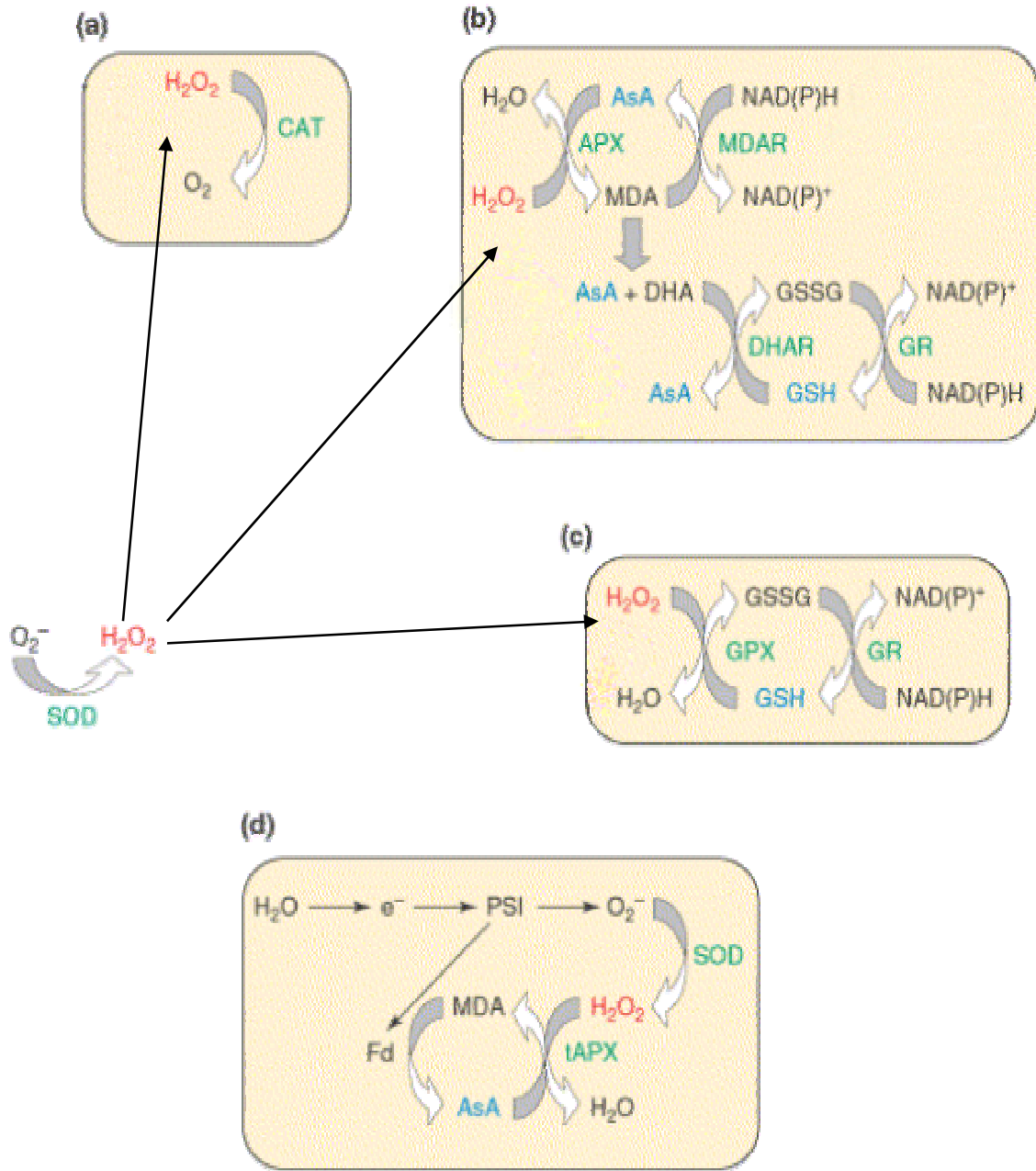
Süperoksit dismutaz aracılığıyla katalizlenen reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 'nin detoksifikasyonu üç farklı enzimle sağlanabilir; peroksidaz (POD), katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX). POD hücredeki çeşitli indirgeyicilerin yardımıyla H_2O_2 'yi suya dönüştürür. Peroksizomlarda bulunan CAT sitozolden difüzyonla peroksizomlara gelen H_2O_2 'yi ortadan kaldırır (Şekil 2.7a) (Lukatkin, 2002; Mittler, 2002), fakat CAT'ın hücreleri H_2O_2 'den koruma etkinliği oldukça sınırlıdır. Bunun nedeni CAT'ın H_2O_2 'ye karşı ilgisinin düşük olması ve ışık varlığında inaktivasyona uğramasıdır (Foyer et al., 1994a;b; Prasad, 1997). Ayrıca soğuk stresi birçok bitkide, özellikle soğuk duyarlı genotiplerde, CAT aktivitesinde belirgin bir düşüşe neden olmaktadır (Lukatkin, 2002). APX ise, mitokondri, kloroplast, sitozol, apoplast ve peroksizomlarda bulunan ve H_2O_2 'yi suya indirgeyen askorbat-glutasyon döngüsünün ilk enzimidir (Şekil 2.7b). APX'in H_2O_2 'ye yüksek afinitesi ve askorbat-glutasyon döngüsünün hemen hemen her hücresel yapıda bulunması, bu döngünün ROS seviyesinin kontrolünde hayati önem taşıdığını göstermektedir (Mittler, 2002). APX, H_2O_2 'yi H_2O 'ya indirgeyebilmek için elektron vericisi olarak askorbatı (AsA) kullanır ve monodehidroaskorbat (MDHA) radikali oluşur. Askorbatın rejenerasyonu son derece önemlidir. MDHA kendiliğinden ya askorbata ya da dehidroaskorbata (DHA) veya indirgeyici olarak NADPH'ı kullanan monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) enzimi yardımıyla AsA'ya dönüşür. DHA ise indirgenmiş glutasyonu (GSH) elektron verici olarak kullanan dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzimi ile AsA'ya dönüşür. Bu sırada oluşan yükseltgenmiş glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş forma dönüşümü, elektron kaynağı olarak NADPH'ı kullanan glutasyon redüktaz (GR) sayesinde gerçekleşir (Şekil 2.7c) (Alscher et al., 1997). GR, oksidatif stres sırasında askorbat havuzunu indirgenmiş halde tutmada önemli bir role sahiptir, bu nedenle de inaktivasyonu H_2O_2 'nin ortamdaki uzaklaştırılmasını sınırlar (Foyer et al., 1991).

Sitozolik süperoksit, su-su döngüsü olarak adlandırılan bir metabolik yol aracılığıyla detoksifiye edilir (Şekil 2.7d) (Asada, 1999). Su, döngüde hem elektronların kaynağı hem de metabolik yolun son ürünü olarak rol aldığından döngü bu ismi alır. Su-su döngüsü hiçbir şey üretmez, fakat potansiyel olarak kloroplastta zarar veren reaktif oksijen türlerini yok eder. Süperoksitin suya dönüştürülmesinde iki enzim fonksiyon görür. Önce, SOD süperoksitin moleküler oksijen ve H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizler. Devamında APX, H_2O_2 'yi suya indirmek için askorbatı kullanır. H_2O_2 'nin ortadan kaldırılması önemlidir, çünkü potansiyel olarak tiyol oksidasyonu yoluyla Calvin-Benson döngüsündeki bisfosfatazları inaktive edebilir ve Fenton reaksiyonu yoluyla çok reaktif hidroksil radikalini oluşturmak için indirgenmiş geçiş metali katyonları ile kolaylıkla etkileşebilir (Logan et al., 2006).

Enzimatik antioksidant savunma sistemleri gibi, enzimatik olmayan savunma sistemleri de reaktif oksijen türlerinin hücrelerden uzaklaştırılmasında önemli göreve sahiptirler. Askorbik asit, glutatyon, α -tokoferol, karotenoid, antosiyanin ve flavonoidler gibi düşük moleküler ağırlıklı antioksidantların her biri aerobik hücrelerde ROS detoksifikasyonunda rol oynar. Askorbat, glutatyon ve α -tokoferol hem kimyasal hem de enzimle katalizlenen detoksifikasyon reaksiyonlarında substrat olarak merkezi ve içsel ilişkili rollere sahiptir (Hausladen and Alschler, 1993; Winkler et al., 1994; Ślesak et al., 2002).

Askorbik asit (askorbat) bitki ve hayvan hücrelerinde bulunur. Askorbik asidin L formu, L-askorbik asit, Vitamin C olarak adlandırılır. Bitki hücrelerinde enzim kofaktörü, antioksidant ve kloroplast ya da hücre zarındaki elektron taşıma sistemlerinde elektron verici-alıcı olarak görev yapar. Tüm bu görevler oksidatif stres direnci ile ilgilidir (Conklin, 2001). Askorbat H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılmasında hayati öneme sahip bileşenlerden biridir. Ayrıca, SOD gibi süperoksiti H_2O_2 'ye dönüştürür. Askorbat kloroplast stromasında çok önemli bir göreve sahiptir, α -tokoferolün yeniden oluşumu ve ksantofil violaksantininin zeaksantine depoksidasyonu için gereklidir (Leipner et al., 1997; 2000).

Glutatyon, bitkilerde çok miktarda bulunan, çok sayıda ve önemli fonksiyonlara sahip olan bir metabolittir (Foyer and Noctor, 2005). İndirgenmiş glutatyon (GSH), iki ardışık ATP-bağımlı reaksiyon ile katalizlenir. Bu reaksiyonlarda görev alan



Şekil 2.7. Bitkilerde ROS uzaklaştıran metabolik yollar. (a) Katalaz (CAT) (b) Askorbat-glutasyon döngüsü (c) Glutasyon redüktaz (GR) döngüsü (d) Su-su döngüsü. Süperoksit dismutaz (SOD) O_2^- 'yi H_2O_2 'ye çevirerek savunmanın ilk basamağı olarak görev alır. CAT, askorbat peroksidaz (APX), ve GR H_2O_2 'yi detoksifiye ederler. CAT'ın (a) tersine, APX ve GR döngüyü tekrar oluşturmak için bir askorbat (AsA) ve/veya bir glutatyon (GSH) gerek duyarlar (b-d). Bu döngü elektronları doğrudan NAD(P)H (b-c) ya da fotosentetik aygıtlardan (d) kullanırlar. ROS kırmızı, antioksidantlar mavi ve ROS uzaklaştıran enzimleri yeşil olarak gösterilmiştir (Mittler, 2002).

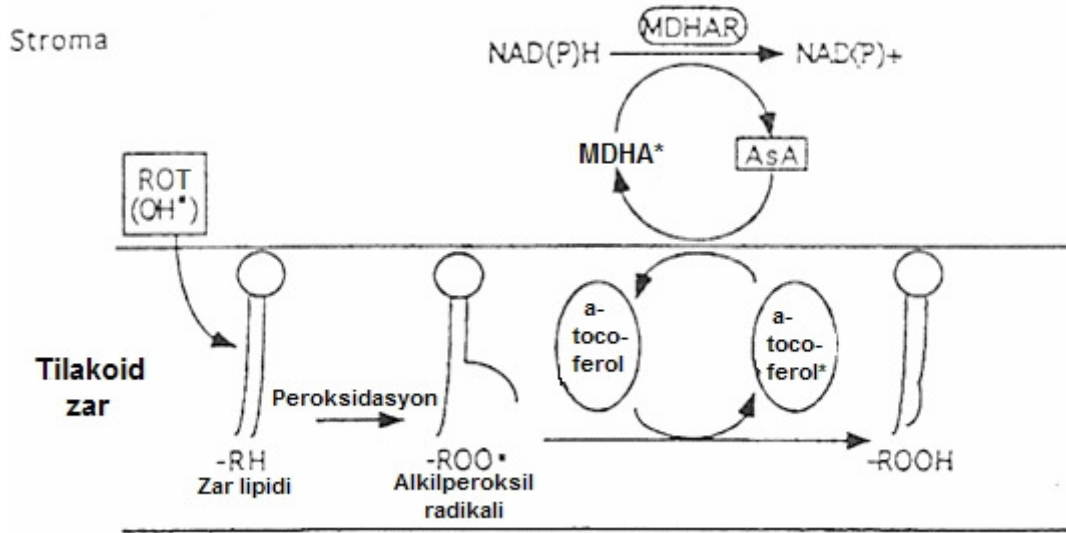
Kısaltmalar: DHA, dehidroaskorbat; DHAR, DHA redüktaz; Fd, ferrodoksin; GPX, glutasyon peroksidaz; GSSG, okside glutatyon; MDA, monodehidroaskorbat; MDAR, MDA redüktaz; PSI, fotosistem I; tAPX, tilakoid bağlı APX.

enzimler γ -glutamil-sistein sentetaz (γ -ECS, EC 6.3.2.2) ve glutatyon sentetaz (GSH-S; EC 6.3.2.3)'dir (Foyer et al., 2002). GSH lipid peroksidasyonu sonucu oluşan alkol peroksitlerin uzaklaştırılmasını sağlar, böylece zar yapısını kararlı tutmaya yardımcı olur (Hausladen and Alscher, 1993). Glutatyon bitkilerde oksidatif stres işareti olarak kullanılır. Sülfür içeren bir tripeptid olan glutatyon aynı zamanda indirgenmiş sülfürün depo ve taşıma formu olarak da görev alır (Tausz et al., 2004). Glutatyon, senobiyotiklerin ve ağır metallerin uzaklaştırılmasının yanı sıra hücrel antioksidant savunma sisteminin, reaktif oksijen türlerini kontrol altında tutan önemli bir bileşendir (Noctor and Foyer, 1998). Glutatyon kloroplast dışındaki hücrel yapılarda da, örneğin mitokondri, sitozol, peroksizom (Noctor et al., 2002) ve yüksek konsantrasyonda nukleusta (Müller et al., 2002) antioksidant rol oynar.

Düşük sıcaklık gibi abiyotik streslere karşı en erken cevap, glutatyon ve askorbat düzeyinde birkaç dakika içindeki artış olarak tarif edilebilir (Hausladen and Alscher, 1993; Foyer et al., 1994). Bu antioksidantların düzeyindeki artışı takiben, antioksidant gen ürünleri olan antioksidant enzim aktiviteleri çeşitli düzeylerde artar (Alscher et al., 1997).

Enzimatik olmayan antioksidantlardan biri olan α -tokoferol bir zar stabilizasyon ajanıdır. Her ne kadar bu görevi zar lipid organizasyonundaki etkisi yüzünden olsa da az bir kısmı da serbest yağ asitleriyle kompleks oluşturabilme yeteneğinden kaynaklanır. Serbest yağ asitleri zarların çift tabakasının agregasyonu ve füzyonuna neden olurlar. Yağ asitlerinin karboksil grubu ile tokoferol halkaları arasındaki ilişki bu stabilizasyon bozukluğunu azaltır. Tokoferolün antioksidant özelliği hem singlet oksijeni hem de peroksitleri uzaklaştırma yeteneğinden kaynaklanır, fakat β -karotene göre α -tokoferol singlet oksijeni uzaklaştırmada daha az etkindir (Fryer, 1992). Reaktif oksijen türlerinin zar lipidlerine hücumu lipid peroksidasyonu ile sonuçlanır. α -tokoferol oluşan alkil peroksil radikallerini detoksifiye eder ve askorbat havuzu aracılığıyla tekrar oluşur (Alscher et al., 1997) (Şekil 2.8).

Hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan bitki dokularının plastidlerinde bulunan karotenoidler, özellikle ışık absorpsiyonu ve reaksiyon merkez kompleksine enerji aktarımı, fotosentetik aygıtları güçlü ışıklandırma nedeniyle



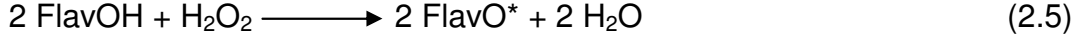
Şekil 2.8. α -tokoferol'un yeniden oluşumu ve alkil peroksil radikalinin yakalanması (Alscher et al., 1997).

oluşan hasardan koruma gibi fotosentezin birçok işlevinde görev alan pigmentlerdir (Mimuro and Katoh, 1991). Kloroplastlarda karotenoidler ışık toplayıcı sistemin aksesuar pigmentleri olarak görev alırlar, fakat belki de daha önemli görevleri ışıkta fotosentetik komplekslerin eksitasyonu sonucu üretilen reaktif oksijen türlerini ve triplet klorofilin çeşitli formlarını detoksifiye etme yetenekleridir (Demming-Adams et al., 1996). Karotenoidler iki sınıfa ayrılır; hidrokarbon olan karotenler ve bir ya da daha fazla oksijen atomu içeren karotenoid türevleri olan ksantofiller. Karotenoidlerden β -karoten özellikle singlet oksijeni uzaklaştırmada etkindir (Young, 1991). Karotenoidlerin antioksidant özellikleri fotosistemleri dört yoldan biriyle korur; ya zincir reaksiyonlarını bitirmek için lipid peroksidasyon ürünleriyle tepkimeye girerek (Burton and Ingold, 1984), ya singlet oksijeni uzaklaştırarak ve enerjisi ısı olarak dağıtarak (Mathis and Kleo, 1973), ya singlet oksijenin oluşmasını önlemek için triplet ve uyarılmış klorofil molekülleri ile tepkiyerek ya da fazla eksitasyon enerjisinin ksantofil döngüsüne doğru dağıtılması ile (McKersie, 1996).

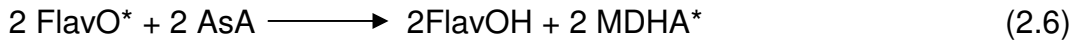
Flavonoidler, bitki metabolizmasının ikincil metabolitlerinden olup (Graham, 1998), ultraviyole (UV) toleransında UV gölgeleyici olarak görev alırlar ve doğrudan reaktif oksijen türlerini (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, singlet oksijen ya da peroksit radikali) uzaklaştırabilirler. Fakat, flavonoidler daha çok vakuolde bulduklarından kloroplastta fotosentetik elektron transferi sırasında

oluşan ROS'ların uzaklaştırılmasında daha az etkilidirler. Bununla birlikte, diğer ROS'ların aksine H₂O₂ kararlıdır ve zarlardan difüzyon ile geçebilme yeteneğindedir. Vakuolde H₂O₂'nin detoksifikasyonu için bir flavonol-peroksidaz sistem önerilmiştir (Yamasaki et al., 1997).

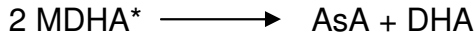
Flavonoid Peroksidaz



Oluşan flavonoid fenoksil radikali (FlavO*) monodehidroaskorbit asit radikalini meydana getirmek için askorbik asitle (AsA) tepkimeye girer.



MDHA* daha sonra Asa ve DHA' ya enzimatik olmayarak dönüşür.



Meydana gelen dehidroaskorbat (DHA) askorbik asite sitozolik dehidroaskorbat redüktaz tarafından tekrar indirgenebilir (Yamasaki et al., 1997).

Antosiyanin, substrat olarak fenilalanini kullanan şikimik asit metabolik yoluyla bitkilerde sentezlenen flavonoid bileşiklerinden biridir. Bitki gövdeleri düşük sıcaklıklara maruz bırakıldıklarında epidermal ve sub-epidermal hücrelerin vakuollerinde antosiyanin biriktirirler ve böylece renkleri kırmızıya döner (Leng et al., 2000). Ayrıca antosiyaninler, UV gölgeleyici olarak görev alırlar ve UV'ye maruz kalan bitkide strese cevap olarak bitki DNA'sını güneş ışığı hasarından korumak için üretilirler.

2.7. Soğuk Uyumu

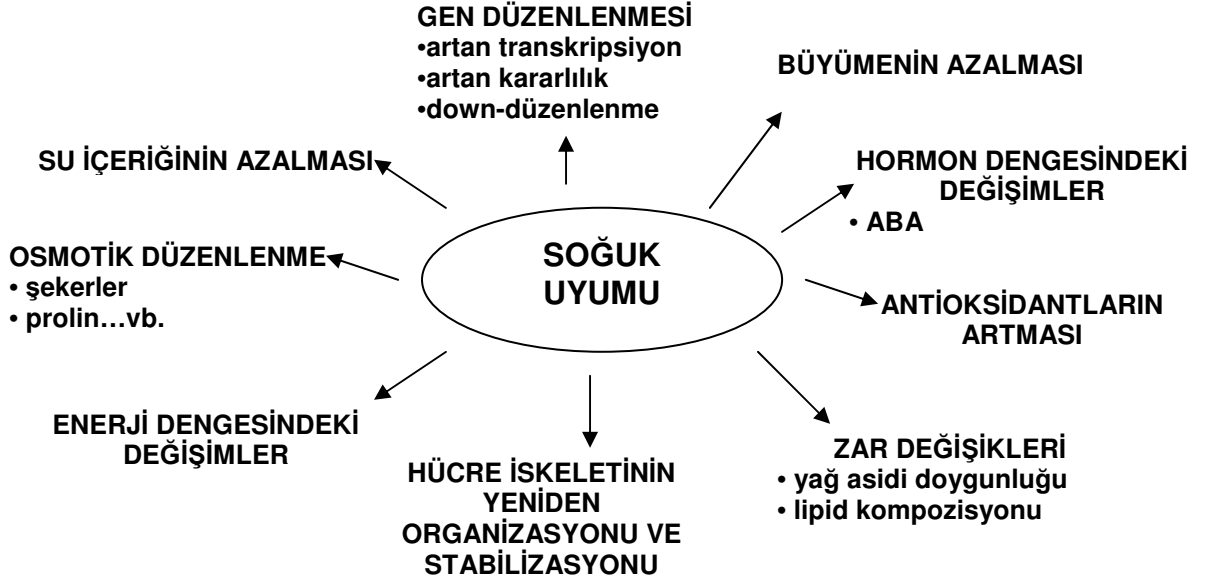
Soğuk bitkilerin biyolojik aktivitelerini azaltır, fizyolojik işlemlerin normal fonksiyonlarını engeller ve sonuçta ölüme götüren kalıcı hasarlara neden olabilir. Bitki türleri soğuğu tolere etme yeteneklerine göre çeşitlilik gösterirler. Soğuk-duyarlı tropikal türler donma derecesinde olmayan sıcaklıklarda bile tamir edilmez şekilde hasar görebilirler. Hasarlar metabolik ve hücrel işlemlerin genel aksaklıklarından ve zar özelliklerindeki değişimlerden kaynaklanır. Çeşitli bitki türleri soğuk ya da donma toleransı derecelerini düşük fakat donma derecesinde olmayan sıcaklıklara belirli bir süre maruz kalarak artırma yeteneğine sahiptirler,

bu olay soğuk uyumu olarak bilinir (Thomashow, 1999). Soğuk toleransı gelişimi, ayrıca, dehidrasyon (Mäntylä et al., 1995; Li et al., 2002) ve yüksek tuzluluk (Ryu et al., 1995) gibi osmotik streslerle ve bitki ya da hücrelerin bitki hormonu olan absisik asit (ABA) (Li et al., 2003; Nayyar et al., 2005a) muamelesi ile de indüklenebilir. Soğuk uyumu ile elde edilen soğuk tolerans düzeyi durağan değildir, fakat mevsimlere bağlı olarak değişebilir ve ılık, uyumun gerçekleşmediği sıcaklığa döndüğünde hızlıca kaybedilir. Soğuk uyumu dinamik, fotosentetik aktivite gerektiren bir işlemdir (Griffith and McIntyre, 1993; Wanner and Junntila, 1999). Başarılı bir soğuk uyumu bitkinin düşük sıcaklıklarda, özellikle bitkide fotoinhibisyona ve ROS oluşumuna neden olan orta ve yüksek ışık koşullarında, fotosentetik aygıtların düzgün fonksiyon göstermesini ayarlama yeteneğidir (Foyer et al., 1994; Wanner and Junntila, 1999).

Soğuk uyum yeteneği, çok sayıda geni içeren ve bu gen ifadelerinin (ekspresyon) çoğunlukla düşük sıcaklıkla kontrol edildiği bir poligenik özelliktir. Bu genlerin ifade seviyelerindeki değişimler, soğuk uyumunun karakteristiği olan pek çok moleküler ve fizyolojik değişikliklere neden olur (Şekil 2.9) (Krebs et al., 2002). En önemli değişiklik, bitki çeşidine göre prolin, betain ve/veya çözünen karbohidratlar olabilen, birbirinin yerine geçebilen (compatible) osmolitlerin hücresel konsantrasyonlarındaki artıştır (Warren, 2001). Bu osmolitler nötral pH'da yüksüz olup suda yüksek çözünürlük özelliklerine sahiptirler (Ballantyne and Chamberlin, 1994). Üstelik yüksek konsantrasyonlarda, makromolekül-çözücü ilişkiler üzerindeki zarar verici etkileri çok azdır ya da hiç yoktur (Timasheff, 1993; Yancey, 1994).

Bitkinin soğuğa dayanıklılığında anahtar metabolik işlemler, özellikle karbohidrat metabolizması ile arasındaki dengeye bağlıdır. Bitkinin düşük sıcaklıktan korunma amaçlı tepkilerinden biri suda çözünen karbohidratların (sukroz, glukoz, fruktoz gibi) birikimidir (Klimov et al., 2002). Nişastada bir azalma ve beraberinde şekerlerde bir artma uzun zamandır soğuk uyumu ve dayanıklılığı ile ilişkilendirilmektedir ve çeşitli şeker formlarının bitkilerde biriktiği bilinmektedir (Öncel, 1984). Çözünen karbohidratların koruyucu etki mekanizması (1) hücre zar sistemine soğuk-koruyucu (cryoprotective) etkisi, (2) bir enerji kaynağı olarak metabolik etkisi ve diğer koruyucu bileşiklerin öncüsü olması, (3) hücreler arası buz oluşumunu durduran osmotik etkisi ya da (4) daha sonra yaprağın yeniden

gelişimini sağlayan erteleme etkisi ile ilişki olabilir. Şekerlerin doğrudan homeoviskoziti adaptasyonunu kolaylaştırarak hücre zarını modifiye ettikleri bilinir (Klimov et al., 2002).



Şekil 2.9. Bitkilerde soğuk uyumu ile indüklenen hücresel değişiklikler (Xin and Browse, 2000'den değiştirilerek alınmıştır).

Prolin bir birbirinin yerine geçebilen (compatible) osmolittir ve sentezi soğuk dayanıklılığına katkıda bulunur (Warren, 2001). Prolin, zarları ve proteinleri sıcaklık ekstremelerinin ve yüksek konsantrasyondaki inorganik iyonların zararlı etkilerine karşı korur (Santarius, 1992; Santoro et al, 1992; Atıcı et al., 2003). Ayrıca prolin, protein-uyumlu hidrotrop (Srinivas and Balasubramanian, 1995) ve hidroksil radikali uzaklaştırıcısı olarak fonksiyon gösterebilir (Smirnoff and Cumbes, 1989). Prolin bitkilerde streslere cevap olarak sitozolde biriktirilir. Prolinin yüksek organizasyonlu bitki hücrelerine dışarıdan (eksogen) sağlanması da osmoprotectant (Lone et al., 1987) ve soğuk-protectant olabilir (Santarius, 1992). Prolin sentezi sitoplazmik asitliğin hafifletilmesi için bir mekanizma olarak ve metabolizmaya uyumlu NADP⁺/NADPH oranının sürdürülmesinde fonksiyon gösterebilir (Hare and Cress, 1997). Ayrıca, stresin uzaklaşması sonucu prolinin hızla yıkılması, iyileşmenin ve tamirin sağlanması için mitokondrial oksidatif fosforilasyonu destekleyen indirgeyici ajanlar ile ATP'nin üretimini sağlayabilir (Hare and Cress, 1997; Hare et al, 1998). Prolin biyosentezinde yer alan

enzimlerin [P5CS1 ve 2 (δ -pirrolin-5-C sentaz 1 ve 2)] soğuk ile indüksiyonu, prolin seviyelerinin düşük sıcaklıklarda artmasını açıklamaktadır (Wanner and Junttli, 1999).

Soğuk uyumu sırasında doymamış zar lipid oranının artması hemen hemen her zaman meydana gelir. Soğuk toleransında zar lipidlerinin doymamış yağ oranlarının artması zar akışkanlığını devam ettirebilmek için çok önemlidir (Warren, 2001; Uemura et al., 2006). Antioksidant enzimler birçok türde soğukla teşvik edilir ve böylece oksidatif stres dayanıklılığında (tolerans) bir artış meydana gelir (Hull et al., 1997; Prasad, 1997). Ayrıca flavonoid, antosiyanin ve ksantofiller gibi antioksidantlar da soğuk uyumu sırasında teşvik edilir ve soğuk dayanıklılığını arttırmaları (Leng et al., 2000). Bunun yanı sıra, soğuk uyumu sırasında moleküler şaperonların da sentezinin teşvik edildiği bildirilmiştir. Sıcaklık şoku proteinlerinin (Hsp) birçok farklı sınıfı sıcaklık ekstremelerine ve diğer streslere bağlı olarak meydana gelen denatüre olmuş proteinlerin kümeleşmesini ve kümeleşmiş olanların ise renatürasyonunu sağlayan, *moleküler şaperonlar* olarak da fonksiyon gösterirler (Guy and Li, 1998).

2.8. Soğuk Stresinin Algılanması ve Soğuk Uyumu

Bitkilerin herhangi bir çevresel strese cevabı sinyal iletimi (transdüksiyon) denilen bir dizi reaksiyonla meydana gelir. Düşük sıcaklık sinyal iletimi muhtemelen hücre zarında yerleşmiş olan reseptör tarafından soğuk sinyalinin algılanmasıyla başlar. Bu algılayıcı protein sıcaklık değişiminin sonucu olarak hücre zarının mikrodomanlarındaki fiziksel faz geçişlerini bulma eğilimindedir (Murata and Los, 1997). Soğuk stresle indüklenmiş hücre zarı mikrodomanlarındaki katılma aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine sebep olabilir. Soğuk uyumu sırasında bu yeniden düzenlenmeyi Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu, sitozolik Ca^{+2} düzeyinin artması ve soğukla düzenlenen *COR* (cold-regulated gen) genlerinin ifadesinin tetiklenmesi takip eder (Orvar et al., 2000; Chinnusamy et al., 2006). Ayrıca, reseptör protein kinazlar soğuk algılayıcıları gibi rol oynayabilirler. Bu proteinler hücrelerarası domainlerinin sıcaklıkla indüklenmiş konformasyonel değişiklikleri sayesinde aktive edilebilirler. Aktive edilmiş bu proteinler daha sonra reseptörlerin sitoplazmik tarafındaki kinazların aktivitelerini indükleyebilirler (Heino and Palva, 2003).

Ayrıca, absisik asit (ABA) çeşitli stres sinyallerine cevapta kritik rol oynayan önemli bir bitkisel hormon olup stresle birlikte indüklenir. ABA ve soğuk etkisindeki bitki hücresinde kalsiyumun hızla artmasını sağlarlar (Mahajan and Tuteja, 2005).

Kalsiyum (Ca^{+2}), bitkinin dış sinyallere cevabında ikincil haberci olarak görev alır (Trewavas and Malhó, 1997). Soğuk, dokunma, ışık, patojenler ve bitki hormonları gibi çeşitli biyotik ve abiyotik uyarıcılar sitozolik kalsiyum konsantrasyonunda geçici bir artışa neden olurlar (Knight and Knight, 2000; Scrase-Field and Knight, 2003).

Bir bitkinin düşük sıcaklığa en erken cevap olaylarından biri serbest sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunun geçici yükselmesidir. Serbest sitozolik kalsiyum, $[Ca^{+2}]_c$ seviyesindeki bu yükselme çoğunlukla Ca^{+2} 'un dış kaynaklardan içeriye akımı nedeniyle (Monroy and Dhindsa, 1995), fakat inositol (1,4,5,-)trifosfat (IP_3) ve siklik ADP-riboz (CADPR) aracılığıyla Ca^{+2} 'un vakuolden serbest bırakıldığına dair kanıtlar da vardır (Knight et al., 1996; Sangwan et al., 2001). $[Ca^{+2}]_c$ 'nin hem hızlı soğuk şokuna (Knight et al., 1996) hem de yavaş kademeli sıcaklık azalmalarına cevap olarak arttığı bildirilmiştir (Plieth et al., 1999; Nordin-Henriksson and Trewavas, 2003). Kalsiyumun vakuolden salınımı yavaş soğutma, yani soğuk uyumu sırasındaki $[Ca^{+2}]_c$ konsantrasyonunun artmasından sorumludur (Knight and Knight, 2000). $[Ca^{+2}]_c$ 'daki düşük sıcaklıkla indüklenen değişiklikler ile soğuk-cevap genleri ve soğuk dayanıklılığının gelişimi birbiriyle ilişkilidir.

Kalsiyumun sinyal molekülü olarak faydası, sıkı kontrollü olarak ayarlanmış taşınımına ve depolanmasına bağlıdır. Uyarıcıdan sonra, serbest $[Ca^{+2}]_c$ hızlıca aktif Ca^{+2} taşıyıcıları tarafından dinlenme seviyesine getirilir ve düşük bir seviyede tutulur.

Soğukla indüklenmiş bir Ca^{+2} sinyal ya da işareti, kalsiyum bağlı özel proteinler tarafından tanınırlar. Kalmodulin (CaM) ökaryotlarda en iyi korunmuş Ca^{+2} bağlı proteinlerden biridir. CaM'ın kendi başına katalitik aktivitesi yoktur, fakat Ca^{+2} bağlanması üzerine çeşitli hücresel işlevlerde yer alan çok sayıda hedef proteinleri aktive eder. CaM'ın ilgi çekici özelliklerinden biri CaM bağlanma bölgelerinde çok az benzer amino asit dizisi (sekansı) taşıyan hedef proteinleri aktive edebilme yeteneğidir. CaM'ın evrimsel olarak iyi korunmuş formuna ek olarak, bitkiler CaM

izoformlarına ve CaM-benzer proteinlerine sahiptirler (Snedden and Fromm, 2001). Düşük sıcaklıkları içeren çevresel uyarıcılar, CaM ve CaM-benzer proteinleri kodlayan genlerin hızlı transkripsiyonunu başlatır (van der Luit et al., 1999). CaM genlerinin düşük sıcaklığa cevap olarak ifade edilmeleri kısmen Ca^{+2} tarafından düzenlenir (Polisensky and Braam, 1996). CaM'in, muhtemelen Ca^{+2} , CaM ve CaM hedef proteinleri dengesine bağlı olarak, soğuk uyumu üzerinde hem pozitif hem de negatif etkisi vardır.

Kalsineurin-benzer proteinler (CBL)'e, SOS3-benzer Ca^{+2} bağlı proteinler de denir, Ca^{+2} algılayıcılarının yeni bir ailesidir. CaM gibi kendi başına aktive göstermezler. Soğuk ve kuraklık stresinde güçlü ve geçici olarak indüklenirler (Luan et al., 2002).

Kalsiyum sinyallerinin ilkin algılayıcılarının gösterdiği tipik hedefler kontrollü olarak düzenlenen protein kinazların ve fosfatazların meydana getirdiği fosforilasyon reaksiyonlarıdır. Protein fosforilasyon/defosforilasyonu soğuk uyumu sırasında sinyal algılanmasında yer alırlar (Sangwan et al., 2001). Kalsiyum-bağlı protein kinazlar (CDPK) soğuk stresini de içeren abiyotik streslere cevapta önemli algılayıcılar olarak görev alırlar. Çeşitli bitki türlerinde soğuğa maruz kalma ile CDPK genlerinin ifadesindeki değişiklikler arasında bir ilişki vardır. CDPK'ların enzimatik aktiviteleri de soğuğa cevap olarak artar. CDPK'lar soğuk toleransının kazanılması sırasında Ca^{+2} sinyallerine aracı olmada önemli bir role sahip olabilirler (Harmon et al., 2000; Cheng et al., 2002; Ludvig et al., 2004). Bazı proteinlerin fosforilasyon seviyeleri soğuğa duyarlılık gösteren protein kinaz ve fosfatazların inhibisyonu yüzünden soğuktan etkilenirler. Fosforilasyon ve defosforilasyon arasındaki eşitliğin soğuk yüzünden değişmesiyle, düşük sıcaklık toleransının gelişimine ve düşük sıcaklık cevap gen ifadelerine yol açan soğuk spesifik protein fosforilasyonuna doğru sinyal algılama reaksiyonlarını yönetebilir (Monroy et al., 1997).

Mitojen-aktive edilmiş protein kinazlar (MAPK) çeşitli ikincil haberciler tarafından iletilmiş çoklu hücre içi sinyalleri tamamlamada anahtar rolü oynayan serin/trionin protein kinazlardır. Bir MAPK reaksiyonu üç protein kinaz içerir. İnaktif MAPKKK'lar (MAP kinaz kinaz kinaz) bir stres sinyal habercisi tarafından aktive edilirler; aktivasyonun üzerine, onlar da MAPKK'ları (MAP kinaz kinaz) serin/treonin fosforilasyonu ile aktive ederler. Aktive edilmiş MAPKK'lar, MAPK'ları

hem treonin hem de tirozin rezidülerinin fosforilasyonu yoluyla aktive ederler. MAPK, hücre dışı uyarıcılara cevap sırasında tüm ökaryotik hücrelerde sinyal algılamada görev alır. Ayrıca MAPK soğukta Ca^{+2} sinyalinin algılayıcısıdır (Mizoguchi et al., 1997; Jonak et al., 1999).

2.9. Soğuga Cevapta Gen İfadelerinin Düzenlenmesi

Soğuk uyumu sırasında yüzlerce gen ifadesinin, arttırılarak yada azaltılarak uyumun düzenlendiği bildirilmiştir (Seki et al., 2001; Fowler and Thomashow, 2002). Aynı zamanda, soğukla indüklenen bu genlerin ifadelerinin kuraklık, yüksek tuz konsantrasyonu ya da ABA tarafından da arttırıldığı bilinmektedir. Sinyal algılama metabolik yollarının bir ortak grubu birçok stres cevapları sırasında görev alır (Shinozaki et al., 2003). Soğukla düzenlenen (*COR*) genlerin tanıtım (promoter) analizleri genlerin stres indüksiyonuna aracılık eden sekansları içerdiklerini göstermiştir. Bazı *COR* genleri ABA'ya cevap vermeye aracılık eden ABA cevap öğeleri içerir. *COR* genlerinin ifadesi hem ABA-bağımlı hem de ABA-bağımsız metabolik yollarla düzenlenir (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Düşük sıcaklık sırasında soğukla indüklenabilen gen ifadelerinin analizi ifadeleri farklı zamanlarda meydana gelen en az iki gurubun var olduğunu gösterir. İlk gurupta, düşük sıcaklığa cevapta, ifade hızlı ve geçicidir, ve ikincide, soğuk uygulaması sırasında ifade giderek artar. Ayrıca ifadelerin analizleri, soğuk uyumu sırasında çoklu düzenleyici metabolik yolların aktive edildiğini ve soğukla indüklenen genlerin birden fazla soğuk düzenleyicilerinin elemanı olabileceğini gösterir (Fowler and Thomashow, 2002).

Dehidrin proteinleri (geç embriyogenez (LEA) D11 ailesi) bitki hücrelerinde düşük sıcaklık, kuraklık ve tuzluluğu içeren dehidratif öğeli çevresel uyarıcılara cevapta ve tohum ve polen olgunlaşması gibi gelişim evrelerinde üretilir (Campbell and Close, 1997; Svensson et al., 2002). Dehidrinler tüm fotosentetik organizmalarda bulunur. Karakterize edilmiş dehidrin ailesi üyeleri 9-20 kD arasındaki moleküler ağırlıklara sahiptirler, sıcaklığa dayanıklıdır, sulu çözeltilerinde 100°C'ye kadar bütünlüklerini sürdürürler ve genellikle glisin ve lizin rezidüleriyle zenginleştirilmişlerdir (Close, 1996; 1997). Soğuk ve dehidrasyonla indüklenirler,

indüksiyonları organ tipiyle ilgilidir ve dokunun gelişim fazına bağlıdır (Rorat et al., 2004). Dehidrinler aslında yapısal olmayan proteinlerdir (Hara et al., 2001). Bununla beraber, dehidrinler hücre sel yapılar (örn, zarlar) ya da çok sayıdaki diğer moleküllerle (örn, nükleoproteinler) etkileşerek daha düzenli bir yapı oluşturmak için katlanabilirler (Close, 1997; Svensson et al., 2002).

Dehidrinler nükleusta, sitoplazmada, mitokondride, vakuolde ve hücre zarı çevresinde yerleşmişlerdir (Danyluk, et al., 1998; Heyen et al., 2002; Borovskii et al., 2005). Birçok dehidrin için en fazla birikim düşük sıcaklık hasarına daha hassas olan vasküler dokularda ve bu dokuların etrafını çevreleyen hücrelerde gözlemlenmiştir (Nylander et al., 2001). Dehidrinlerin, dehidrasyona karşı hücre yapısını dengeleme (Danyluk, et al., 1998), soğuk-koruyucu (Bravo et al., 2003; Sanchez-Ballesta et al., 2004) ve antifriz (Wisniewski et al., 1999) etkisi gösterme, düşük su koşulları altında enzim aktivitelerini geliştirme (Rinne et al., 1999) ve osmoregulator (Nylander et al., 2001) ya da radikal uzaklaştırıcı (Hara et al., 2003) olarak fonksiyon gösterme gibi görevleri vardır. Soğuk/dehidrasyon stresi sırasında dehidrinlerin gerçek fonksiyonları, bir grup dehidrinin düzenlenmiş etkileri ya da diğer LEA proteinleri ve uyumlu çözünenler gibi koruyucu moleküllerle iletişim gibi birçok mekanizmanın karşılıklı etkileşimini sağlamak olabilir (Close, 1996; Hoekstra et al., 2001).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Bitki materyalleri

Bu tez kapsamında kullanılan *Cicer arietinum* L. (nohut) tohumları, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Araştırmada, Gökçe ve Canitez çeşitleri ile AkN 87 ve AkN 290 hatlarına ait kabulü tipi tohumlar kullanılmıştır.

3.2. Yöntemler

Yetiştirme ortamı olarak kullanılan toprak Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü'nden temin edilmiştir. Kullanılan deneme toprağının bazı fiziksel ve kimyasal analizleri Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Toprak Bölümü, Toprak Analiz Laboratuvarında yapılmış ve analiz sonuçları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Çeşit ve hatlara ait benzer morfolojiye ve büyüklüğe sahip tohumlar, her biri 1 kg toprak içeren 14 x 13 cm ebatlarındaki toplam 96 adet (her uygulama için 12 saksı) plastik saksılara sekizer tane olmak üzere ekilmiştir. Daha sonra saksıdaki fideler beşe seyreltilmiştir. Her bir saksının günlük olarak ağırlıkları (dara+toprak) alınmış ve saksılar son ağırlıkları tarla kapasitesine gelecek şekilde sulanmışlardır.

Literatürde çeşitli araştırmacılar tarafından (Foyer et al., 2002; Tambussi et al., 2004; Mahajan and Tuteja, 2005; Malone et al., 2006) soğuk ve/veya üşüme olarak da ifade edilen soğuk (üşüme) stresine (<12°C) karşı nohut (*Cicer arietinum* L.) duyarlı bir bitkidir ve nohut fidelerinin 10°C'de uyumlandırmadan sonra ve uyumlandırılmaksızın 1-7°C arasında değişen üşüme sıcaklıklarına maruz bırakıldığı bildirilmiştir (Nayyar et al., 2005a). Bu araştırmada da benzer şekilde nohut genotipleri bu aralıktan seçilen iki farklı düşük sıcaklık derecesine maruz bırakılmış ve bu tez kapsamında soğuk terimi, üşüme anlamında kullanılmıştır. Denemeler, 4 farklı genotip (2 çeşit ve 2 hat)'in 10°C'de soğuk uyum periyotlu (U) ve uyum periyotsuz (S) olarak 2 farklı sıcaklık derecesinde gösterdikleri morfolojik ve fizyolojik parametreleri incelemek üzere planlanmıştır. Ekim yapılan saksılar, 25°C sıcaklıkta, %40-50 nem koşullarında ve karanlıkta, kontrollü iklim odasında ekimi izleyen 5 gün boyunca üstleri kapalı tutularak, ekilen tohumların çimlenmesi

Çizelge 3.1. Kullanılan toprağın bazı fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları.

Toprak Özellikleri

Fiziksel

Tekstür sınıfı	: Tın
Kil, %	: 23.65
Silt, %	: 31.44
Kum, %	: 44.91
Nem, %	: 1.70
Tarla kapasitesi, %	: 18.04
pH [toprak:su (1:2.5)]	: 8.3
pH (saturasyon çamuru)	: 7.81
Elektriksel iletkenlik (EC), mmhos/cm	: 1.38

Kimyasal

Organik madde, %	: 0.93
Kireç, %	: 5.2
Tuz, %	: 0.042
Azot (N), %	: 0.075
Potasyum (K), mg/kg	: 171.3
Sodyum (Na), mg/kg	: 321.0
Fosfor (P), mg/kg	: 12.5
Çinko (Zn), mg/kg	: 0.2
Bakır (Cu), mg/kg	: 2.51
Demir (Fe), mg/kg	: 2.77
Mangan (Mn), mg/kg	: 7.7

sağlanmıştır. Ekimden sonraki 6. gün saksıların üstleri açılmış ve bitkiler 25°C'de, %40-50 nemde, 16 saat ışık/ 8 saat karanlık fotoperiyodunda, 150 $\mu\text{mol m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda, kontrollü iklim odasında 7 gün daha büyütülmüşlerdir. 12 günlük nohut çeşit ve hatlarına uygulanan farklı düşük sıcaklık uygulama grupları ve bunların aynı yaştaki kontrol gruplarına ait rumuzların açıklaması sırası ile aşağıda verilmiştir:

K₀; soğuk uygulamalarının başlatıldığı 12 günlük kontrol bitkileri

U; soğuk ile uyum periyotlu (7 gün süreyle 10°C'de, %40-50 nemde, 16 saat ışık/ 8 saat karanlık fotoperiyodunda, 150 $\mu\text{mol.m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda kontrollü soğuk odada) 19 günlük uyum bitkileri

K₁, uyum gruplarına ait 19 günlük kontrol bitkileri

K₂; uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C düşük sıcaklığa maruz bırakılan stres gruplarına ait 31 günlük kontrol bitkileri

U+S₁; uyum periyotlu ve ardından 4°C düşük sıcaklığa (7 gün süreyle 10°C'de uyum periyotlu ve ardından aynı nem, fotoperiyod ve ışık yoğunluğunda 12 gün süre ile 4°C düşük sıcaklık) maruz kalmış 31 günlük stres bitkileri

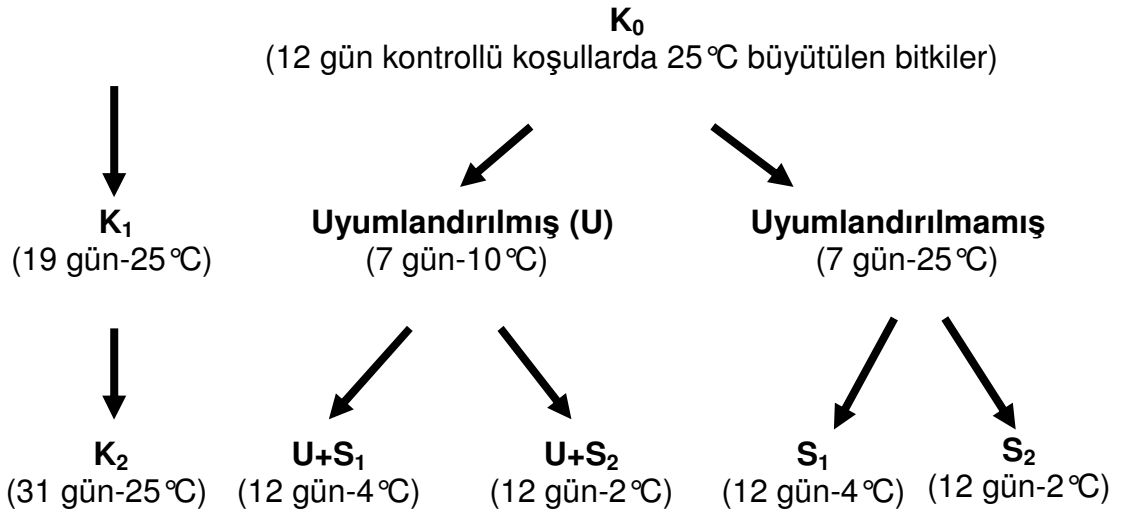
S₁; uyum periyotsuz doğrudan 4°C düşük sıcaklığa (7 gün süreyle kontrol koşullarında gelişimine devam eden ve ardından aynı nem, fotoperiyod ve ışık yoğunluğunda 12 gün süre ile 4°C düşük sıcaklık) maruz kalmış 31 günlük stres bitkileri

U+S₂; uyum periyotlu ve ardından 2°C düşük sıcaklığa (7 gün süreyle 10°C'de uyum periyotlu ve ardından aynı nem, fotoperiyod ve ışık yoğunluğunda 12 gün süre ile 2°C düşük sıcaklık) maruz kalmış 31 günlük stres bitkileri

S₂; uyum periyotsuz doğrudan 2°C düşük sıcaklığa (7 gün süreyle kontrol koşullarında gelişimine devam eden ve ardından aynı nem, fotoperiyod ve ışık yoğunluğunda 12 gün süre ile 2°C düşük sıcaklık) maruz kalmış 31 günlük stres bitkileri

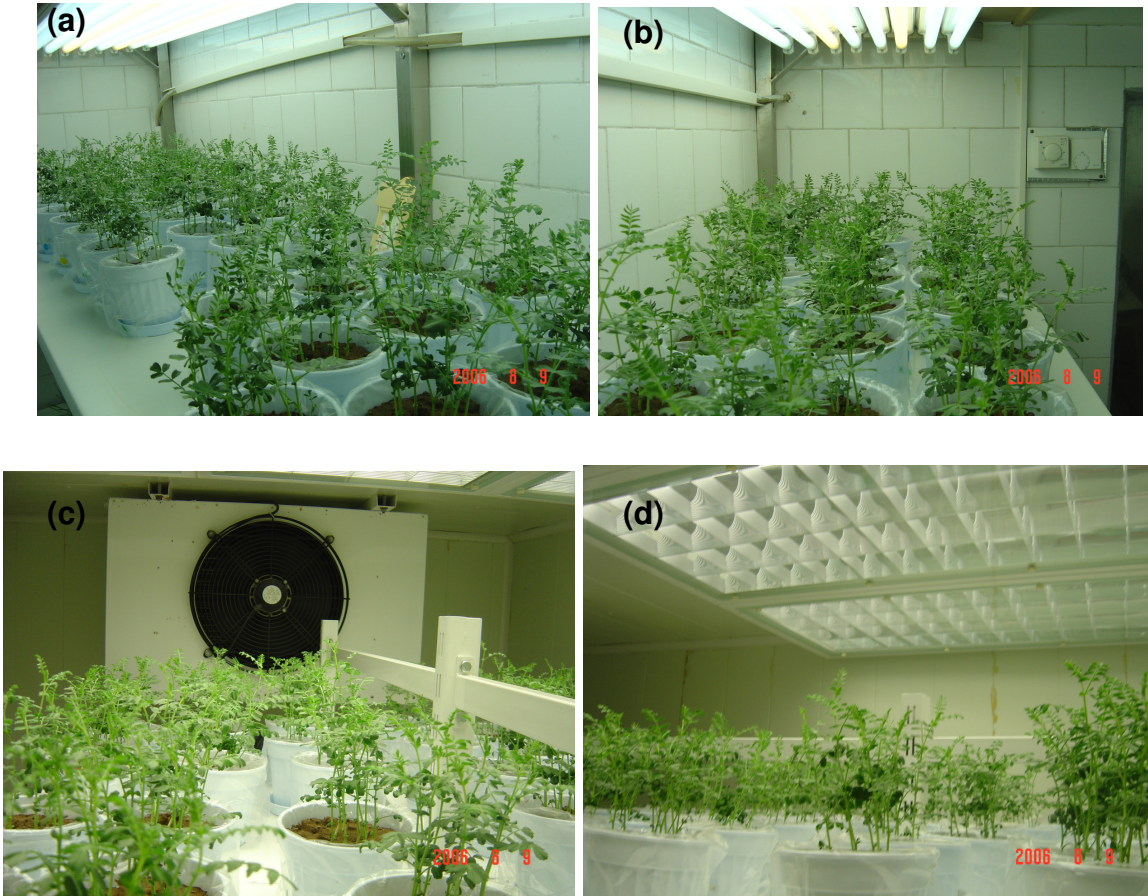
Tüm bitkiler toprak yüzeyinden kesilerek hasat edilmiştir. Soğuk uygulamalarının başlatıldığı ekimden sonraki 12. günde ilk kontrol grubunun (K₀) (12 saksı) hasadı yapılmıştır. Ayrıca soğuk uyumuna maruz bırakılacak tüm gruplar 10°C'de, %40-50 nemde, 16 saat ışık/ 8 saat karanlık fotoperiyodunda, 150 µmol m⁻¹s⁻¹ ışık yoğunluğunda olan kontrollü soğuk odaya alınmışlardır.

Geriye kalan kontrol ve stres gruplarının optimum koşullarda gelişimlerine devam etmeleri sağlanmıştır. İkinci hasatta, soğuk odada 7 gün süreyle uyumlandırılan 19 günlük bitkilerin uyum grupları (U) ile optimum koşullardaki kontrol grupları (K₁) (24 saksı) hasat edilmiştir. İkinci hasadın ardından soğuk oda +4°C'ye ve +2°C'ye



Şekil 3.1. Deneme planı.

ayarlanmış ve uyum periyotlu stres ve uyum periyotsuz stres grupları 12 gün boyunca %40-50 nemde, 16 saat ışık/ 8 saat karanlık fotoperiyodunda, 150 $\mu\text{mol.m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda +4 °C'ye ve +2 °C'ye maruz bırakılmıştır.



Şekil 3.2. 12 günlük *Cicer arietinum* L. çeşit ve hatlarının (a-b) kontrollü iklim odasındaki ve (c-d) kontrollü soğuk odadaki genel görünüşleri.

Bu arada optimum koşullarda kontrol grubu gelişimi 31. güne kadar devam ettirilmiştir. Son hasat 31. günde yapılmıştır ve geriye kalan tüm uyum periyotlu stres ($U+S_1$ ve $U+S_2$), uyum periyotsuz stres (S_1 ve S_2) ve kontrol (K_2) grupları (60 saksı) hasat edilmiştir. Deneme 4°C ve 2°C için iki kez tekrarlanmıştır. Ayrıca soğuk odada türbülanstan etkilenme oranını eşitleyebilmek için saksılar dönüşümlü olarak yer değiştirilmiştir. Her hasatta, bitkilerin yaprak dokusundan örnekler alınmış, bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal analizler yapılmış ve daha sonra dayanıklılığı sağlayan içsel savunma mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır.

3.3. lm ve analizler

3.3.1. Fizyolojik parametreler

3.3.1.1. Gövde uzunluğu ve yaprak sayısı

Kontrol ve tüm stres gruplarındaki bitkilerden 3 tekrarlı ve her bir tekrardan da 5 bitki olmak üzere 15 adet bitki ($n=15$) seçilmiş, bu bitkilerin toprak hizasından sürgün ucuna kadar olan uzunlukları ölçülerek gövde boyu (mm bitki^{-1}) ve imparipinnat bileşik yaprakları sayılarak bitkideki yaprak sayısı ($\sqrt{\text{adet bitki}^{-1}}$) belirlenmiştir.

3.3.1.2. Taze ve kuru ağırlık miktarının belirlenmesi

Kontrol ve tüm stres gruplarındaki bitkilerin toprak üstü aksamı her bir uygulama sonunda 3 tekrarlı ve her bir saksıdan birer bitki ($n=3$) olacak şekilde tartılarak taze ağırlıkları (g bitki^{-1}) belirlenmiştir. Taze ağırlığı belirlenen bitkiler, 80°C'lik etüvde 48 saat kurutulmuş ve ağırlıkları yeniden tartılarak kuru ağırlıkları (g bitki^{-1}) belirlenmiştir.

3.3.1.3. Oransal ve gerçek su içeriğinin tayini

Kontrol ve tüm stres gruplarındaki bitkilerin yaprak dokularındaki oransal ve gerçek su içeriği tayini için, nohut çeşit ve hatlarına ait bitkilerden 3 tekrarlı ve her bir tekrardan 2 bitki olmak üzere 6 adet bitkiden birer adet alınan yaprak diskleri ($n=6$) tartılarak (taze ağırlık) 5 ml distile su içeren falkon tüplere konulmuş ve oda sıcaklığında, 24 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda su ile doymun (hidrate) hale

gelen yaprak diskleri, yeniden tartılarak turgor durumundaki ağırlıkları belirlenmiştir. Daha sonra bu yaprak diskleri 80 °C'lik etüvde 48 saat kurutularak tekrar tartılmış ve kuru ağırlıkları saptanmıştır. Yaprak dokularındaki oransal su içeriği (%) Farrant (2000)'a göre ve gerçek su içeriği (%) hesaplanmıştır:

$$NSİ (\%) = (TA - KA) / (HA - KA) \times 100 \quad (3.1)$$

$$GSİ (\%) = (TA-KA) / TA \times 100 \quad (3.2)$$

Burada, TA, taze ağırlığı; HA, hidrate (turgor) ağırlığı ve KA, kuru ağırlığı ifade etmektedir.

3.3.1.4. Klorofil a floresans ölçümü

Klorofil a floresans ölçümleri için, taşınabilir, Modüle Floresans Ölçüm Sistemi (FMS-2, Hansatech Ltd.) kullanılmıştır (Şekil 3.3). Kontrol ve tüm stres grublarına ait fidelerden 3 tekrarlı ve her bir tekrardan 2 bitki olmak üzere 6 adet bitki (n=6) seçilmiş, 4. yaprakların bir yaprakçığı özel yaprak klipsleri ile üstten tutturularak oda sıcaklığında 30 dakika karanlık ile adapte edilmiştir. Modüle floresans sisteminden alınan klorofil a floresans sinyalleri uygun paket programına transfer edilerek, klorofil floresans parametreleri hesaplanmıştır (Şekil 3.3). 30 dakika karanlık adaptasyonundan sonra, 0.2 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde çok düşük ışık pulsu kullanılarak minimum floresans (F_o) belirlenmiştir. Daha sonra doygun ışık pulsu ($7500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) verilerek karanlıkta adapte edilmiş durumdaki maksimum floresans (F_M) değeri belirlenmiştir. Karanlıkla adapte edilmiş, yapraklarda PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliği ($\Phi P_o = F_V/F_M$), değişken floresansın (F_V), maksimum floresansa oranı olarak ifade edilir ve $[F_V/F_M = (F_M - F_o)/F_M]$ formülünden hesaplanır (Schreiber et al., 1994). Karanlıkta adapte edilmiş yaprak ölçümünden sonra, aktinik ışık ($250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) aydınlatılmasını takiben klorofil a floresansındaki ışık ile teşvik edilen değişiklikler F_o' (ışık ile doygun durumdaki minimum klorofil a floresans) ve F_M' (ışık ile doygun durumda maksimum floresans) belirlenmiştir. Işık ile adapte edilmiş durumdaki yapraklarda, PSII'nin gerçek fotokimyasal etkinliği $\Phi PSII = (F_M' - F_S)/F_M'$ formülünden Genty vd. (1989)'ye göre hesaplanmıştır. Buradaki F_S ışıkla adapte edilmiş yapraklardaki dinamik denge durumundaki floresansı ifade etmektedir. Bunun yanı sıra, PSII'nin eksitasyon enerjisini yakalama etkinliği $\Phi_{exc} = F_V'/F_M'$ [$F_V'/F_M' = (F_M' - F_o')/F_M'$] de

Genty vd. (1989)'ye göre hesaplanmıştır. Aktinik ışık kapatılıp, kırmızı ötesi ışık ($7 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) açıldığında elektron taşıma hızı (ETH), $[(F_M' - F_S / F_M') \times \text{PAR} \times 0.84 \times 0.5]$ formülünden hesaplanır. Burada PAR (fotosentetik aktif radyasyon), 0.84 (yaprak absorpsiyonu için ortalama faktör) ve 0.5 katsayısı ise iki fotosistem (PSI ve PSII) arasındaki absorbe edilen fotonların eşit paylaşıldığının düşünüldüğü 2 faktördür. Tüm sistemdeki, fotokimyasal kullanım $[q_P = (F_M' - F_S / F_M' - F_o)]$ ve fotokimyasal olmayan kullanım $[NPQ = (F_M - F_M') / F_M']$ da Genty vd. (1989)'ye göre hesaplanmıştır.

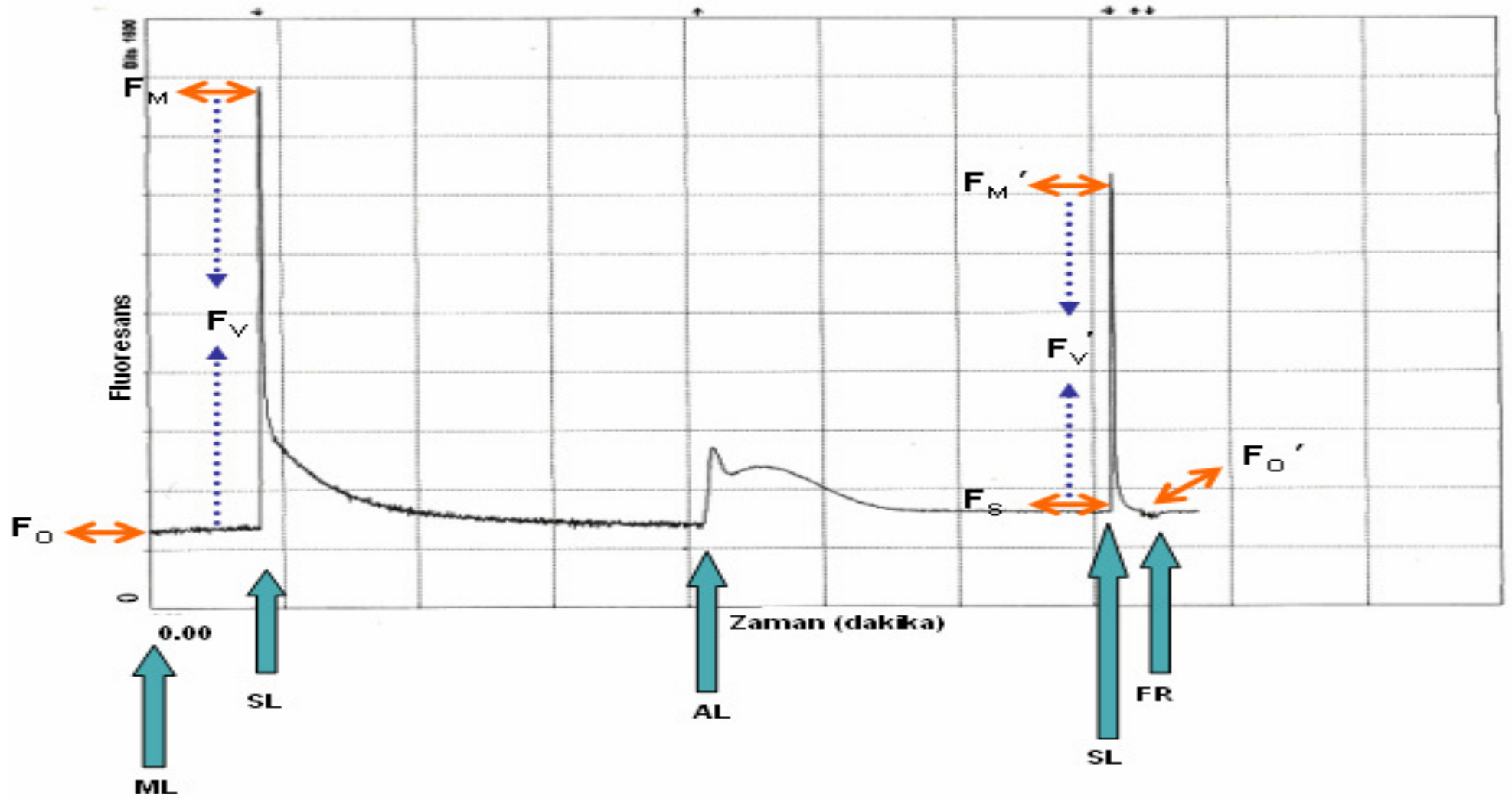


Şekil 3.3. Modüle floresans ölçüm sisteminin genel görünümü.

3.3.2. Biyokimyasal parametreler

3.3.2.1. Yaprak dokularında Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi

Yaprak dokularındaki zar hasarı, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesiyle saptanmıştır (Ohkawa et al., 1979). MDA analizi için, kontrol ve tüm stres gruplarından seçilen 6 adet bitkiden (n=6) alınan yapraklar kullanılmıştır. Gövdeden ayrılarak tartılan 0.1 g taze yaprak



Şekil 3.4. Modüle fluoresans ölçüm sisteminde alınan klorofil a fluoresans sinyalleri (ML; modüle ışık, SL ; doygun ışık, AL; aktinik ışık, FR; kırmızı ötesi ışık).

örneği küçük parçalara ayrıldıktan sonra 1,5 ml %5 Trikloroasetik asit (TCA) ile bu üzerinde homojenize edilmiştir. Bu karışım 25°C'de 12000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve malondialdehit miktarını belirlemek için süpernatant kullanılmıştır. Eşit hacimde süpernatant ve içinde %0.5 Tiyobarbitirik asit (TBA) bulunan %20'lik TCA çözeltisi yeni tüplere alınmıştır. Daha sonra 95°C'de 30 dakika su banyosunda tutulan tüpler buz banyosuna konulmuş ve böylece tüplerdeki reaksiyonlar durdurulmuştur. Bu işlemden sonra, tüpler 5 dakika 1000 rpm'de santrifüjlenip spektrofotometrede (Spectro UV-Vis Double Beam PC) 532 ve 600 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Kör olarak içinde %0.5 TBA bulunan %20'lik TCA çözeltisi kullanılmıştır. Yaprak dokularındaki MDA miktarı aşağıdaki formüle göre nmol g TA^{-1} olarak hesaplanmıştır;

$$\text{MDA içeriği} = [(A_{532} - A_{600}) \times \text{ekstraksiyon hacmi}] / [155 \times \text{örnek miktarı}] \quad (3.3)$$

3.3.2.2. Yaprak dokularındaki pigment miktarının belirlenmesi

Yaprak dokularındaki pigment içeriklerinin belirlenmesi için kontrol ve tüm stres grubundaki bitkilerden 3 tekrarlı ve her bir tekrardan 2 bitki olmak üzere 6 adet bitki ($n=6$) kullanılmıştır.

Klorofil *a* ve *b*, toplam klorofil (*a+b*) ve karotenoid (ksantofil+ β -karoten) miktarları ($\text{mg ml}^{-1} \text{ g TA}^{-1}$) Lichtenthaler (1987)'a göre belirlenmiştir. Bitkilerin yapraklarından alınan yaprakçıklar ($n=6$) tartılıp küçük parçalara ayrıldıktan sonra ependorf tüplere alınmış ve klorofil *a* ve *b*, toplam klorofil (*a+b*) ve karotenoid (*x+c*) içeriğini belirlemek amacıyla tüplere 1 ml, %100'lük aseton eklenmiştir. Örnekler, pigmentlerin yaprak dokusundan çözültüye geçmesi için 1 hafta buzdolabında (+4°C), karanlıkta bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda örneklerin absorbansları spektrofotometrede (Spectro UV-Vis Double Beam PC) 470, 644.8 ve 661.6 nm dalga boylarında okunmuştur.

Antosiyanin içeriği Mancinelli vd. (1975)'ye göre belirlenmiştir. Yaprak dokularındaki antosiyanin miktarını ($\text{mg ml}^{-1} \text{ g TA}^{-1}$) belirlemek için ependorf tüplerine alınan yaprakçıklar, üzerlerine 500 μl %79 metanol, %20 distile su ve %1 HCl'den oluşan karışım eklenerek ezilmiştir. Ezme işleminin tamamlanmasından sonra tüplere aynı karışımdan 500 μl daha eklenmiştir. Örnekler, antosiyanin pigmentinin yaprak

dokusundan çözeltiliye geçmesi için 1 hafta buzdolabında (+4°C), karanlıkta bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda örneklerin absorbansları spektrofotometrede (Spectro UV-Vis Double Beam PC) 530 ve 657 nm dalga boylarında okunmuştur.

Pigment miktarları aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır;

$$\text{Klorofil } a \text{ (kl.a)} = (11.24 \times A_{661.6}) - (2.04 \times A_{644.8}) \quad (3.4)$$

$$\text{Klorofil } b \text{ (kl.b)} = (20.13 \times A_{644.8}) - (4.19 \times A_{661.6}) \quad (3.5)$$

$$\text{Toplam klorofil (kl.a+b)} = (7.05 \times A_{661.6}) + (18.09 \times A_{644.8}) \quad (3.6)$$

$$\text{Karotenoid (x+c)} = [(1000 \times A_{470}) - (1.9 \times \text{kl.a}) - (63.14 \times \text{kl.b})] / 214 \quad (3.7)$$

$$\text{Antosiyanin} = A_{530} - (A_{657}/3) \quad (3.8)$$

Flavonoid miktarı ise Mirecki ve Teramura (1984)'ya göre belirlenmiştir. Yaprak dokularındaki flavonoid miktarını kontrole göre yüzde olarak belirlemek için gövdeden ayrılarak tartılan 0.1 g taze yaprak örneği küçük parçalara ayrılmış, üzerlerine 6 ml %79 metanol, %20 distile su ve %1 HCl'den oluşan karışım eklenerek havanda ezilmiştir. Ezme işleminin tamamlanmasından sonra ependorf tüplere alınan örnekler 4°C'de 10000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı toplanarak spektrofotometrede (Spectro UV-Vis Double Beam PC) 300 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür.

3.3.2.3. Yaprak dokularındaki prolin miktarının belirlenmesi

Prolin miktarı belirlenecek olan özütler, Weimberg (1987)'in metodu modifiye edilerek hazırlanmıştır. Kontrol ve tüm stres gruplarındaki bitkilerden alınan yaprak örnekleri 80°C'lik etüvde 48 saat kurutulmuş ve prolin miktarının belirlenmesi için 3 tekrarlı olarak 20 mg tartılmıştır. Üzerine 5 ml distile su eklenen kuru materyal 95°C'de 10 dakika sıcak su banyosunda tutulduktan sonra soğutulmuş ve filtre kağıtlarından geçirilerek süzümüştür. Süzme işleminden sonra tüplerde geriye kalan çökelti, üzerine 5 ml distile su ilave edilerek 95°C'de 10 dakika sıcak su banyosunda yeniden reaksiyona sokulmuştur. Numuneler soğutulup süzülerek önceki süzüntüye eklenmiştir. Bu işlemden sonra süzüntülerin son hacmi distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Örnekler, prolin analizi için, asit-ninhidrin metoduna göre hazırlanmış ve örneklerin absorbansları spektrofotometrede (Spectro UV-Vis Double

Beam PC) 520 nm'de okunmuş ve örneklerdeki prolin miktarı ($\mu\text{mol g KA}^{-1}$) Bates vd. (1973)'ye göre belirlenmiştir.

3.3.2.4. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Enzim aktiviteleri protein miktarlarına bağlı olarak hesaplandığı için öncelikle tüm enzim özütlerinin protein içerikleri belirlenmiştir.

3.3.2.4.1. Protein içeriğinin belirlenmesi

Kontrol ve tüm stres gruplarına ait yaprak örneklerinin protein konsantrasyonları, Bradford (1976) metoduna göre sığır serum albümini (BSA) standardı kullanılarak belirlenmiştir. Bradford çözeltisinin hazırlanması için; 500 mg Coomassie Blue G, 50-70 ml suda çözülerek bu çözelti içine sırasıyla 250 ml %95'lik etanol ve 500 ml %85'lik fosforik asit eklenip karıştırılır. Daha sonra bu çözelti 1 L'ye tamamlanır ve +4°C'de karanlıkta tutulur. Bu konsantre Bradford çözeltisi (5X) kullanılmadan önce 5 kez seyreltilmiştir (1X).

20 μl örnek çözelti ile 480 μl distile su karıştırıldıktan sonra, karışıma 5 ml Bradford çözeltisi (1X) eklenmiştir. Bu karışım 10 saniye vortekslelendikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Bu işlemler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Çözeltinin absorbans değerleri spektrofotometrede (Spectro UV-Vis Double Beam PC) 595 nm dalga boyunda okunmuştur.

3.3.2.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi, Nitrobluetetrazolyum'un (NBT) fotokimyasal indirgenmesini esas alan yöntemle göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Beyer and Fridovich, 1987). Kontrol ve tüm stres gruplarına ait bitkilerden alınan taze yapraklar (0.5 g) sıvı azotta havanda ezildikten sonra 9 mM Tris-HCl tamponu (pH 6.8) ve %13.6 gliserol içeren 1 ml'lik homojenize tampon çözeltiye koyulmuştur (Burke and Oliver, 1992). Bu karışım +4°C'de 14000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiş ve enzimi içeren süpernatant kısmı ayrılmıştır. 50 mM fosfat tamponu (pH 7.8), 9.9 mM L-Metiyonin, 57 μM NBT ve %1 Triton X-100 karıştırılmış ve bu karışımdan alınan 1ml çözeltiye 20 μl süpernatant eklenmiştir. Örneğin konulmasını takiben reaksiyonu başlatmak için üzerine 10 μL riboflavin ilave edilmiştir. Karıştırma işleminden sonra tüpler 375 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda

floresan ışığına maruz bırakılmış ve absorbans değerleri köre karşı spektrofotometrede (Spectro UV-Vis Double Beam PC) 560 nm dalga boyunda okunmuştur. Toplam SOD aktivitesi ünite mg protein⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Bir enzim ünitesinin aktivitesi, NBT redüksiyonunda %50'lik bir inhibisyon yaratmak için gereken SOD miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.3.2.4.3. Askorbat Peroksidaz (APX) aktivitesinin belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) enzim aktivitesi Wang vd. (1991)'nin metoduna göre belirlenmiştir. Kontrol ve tüm stres gruplarına ait bitkilerden alınan taze yapraklar (0.5 g) sıvı azotta havanda ezildikten sonra 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), %2 PVP, 1mM Na₂EDTA ve 2mM askorbat içeren 1.5 ml'lik süspansiyon çözeltisine eklenmiştir. Bu karışım +4 °C'de 12000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendikten sonra 75 µg protein içeren enzime 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.6), 2.5 mM askorbat ve 10 mM H₂O₂ ile son hacim 1 ml olacak şekilde ilave edilmiştir. H₂O₂'nin eklenmesi ile reaksiyon başlatılmıştır. Askorbatın okside olması nedeniyle askorbat konsantrasyonunda azalma görülmektedir. Bu azalma spektrofotometrik olarak 290 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin enzim özütü içermeyen reaksiyon çözeltisine karşılık kaydedilmesiyle değerlendirilmiştir. Toplam APX enzim aktivitesi, askorbatın ekstinksiyon katsayısı (2.8 mM cm⁻¹) kullanılarak başlangıç hızından (nmol askorbat dak⁻¹ mg protein⁻¹) hesaplanmıştır.

3.3.2.4.4. Glutasyon Redüktaz (GR) aktivitesinin belirlenmesi

Glutasyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) enzim aktivitesi Rao vd. (1995)'nin metodu ile belirlenmiştir. Kontrol ve tüm stres gruplarına ait bitkilerden alınan 0.5 g taze yaprak örneği sıvı azotta havanda ezildikten sonra 100 mM potasyum fosfat (pH 7.0), 1 mM Na₂EDTA ve %2 PVP içeren 1.5 ml'lik süspansiyon çözeltiye eklenmiştir. Bu karışım 18000 g ve +4 °C'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant enzim ölçümü için ayrılmıştır. 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.8), 2 mM Na₂EDTA, 0.5 mM GSSG, 0.2 mM NADPH ve 100 µg protein içeren enzim ekstraktı son hacim 1 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon, ortama NADPH'in eklenmesiyle başlatılmıştır. Örneklerin absorbansı spektrofotometrede 340 nm'de okunmuştur. NADPH'in enzimatik olmayan oksidasyonu için 340 nm dalga boyunda GSSG eklenmeyerek kaydedilen azalışla düzeltme yapılmıştır. Toplam GR enzim aktivitesi,

NADPH'ın ekstinksiyon katsayısı (6.2 mM cm^{-1}) kullanılarak enzimatik olmayan oksidasyon çıkarıldıktan sonra reaksiyonun başlangıç hızından $\text{nmol NADPH dak}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

3.3.2.4.5. Peroksidaz (POD) aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7) enzim aktivitesi Bergmeyer (1974)'e göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 3ml olup 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 20.1 mM guaiakol, 12.3 mM H_2O_2 ve enzim özütü içermektedir. Reaksiyon enzim özütünün ilavesiyle başlatılmış ve 10 dakikalık süre içinde izlenmiştir. Toplam POD enzim aktivitesi, guaiakol'ün ekstinksiyon katsayısı (26.6 mM cm^{-1} , 470 nm) kullanılarak reaksiyon başlangıç hızından $\text{nmol H}_2\text{O}_2 \text{ dak}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

3.3.3. İstatistiksel analizler

Bu araştırma kapsamında denemeler rastgele deneme deseninde en az 3 tekrarlı olacak şekilde düzenlenmiştir. Denemelerden elde edilen verilere istatistiki varyans analizi (ANOVA), istatistik paket programı (SPSS) kullanılarak yapılmıştır. Analizlerde ölçülebilen değerler doğrudan, sayı değerleri de karekök dönüşümleri yapılarak analiz edilmiştir. Her bir değişken için uygulama ile genotipler arasındaki farkın önem kontrolü Anlamlı Önemli Fark (AÖF) %5 düzeyinde hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının bazı fizyolojik parametreler üzerine etkisi

4.1.1. Gövde uzunluğu üzerine etkisi

Soğuk uygulamalarının ilk başladığı gündeki 12 günlük bitki grupları (K_0) ile uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları (K_1) ve uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış gruplarının kontrolleri (K_2)'nin gövde uzunluklarındaki değişim incelendiğinde (Çizelge 4.1) zamana bağlı olarak tüm genotiplerin gövde uzunluğunun önemli düzeyde arttığı saptanmıştır. Diğer taraftan, AkN 290 dışındaki genotiplerin hepsinde uyum kontrol grupları (K_1) ile uyum grupları (U) arasında 10°C'lik düşük sıcaklığa bağlı olarak gövde uzunluğunda önemli bir azalma belirlenmiştir. En fazla azalma AkN 87'de (%14.2) ve en az azalma ise AkN 290'da (%2.5) meydana gelmiştir. Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık ($U+S_1$), genotiplerin gövde uzamasında kendi kontrollerine (K_2) göre önemli bir inhibisyona neden olmuştur. Bu inhibisyon Gökçe'de %24.1, Canitez'de %18.9, AkN 87'de %16.3 ve AkN 290'da %7.4 olarak belirlenmiştir.

Tüm genotiplerde uyumdan sonra 4°C sıcaklık uygulanan gruplar ($U+S_1$) ile uyum periyotsuz 4°C'ye alınan (S_1) stres grupları arasında gövde uzunluğunda istatistiksel olarak önemli bir artış meydana gelmiştir. S_1 ve kendi kontrolleri (K_2) arasında ise, uygulanan 4°C soğuğa bağlı olarak Gökçe ve Canitez çeşitlerinin gövde uzunluklarında önemli bir inhibisyon gözlemlenirken; bu etki AkN 87 ve AkN 290 hatlarında istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur.

Düşük sıcaklık derecesinin azalmasına bağlı olarak, uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan ($U+S_2$) grupların gövde uzunluğunda meydana gelen inhibisyon, uyum periyotlu 4°C'ye alınan ($U+S_1$) gruplardakine göre tüm genotiplerde önemlidir, bu inhibisyon Gökçe, AkN 87, Canitez ve AkN 290'da sırasıyla %5.5, %4.5, %3.5 ve %3.7'dir. Bunun yanı sıra, tüm genotiplerde uyumdan sonraki 2°C ($U+S_2$) ile uyum periyotsuz doğrudan gerçekleştirilen 2°C (S_2) uygulamaları arasında gövde uzunluğundaki değişim önemli bulunmuştur.

Doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan (S₂) genotiplerin kendi kontrollerine (K₂) göre sıcaklık azalmasına bağlı gövde uzaması inhibisyonu tüm genotiplerde önemli olup en fazla inhibisyon %23.6 ile Gökçe'de ve en az inhibisyon %4.8 ile AkN 87'de saptanmıştır. Uyum periyotsuz 4°C (S₁) ve 2°C'ye (S₂) maruz bırakılan gruplar arasında soğuk derecesinin azalmasına bağlı olarak gövde uzamasındaki inhibisyon Canitez ve AkN 87'de istatistiksel olarak önemsizken; bu etki Gökçe ve AkN 290'da önemli bulunmuştur.

4.1.2. Yaprak sayısı üzerine etkisi

Soğuk uygulamalarının genotiplerin yaprak sayısı üzerine etkileri incelendiğinde (Çizelge 4.1); soğuk uygulamasının ilk başladığı günde hasat edilen ilk kontrol grubu (K₀) ile uyumlanmış bitkilerin kontrol grubu (K₁) arasında tüm genotiplerde, büyüme ve gelişmeye bağlı olarak yaprak sayısında önemli bir artma meydana gelmiştir. Bu önemli artış, uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış gruplarının kontrollerinde (K₂) de devam etmiştir. Uyum grupları (U) ile kendi kontrolleri (K₁) arasında sıcaklık düşüşüne bağlı yaprak oluşumundaki inhibisyon tüm genotiplerde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bu inhibisyon en çok Gökçe'de (%19.1), en az ise AkN 87 (%10.8)'dedir.

Uyumdan sonra 4°C'ye maruz bırakılan grupların yaprak sayısında (U+S₁), kontrollerine (K₂) göre önemli bir azalma saptanmıştır. Bu inhibisyon Gökçe'de %36, Canitez'de %34.5, AkN 87'de %28.6 ve AkN 290'da %29.6'dır. Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık (U+S₁) ile uyum periyotsuz 4°C'ye alınan (S₁) bitki gruplarının yaprak sayısındaki değişim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bunun yanı sıra, uygulanan 4°C soğuk stresi (S₁), aynı yaştaki kontrollere göre (K₂) tüm genotiplerde yaprak sayısını önemli düzeyde azaltmıştır. Uyum periyotlu 4°C (U+S₁) ve 2°C (U+S₂) düşük sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan grupların yaprak sayısındaki değişim incelendiğinde; sıcaklık derecesinin azalmasına bağlı olarak tüm genotiplerin yaprak sayısı önemli derecede azalmıştır. Yaprak sayısındaki bu azalmanın Gökçe'de %11.6 diğer genotiplerde ise %6-8 arasında olduğu saptanmıştır.

Bütün genotiplerde, uyumdan sonra 2°C (U+S₂) ile uyum periyotsuz 2°C (S₂) uygulanan gruplar arasındaki yaprak sayısı artışı önemlidir. Uyum periyotsuz 2°C'ye (S₂) ve uyum periyotsuz 4°C'ye (S₁) maruz bırakılan gruplar karşılaştırıldığında;

yaprak sayılarındaki azalmanın, azalan düşük sıcaklık derecesine bağlı olarak yalnızca nohut çeşitlerinde önemli olduğu saptanmıştır.

4.1.3. Taze ağırlık üzerine etkisi

Farklı soğuk uygulamalarının genotiplerin taze ağırlığına etkisi incelendiğinde (Çizelge 4.1); 12 günlük ilk kontrol grubu (K_0) ile uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları (K_1) arasındaki zamana bağlı artış genotiplerden sadece AkN 87'de istatistiksel açıdan önemlidir. Buna karşın, K_1 ile uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış gruplarının kontrolleri (K_2) arasındaki zamana bağlı olarak meydana gelen artma AkN 87 dışındaki genotiplerde istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Bunun yanı sıra, soğuk uyumu (U) genotiplerin hiç birinde kendi kontrolüne (K_1) göre taze ağırlığı önemli derecede azaltmamıştır. Ancak, uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık ($U+S_1$) sadece Gökçe'de kendi kontrolüne (K_2) göre taze ağırlıkta önemli bir azalışa neden olmuştur. Her bir genotiplere ait, uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres grupları ($U+S_1$) ile uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan gruplar (S_1) arasındaki taze ağırlık miktarlarındaki değişim, istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan ($U+S_2$) grupların, uyum periyotlu 4°C'ye alınan ($U+S_1$) gruplara göre, düşük sıcaklık derecesinin azalmasına bağlı olarak taze ağırlıklarındaki azalışın, sadece AkN 87'de önemli olduğu saptanmıştır. Uyum periyotlu 2°C'ye alınan bitkilerin ($U+S_2$) kendi kontrollerine (K_2) göre taze ağırlıklarındaki azalış tüm genotiplerde önemli bulunmuş ve bu azalış Gökçe'de %41.9, Canitez'de %37.9, AkN 87'de %33.6 ve AkN 290'da %26 olarak belirlenmiştir. Uyum periyotsuz 2°C'ye maruz bırakılan (S_2) gruplar ile kendi kontrolleri (K_2) arasındaki soğuk stresine bağlı taze ağırlık azalışı AkN 87 ve AkN 290 hatlarında önemsizken; bu etki Gökçe ve Canitez çeşitlerinde istatistiksel olarak önemli bulunmuş ve bu azalmanın çeşitlerin kontrollerine göre %24 olduğu saptanmıştır. Genotiplerin hiçbirinde, uyumdan sonra 2°C ($U+S_2$) ile uyum periyotsuz 2°C (S_2) uygulanan gruplar ve uyum periyotsuz 4°C (S_1) ve 2°C (S_2)'ye maruz bırakılan gruplar arasındaki taze ağırlık değişimleri önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.1. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının bazı büyüme parametreleri üzerine etkisi

Genotipler	Uygulamalar	Gövde uzunluğu (mm bitki ⁻¹)	Yaprak sayısı ($\sqrt{\text{adet bitki}^{-1}}$)	Taze ağırlık (g bitki ⁻¹)	Kuru ağırlık (g bitki ⁻¹)
Gökçe	K ₀	128.40±1.00	2.0±0.03	0.78±0.07	0.12±0.002
	U	130.67±1.20	2.4±0.01	0.85±0.10	0.15±0.020
	K ₁	141.60±1.40	2.7±0.02	0.92±0.12	0.16±0.020
	K ₂	197.73±3.92	3.3±0.06	1.60±0.25	0.34±0.060
	U+S ₁	150.13±1.36	2.6±0.03	1.19±0.15	0.24±0.030
	S ₁	159.47±1.66	2.9±0.02	1.27±0.08	0.28±0.020
	U+S ₂	141.80±1.71	2.5±0.01	0.93±0.08	0.19±0.020
	S ₂	151.07±1.41	2.8±0.02	1.21±0.04	0.26±0.010
Canitez	K ₀	124.00±1.09	2.3±0.03	0.77±0.06	0.12±0.010
	U	139.67±0.96	2.6±0.03	0.98±0.02	0.16±0.002
	K ₁	154.00±1.98	2.8±0.04	1.00±0.03	0.17±0.010
	K ₂	188.47±1.91	3.4±0.02	1.61±0.08	0.30±0.010
	U+S ₁	152.80±1.32	2.8±0.02	1.29±0.02	0.24±0.010
	S ₁	159.67±1.64	3.0±0.02	1.28±0.06	0.26±0.020
	U+S ₂	147.47±1.34	2.7±0.02	1.00±0.05	0.21±0.010
	S ₂	157.27±0.62	2.9±0.02	1.22±0.08	0.25±0.010
AkN 87	K ₀	135.07±1.06	2.2±0.02	0.80±0.04	0.13±0.010
	U	146.13±0.99	2.7±0.03	0.98±0.02	0.19±0.004
	K ₁	170.33±1.11	2.8±0.01	1.31±0.10	0.21±0.002
	K ₂	184.07±0.62	3.3±0.01	1.46±0.04	0.35±0.005
	U+S ₁	154.00±0.72	2.8±0.02	1.37±0.05	0.28±0.010
	S ₁	179.27±2.29	2.9±0.02	1.46±0.10	0.31±0.020
	U+S ₂	147.00±0.76	2.7±0.02	0.97±0.06	0.22±0.020
	S ₂	175.20±0.63	2.9±0.02	1.17±0.10	0.26±0.030
AkN 290	K ₀	123.60±1.88	2.3±0.02	0.77±0.03	0.12±0.004
	U	155.47±1.42	2.5±0.03	0.80±0.07	0.13±0.020
	K ₁	159.40±1.34	2.8±0.02	1.02±0.04	0.18±0.010
	K ₂	175.27±3.52	3.2±0.03	1.49±0.25	0.29±0.060
	U+S ₁	162.33±2.25	2.7±0.02	1.25±0.11	0.25±0.020
	S ₁	171.73±3.40	2.8±0.05	1.19±0.10	0.26±0.010
	U+S ₂	156.40±0.54	2.6±0.03	1.11±0.06	0.22±0.010
	S ₂	165.00±0.75	2.8±0.02	1.23±0.07	0.25±0.010
AÖF %5	4.95	0.075	0.38	0.07	

* (K₀=stresin başlatıldığı 12 günlük kontrol grubu, U=7 gün süreyle 10°C'de uyumlandırılan 19 günlük gruplar, K₁=19 günlük kontrol grubu, K₂=31 günlük kontrol grubu, U+S₁=uyumlandırıldıktan sonra 12 gün süreyle 4°C'ye maruz bırakılan 31 günlük gruplar, S₁=uyumlandırılmadan 12 gün süreyle 4°C'ye maruz bırakılan 31 günlük gruplar, U+S₂=uyumlandırıldıktan sonra 12 gün süreyle 2°C'ye maruz bırakılan 31 günlük gruplar, S₂=uyumlandırılmadan 12 gün süreyle 2°C'ye maruz bırakılan 31 günlük gruplar)

4.1.4. Kuru ağırlık üzerine etkisi

Tüm genotiplerde, uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış bitkilerin kontrollerinin (K_2) hem 12 günlük ilk kontrol grubuna (K_0) hem de uyumlanmış bitkilerin kontrol gruplarına (K_1) göre belirlenen kuru ağırlık artışı önemlidir (Çizelge 4.1). Bunun yanı sıra, K_0 ile K_1 arasındaki kuru ağırlık artışı sadece AkN 87 hattında önemlidir,

Soğuk uyumu (U) genotiplerin hiçbirinde kendi kontrollerine (K_1) göre kuru ağırlık miktarında önemli bir azalışa neden olmamıştır. Uyum periyotlu 4°C'ye alınan gruplar ($U+S_1$) ile kendi kontrolleri (K_2) arasındaki kuru ağırlık miktarı azalışı incelendiğinde; bu azalışın Gökçe ve AkN 87 genotiplerinde önemli olmasına karşın, Canitez ve AkN 290'da istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır. Uyum periyotsuz 4°C (S_1) sıcaklık uygulanan tüm genotiplerde, belirlenen kuru ağırlık artışı $U+S_1$ gruplarına ve kendi kontrollerine (K_2) göre önemsizdir. Uyum periyotlu 2°C'ye alınan grupların ($U+S_2$) kendi kontrol gruplarına (K_2) göre kuru ağırlıklarında meydana gelen azalma istatistiki olarak önemli olup, bu azalma, Gökçe, Canitez, AkN87 ve AkN 290'da sırasıyla %44, %30, %37 ve %24 olarak hesaplanmıştır. Bunun yanı sıra, uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan bitkilerin (S_2) kontrol grupları olan K_2 ile aralarındaki kuru ağırlık miktarlarındaki azalma Gökçe ve AkN 87'de önemli olup, bu azalma sırası ile %23.5 ve %25.7 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, uyumlanarak 2°C'ye alınan gruplar ($U+S_2$) ile uyumlanmadan 2°C'ye alınan gruplar (S_2) arasında kuru ağırlıktaki azalma da sadece Gökçe çeşidinde önemli bulunmuştur. Uyumlanmadan 4°C (S_1) ve 2°C (S_2)'ye maruz bırakılan gruplar arasında düşük sıcaklık derecesinin artmasına bağlı olarak kuru ağırlıklarda belirlenen azalış, genotiplerin hiçbirinde istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

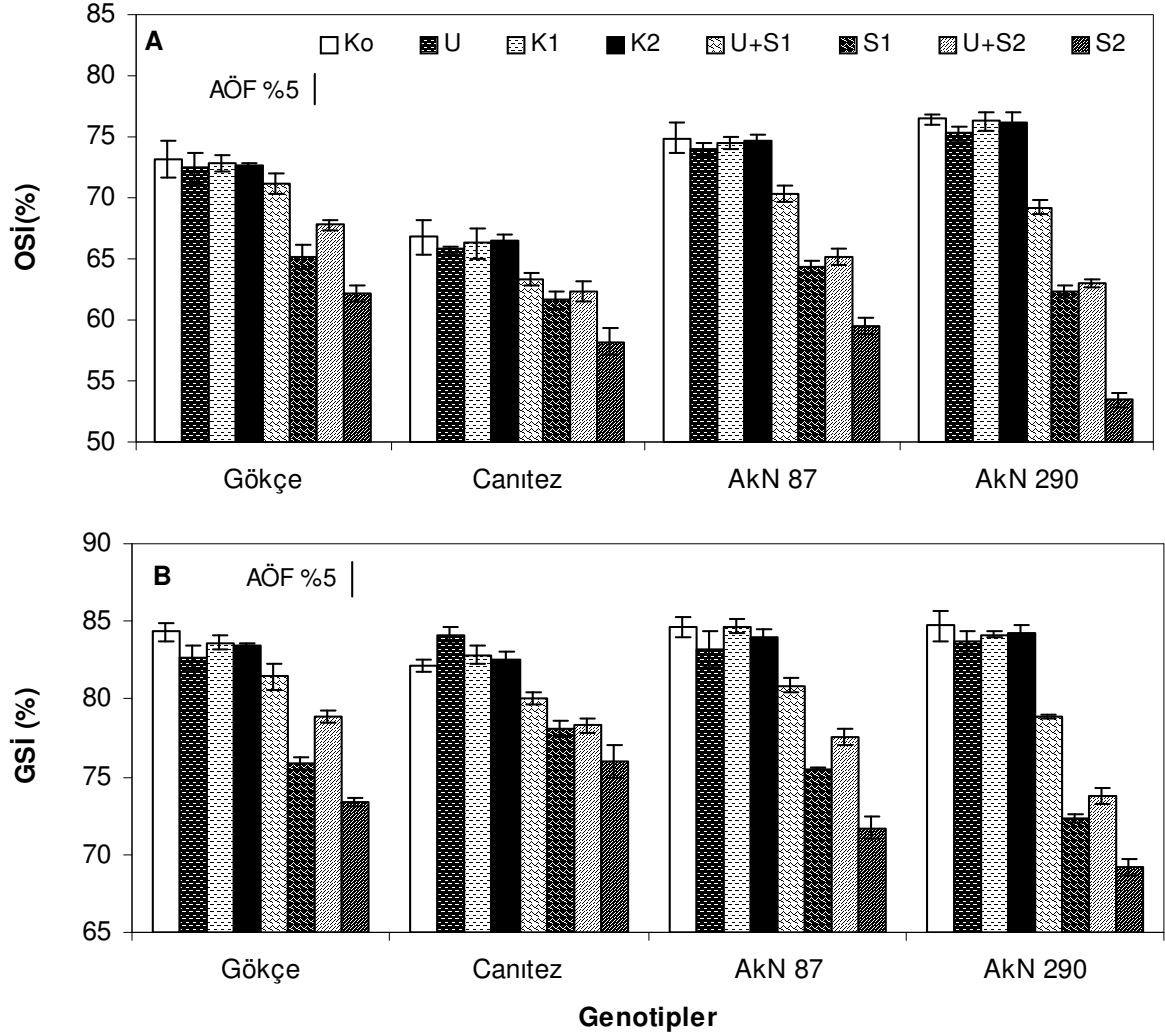
4.1.5. Yaprak oransal ve gerçek su içeriği üzerine etkisi

İki farklı düşük sıcaklık uygulamasının genotiplerin oransal su içeriği üzerine etkisi incelendiğinde (Şekil 4.1A), belirlenen tüm kontrol grupları (K_0 , K_1 ve K_2) arasındaki değişimler ve uyum grupları (U) ile bu uygulamanın kontrolleri (K_1) arasındaki değişimler, genotiplerin hiçbirinde önemli bulunmamıştır. Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık ($U+S_1$), kendi kontrollerine (K_2) göre Gökçe hariç, diğer tüm genotiplerde oransal su içeriğinde önemli bir azalışa neden olmuştur ve

bu azalış Canitez'de %4.6, AkN 87'de %5.8 ve AkN 290'da %9.1'dir. Uyum periyotsuz 4°C'ye alınan stres gruplarının (S_1) oransal su içeriğindeki azalış hem uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık ($U+S_1$) gruplarına hem de kendi kontrollerine (K_2) göre tüm genotiplerde istatistiksel olarak önemlidir. Uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan ($U+S_2$) grupların uyum periyotlu 4°C'ye alınan ($U+S_1$) gruplara göre sıcaklık azalmasına bağlı olarak oransal su içeriğindeki azalış Canitez'de önemsizken, diğer genotiplerde önemlidir. Hem uyumlanarak 2°C'ye alınan grupların ($U+S_2$) hem de uyumlanmadan 2°C'ye alınan grupların (S_2) oransal su içeriğinde hem birbirlerine hem de kendi kontrollerine göre istatistiksel olarak önemli azalışlar meydana gelmiştir. Tüm genotiplerde, uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılanların (S_2) uyum periyotsuz 4°C'ye alınanlara (S_1) göre oransal su içeriği, düşük sıcaklık derecesine bağlı istatistiksel olarak önemli derecede azalmıştır. Bu azalma, Gökçe, Canitez, AkN87 ve AkN 290'da sırasıyla %4.6, %5.4, %7.5 ve %14.3'tür.

Soğuk uygulamalarının, genotiplerin yaprak dokularındaki gerçek su içeriği üzerine etkisi incelendiğinde (Şekil 4.1B); oransal su içeriğinde gözlenen cevaba benzer olarak, tüm kontrol (K_0 , K_1 ve K_2) ve uyum (U) grupları arasındaki değişimler hiçbir genotipte önemli bulunmamıştır. Bunun yanı sıra, uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık ($U+S_1$), kontrollerine (K_2) göre, tüm genotiplerin gerçek su içeriğinde önemli bir azalışa neden olmuştur ve bu azalış en fazla %6.4 ile AkN 290'da, en az %2.5 ile Gökçe'dedir. Uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres gruplarının (S_1) gerçek su içeriğindeki azalışın, hem uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık ($U+S_1$) gruplarına hem de kontrollerine (K_2) göre tüm genotiplerde istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Uyumdan sonra 2°C soğuğa ($U+S_2$) maruz kalan genotiplerden Gökçe, AkN 87 ve AkN 290'nin $U+S_1$ 'e göre gerçek su içeriği düşük sıcaklık derecesinin azalışına bağlı önemli düzeyde azalmıştır. Bununla beraber $U+S_2$ gruplarında tüm genotiplerin gerçek su içeriği kendi kontrollerine (K_2) göre de önemli düzeyde azalmıştır. Uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan stres grupları ($U+S_2$) ile uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye alınan stres grupları (S_2) arasında gerçek su içeriğindeki azalışlar tüm genotiplerde istatistiksel olarak önemlidir ve en çok azalma %7.6 ile AkN 87'de görülmektedir.

Tüm genotiplerde uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılanların (S₂) uyum periyotsuz 4°C'ye alınanlara (S₁) göre gerçek su içeriği azalan düşük sıcaklık derecesine bağlı olarak önemli düzeyde azalmıştır.



Şekil 4.1. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarınının yaprak oransal su içeriği (OSİ) (A) ve gerçek su içeriği (GSİ) (B) üzerine etkisi

(Ko=soğuk uygulamalarının başlatıldığı 12 günlük kontrol grubu, U=7 gün süreyle 10°C'de uyumlandırılan 19 günlük gruplar, K₁=19 günlük kontrol grubu, K₂=31 günlük kontrol grubu, U+S₁=uyum periyotlu 12 gün süreyle 4°C'ye maruz bırakılan 31 günlük gruplar, S₁=uyum periyotsuz 12 gün süreyle 4°C'ye maruz bırakılan 31 günlük gruplar, U+S₂= uyum periyotlu 12 gün süreyle 2°C'ye maruz bırakılan 31 günlük gruplar, S₂=uyum periyotsuz 12 gün süreyle 2°C'ye maruz bırakılan 31 günlük gruplar).

Ortalama OSİ ve GSİ ile standart hata ve AÖF %5 değerleri EK, Çizelge 1 ve 2'de verilmiştir.

4.1.6. Yapraklardaki fotokimyasal etkinlik üzerine etkisi

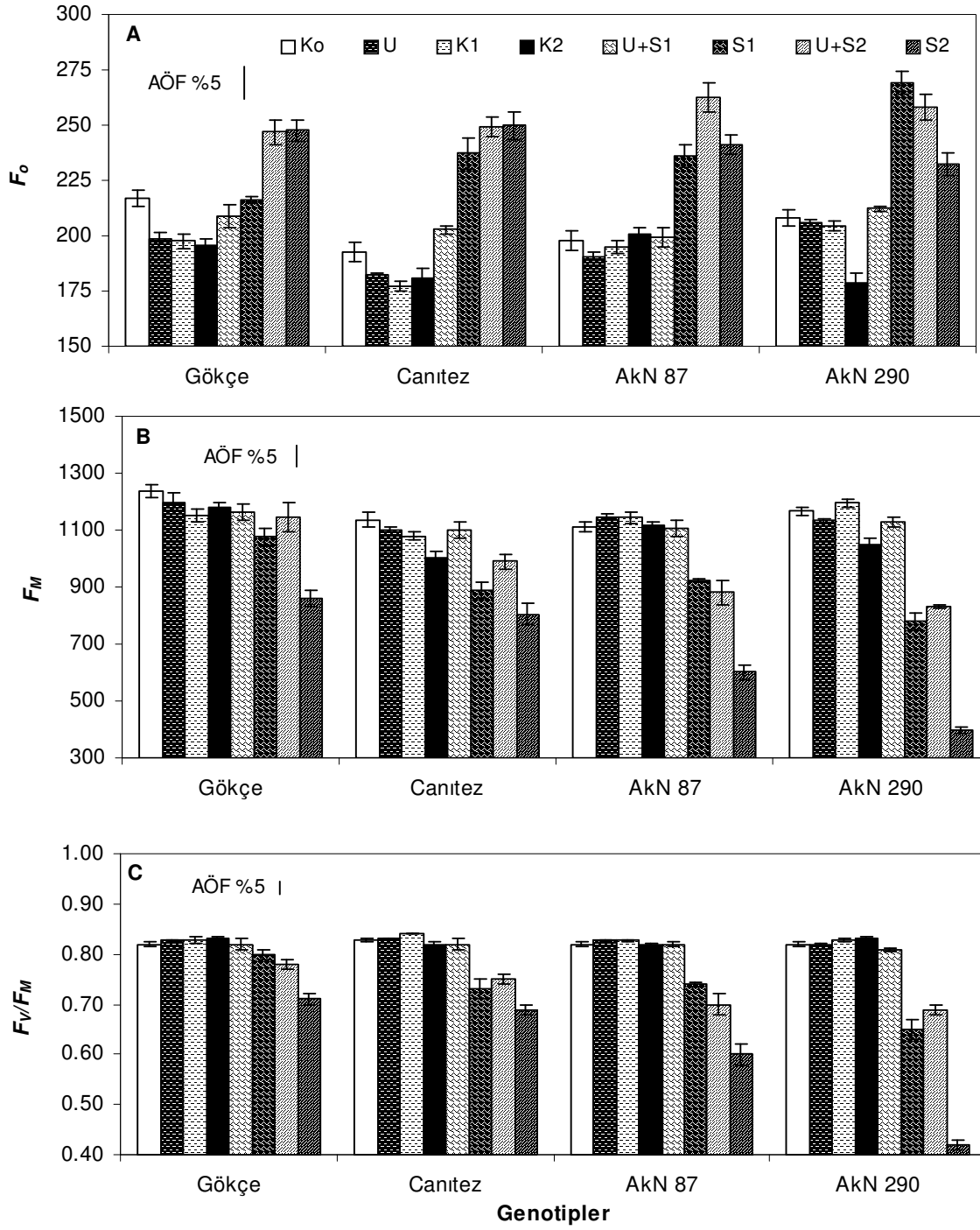
Klorofil *a* floresans ölçümleri 4. yapraklarda ve soğuk uygulamalarının sonunda oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Genotiplere uygulanan soğuk stresi ve bunlara ait kontrol gruplarının yaprakları, 30 dakika karanlığa adapte olduktan sonra bitkilere düşük ışık şiddetinde ($0.2 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ışık uyarımı verilmesi sonucunda, PSII reaksiyon merkezi açılarak elde edilen minimum floresans (F_o) verileri incelenmiştir (Şekil 4.2A). Soğuk uygulamalarının başladığı gündeki ilk kontrol grubu (K_o) ile uyumlanmış bitkilerin kontrol grubu (K_1) ve uyum periyotlu 4°C 'ye maruz bırakılan stres grupları arasında F_o 'da belirlenen değişimler, sadece nohut çeşitlerinde önemli bulunmuştur. Buna karşın, uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C 'ye ve 2°C 'ye maruz bırakılmış gruplarına ait kontrollerin (K_2) F_o verileri, K_1 'e göre incelendiğinde; yalnızca AkN 290 hattındaki azalışın önemli, diğer gruplardaki değişimin ise önemsiz olduğu saptanmıştır. Genotiplerin hiçbirinde uyum grupları (U) ile kontrolleri (K_1) arasında F_o değerlerindeki değişim istatistiksel açıdan önemli değildir. Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık (U+S₁), Gökçe, Canitez ve AkN 290'nın F_o değerlerinde, kontrollerine (K_2) göre, önemli bir artışa neden olmuş ve bu artışın Gökçe'de %6.7, Canitez'de %11.9 ve AkN 290'da ise %18.5 olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, uyum periyotsuz 4°C 'ye maruz bırakılan grupların (S₁) aynı yaştaki kontrollerine (K_2) göre F_o değerlerindeki artışlar tüm genotiplerde önemlidir ve en fazla artış %50.5 ile AkN 290'dadır. Ayrıca, S₁ ve U+S₁ uygulamaları arasındaki F_o 'daki artış Gökçe'de önemsizken, diğer tüm genotiplerde önemli bulunmuştur. Uyumdan sonra 2°C soğuğa (U+S₂) maruz kalan tüm genotiplerin F_o değerleri hem U+S₁'e hem de K_2 'ye göre önemli oranda artmıştır. AkN 87 ve AkN 290'da uyum periyotlu 2°C 'ye maruz bırakılan gruplar (U+S₂) ile uyum periyotsuz doğrudan 2°C 'ye alınan stres grupları (S₂) arasındaki F_o değerlerindeki değişim önemlidir. Ayrıca, uyum periyotsuz doğrudan 2°C 'ye maruz bırakılan gruplar (S₂), uyum periyotsuz 4°C 'ye alınanlar (S₁) ile karşılaştırıldığında, düşük sıcaklığın azalmasına bağlı olarak, çeşitlerdeki F_o değeri artışı ile AkN 290'daki azalış önemli bulunmuştur.

Her bir soğuk uygulaması sonunda, karanlığa adapte olmuş ve PSII reaksiyon merkezi açık olan nohut çeşit ve hatlarının yapraklarındaki maksimum floresans

(F_M) verileri incelendiğinde (Şekil 4.2B); uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrollerinin (K_2) soğuk uygulamalarının başlatıldığı gündeki ilk kontrol gruplarına (K_0) göre F_M değerindeki azalışlar sadece Canitez ve AkN 290'da önemli bulunmuştur. Soğuk uygulamalarının ilk başladığı günde (K_0), genotiplere ait bitkilerin yapraklarındaki F_M değeri ile uyumlanmış bitkilerin kontrol grubu (K_1) arasında zamana bağlı olarak meydana gelen değişim %7 ile sadece Gökçe'de önemli iken diğer genotiplerde istatistiksel olarak önemsizdir. Bunun yanı sıra, hiçbir genotipte uyum grupları (U) ile aynı yaştaki gruplar (K_1) arasında F_M değerlerindeki değişim istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık (U+S₁) F_M değerinde sadece Canitez'de kendi kontrolüne (K_2) göre önemli bir artışa neden olurken; uyumlanmadan doğrudan 4°C'ye maruz bırakılan (S₁) grupların kontrollerine (K_2) göre F_M değerinde meydana gelen azalış tüm genotiplerde önemli bulunmuştur. Bu azalma hatlarda çeşitlere göre daha fazla belirlenmiştir. Benzer cevap S₁ ile U+S₁ grupları arasında da saptanmıştır. Uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan stres gruplarının (U+S₂) kendi kontrollerine (K_2) göre F_M değerlerinde meydana gelen azalış sadece hatlarda önemlidir. Gökçe dışındaki genotiplerde, uyum periyotlu 2°C'ye (U+S₂) ve 4°C'ye (U+S₁) maruz bırakılan gruplar arasında F_M değerlerinde meydana gelen azalışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C düşük sıcaklık derecesine (S₂) maruz kalan tüm genotiplerin F_M değerleri hem K_2 'ye hem de U+S₂'ye göre önemli düzeyde azalmıştır. Ayrıca, uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan grupların (S₂) uyum periyotsuz 4°C'ye alınan gruplara (S₁) göre düşük sıcaklık derecesinin azalmasına bağlı olarak F_M değerlerinde meydana gelen azalışlar tüm genotiplerde önemlidir.

Soğğun, genotiplerin karanlığa adapte edilmiş yapraklarındaki PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliği (F_V/F_M) üzerine etkileri incelendiğinde (Şekil 4.2C); genotiplerin hiçbirinde kontrol gruplarının (K_0 , K_1 ve K_2) F_V/F_M değerleri zamana bağlı olarak önemli bir değişikliğe uğramamıştır. Buna ek olarak, hiçbir genotipte uyum grupları (U) ile kendi kontrolleri (K_1) arasında da F_V/F_M değerlerinde meydana gelen değişiklikler önemli değildir. Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık (U+S₁), bitkilerin F_V/F_M 'lerinde, aynı yaştaki kontrollerine (K_2) göre önemli değişikliğe neden olmazken, uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan grupların



Şekil 4.2. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının karanlığa adapte edilmiş yapraklardaki minimum fluoresans, F_0 (A); maksimum fluoresans, F_M (B); PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliği, F_V/F_M (C) üzerine etkisi

(K_0 =Soğuk uygulamalarının başlatıldığı gündeki kontrol grubu, U=uyumlandırılan gruplar, K_1 =uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları, K_2 =uyum periyotlu veya uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrol grupları, U+S₁=uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres grupları, S₁=uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları, U+S₂=uyum periyotlu 2°C'ye alınan stres grupları, S₂=uyum periyotsuz 2°C'ye maruz bırakılan stres grupları).

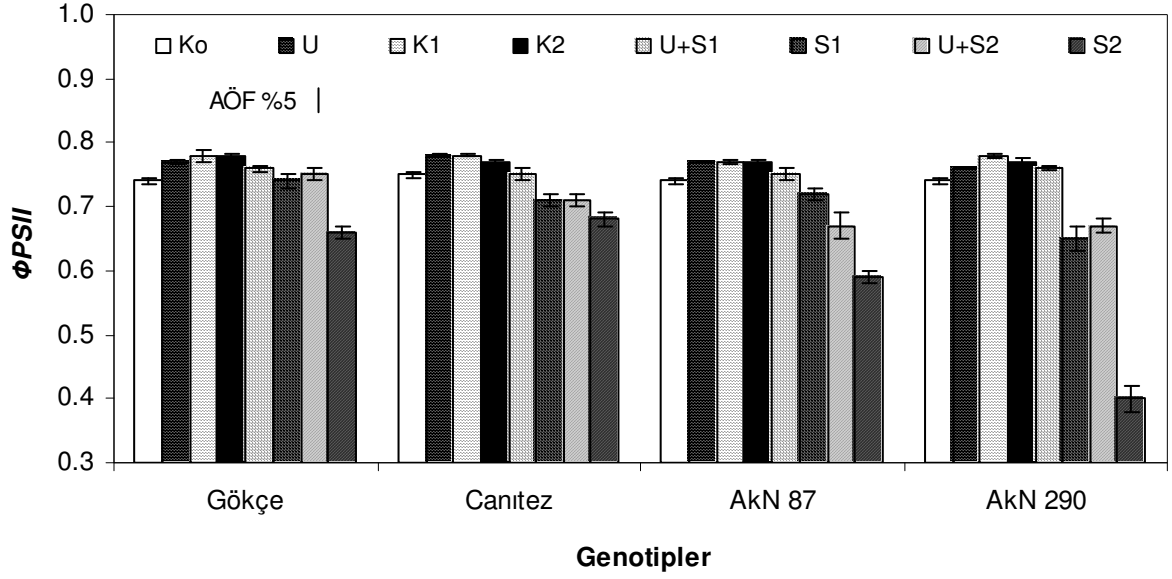
Ortalama F_0 , F_M ve F_V/F_M ile standart hata ve AÖF %5 değerleri EK, Çizelge 3, 4 ve 5'te verilmiştir.

(S₁) F_V/F_M 'leri kendi kontrollerine (K₂) göre tüm genotiplerde önemli derecede azalmıştır. Bu azalma en az Gökçe'de (%3.6), en fazla ise AkN 290'dadır (%21.7). Uyum periyotlu 4°C'ye alınan gruplar (U+S₁) ile uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan gruplar (S₁) arasındaki F_V/F_M azalışı Gökçe'de önemsizken, diğer genotiplerde önemlidir. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C soğuk stresine (S₂) ve uyum periyotlu 2°C (U+S₂)'ye maruz kalan tüm genotiplerin F_V/F_M değerleri hem birbirlerine hem de kendi kontrollerine (K₂) göre önemli oranda azalmıştır. Ayrıca, uyum periyotsuz (S₁ ve S₂) ve uyum periyotlu 4°C ve 2°C sıcaklıklara (U+S₁ ve U+S₂) maruz bırakılan gruplar arasında, sıcaklık derecesinin düşmesine bağlı olarak, tüm genotiplerde F_V/F_M oranı önemli derecede azalmıştır. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan grupların (S₂) uyum periyotsuz 4°C'ye alınan gruplara (S₁) göre soğuk şiddetinin artmasına bağlı olarak F_V/F_M değerlerinde meydana gelen azalışlar tüm genotiplerde önemlidir ve bu azalama çeşitlerde (Gökçe'de %11.3, Canitez'de %5.5) hatlara göre, (AkN 87'de %19 ve AkN 290'da ise %35) daha az düzeydedir.

Işığa adapte edilmiş bitki yapraklarındaki PSII'nin gerçek fotokimyasal etkinliği (Φ_{PSII}) üzerine soğukun etkisi incelendiğinde (Şekil 4.3); hiçbir genotipin, kontrol gruplarına (K₀, K₁ ve K₂) ait Φ_{PSII} değerlerinin zamana bağlı olarak önemli bir değişikliğe uğramadığı gibi, uyum grupları (U) ile aynı yaştaki kontrol grupları (K₁) arasındaki Φ_{PSII} değerlerinde meydana gelen değişikliklerin de önemli düzeyde olmadığı saptanmıştır.

Uyum periyotlu 4°C'ye (U+S₁) maruz bırakılan tüm gruplar aynı yaştaki kontrollerine (K₂) göre Φ_{PSII} 'de önemli bir azalma göstermezken; uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres gruplarının (S₁ Φ_{PSII} değerleri) K₂'ye göre Gökçe dışındaki diğer tüm genotiplerde önemli azalma göstermiştir. Bu azalma en fazla AKN 290 genotipinde belirlenmiştir. Canitez ve AkN 290'da uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres gruplarının (S₁) uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres gruplarına (U+S₁) göre Φ_{PSII} değerlerindeki azalışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bunun yanı sıra, uyumdan sonra 2°C soğuk stresine (U+S₂) maruz kalan Gökçe dışındaki diğer tüm genotiplerin Φ_{PSII} değerleri, hem U+S₁'e hem de

K_2 'ye göre önemli düzeyde azalmıştır. Uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan gruplar ($U+S_2$) ile uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye alınan gruplar (S_2) arasındaki



Şekil 4.3. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının ışığa adapte edilmiş yapraklardaki PSII'nin gerçek fotokimyasal etkinliği, $\Phi PSII$ üzerine etkisi

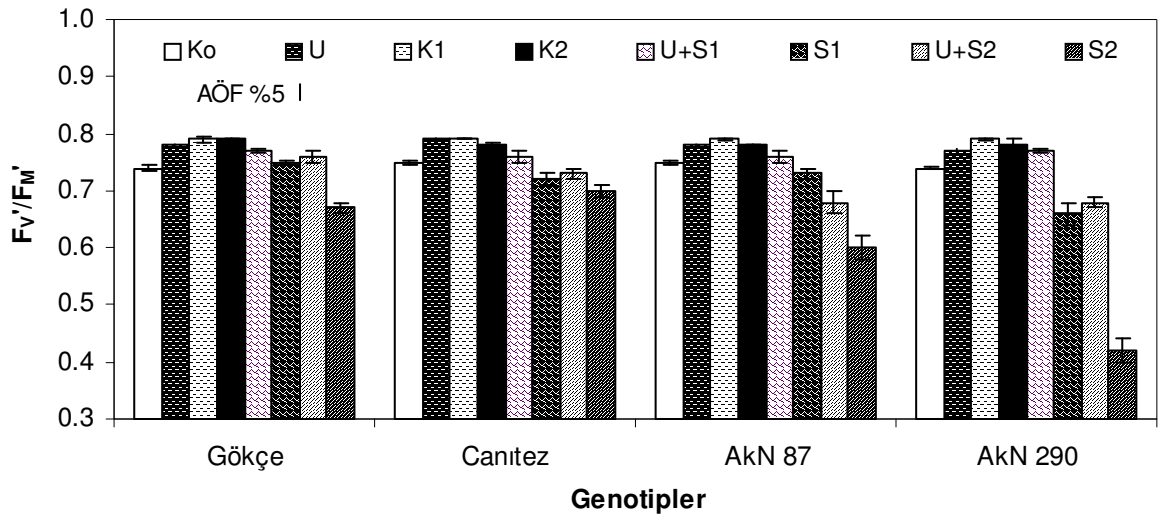
(K_0 =Soğuk uygulamalarının başlatıldığı gündeki kontrol grubu, U=uyumlandırılan gruplar, K_1 =uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları, K_2 =uyum periyotlu veya uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrol grupları, $U+S_1$ =uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres grupları, S_1 =uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları, $U+S_2$ =uyum periyotlu 2°C'ye alınan stres grupları, S_2 =uyum periyotsuz 2°C'ye maruz bırakılan stres grupları).

Ortalama $\Phi PSII$ ile standart hata ve AÖF %5 değerleri EK, Çizelge 6'da verilmiştir.

$\Phi PSII$ azalışı, Canitez çeşidi dışındaki tüm genotiplerde önemlidir ve bu önemli azalma Gökçe'de %12, AkN 87'de %11.9 ve AkN 290'da %40.3 düzeyindedir. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan tüm genotiplerin (S_2) $\Phi PSII$ değerleri, aynı yaştaki kontrol gruplarına (K_2) göre önemli düzeyde azalmıştır. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan grupların (S_2) uyum periyotsuz 4°C'ye alınan gruplara (S_1) göre düşük sıcaklık derecesinin azalmasına bağlı olarak $\Phi PSII$ değerlerindeki azalma Canitez'de önemsiz bulunurken, bu etki, diğer genotiplerde önemli bulunmuştur (Gökçe'de %10.8, AkN 87'de %18.1 ve AkN 290'da ise %38.5).

Soğuk uygulamalarının ışığa adapte edilmiş bitki yapraklarındaki PSII'nin enerji yakalama etkinliği (F_V'/F_M) parametresi üzerine etkisi incelendiğinde (Şekil 4.4); bütün genotiplerde,uyumlanmış bitkilerin kontrol gruplarının (K_1) ve uyum periyotlu

veya uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış gruplarının kontrollerinin (K_2) ilk kontrol grubu olan K_0 'a göre F_V'/F_M' değerindeki zamana bağlı artış önemliken; K_2 'nin ve uyum gruplarının (U) K_1 'e göre F_V'/F_M' değerlerindeki değişimler istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Uyum periyotlu 4°C'ye ($U+S_1$) maruz bırakılan bitkilerin F_V'/F_M' 'değeri aynı yaştaki kontrollerine (K_2) göre hiçbir genotipte önemli bir değişikliğe uğramazken, uyum periyotsuz 4°C'ye alınan gruplarda (S_1) F_V'/F_M' değerinin tüm genotiplerde önemli düzeyde azaldığı saptanmıştır. Ayrıca, Gökçe dışındaki genotiplerde, uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan grupların (S_1) uyum periyotlu 4°C'ye alınan gruplara ($U+S_1$) göre F_V'/F_M' değerlerindeki azalışlar istatistiksel olarak önemlidir ve en fazla azalma %14.3 ile AkN 290'dadır. Buna karşın, uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan gruplar ($U+S_2$) ve uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye alınan gruplar (S_2) arasındaki F_V'/F_M' azalması tüm genotiplerde hem birbirlerine hem de kontrollerine (K_2) göre önemlidir. Uyum periyotlu uygulanan 4°C ($U+S_1$) ve 2°C ($U+S_2$) sıcaklıklar, Gökçe dışındaki tüm genotiplerin F_V'/F_M' değerinde önemli azalmaya neden olmuştur.



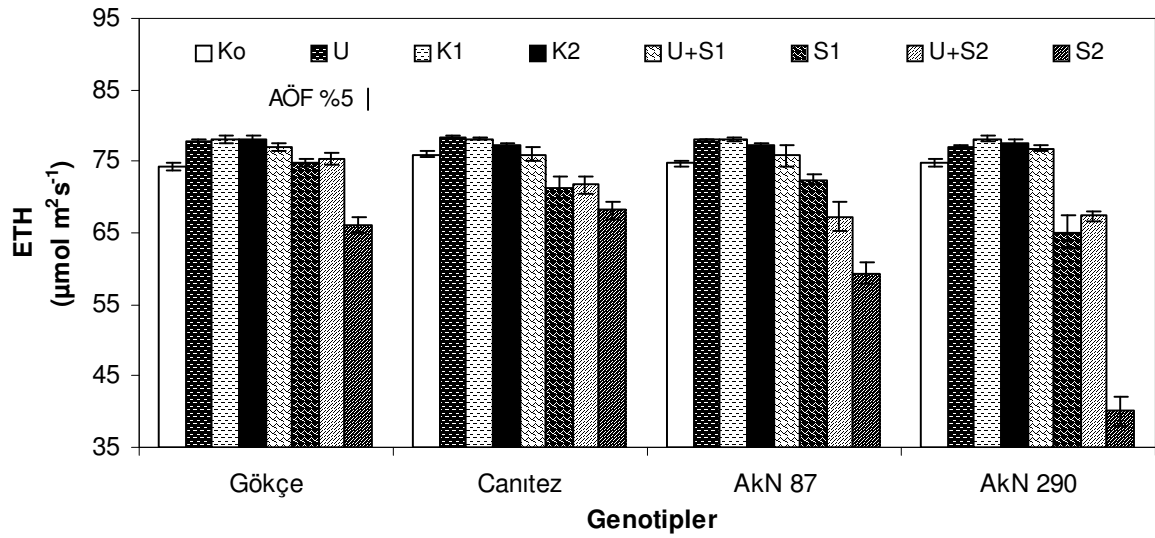
Şekil 4.4. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının ışığa adapte edilmiş yapraklardaki PSII'nin enerji yakalama etkinliği (F_V'/F_M') üzerine etkisi

(K_0 =Soğuk uygulamalarının başlatıldığı gündeki kontrol grubu, U=uyumlandırılan gruplar, K_1 =uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları, K_2 =uyum periyotlu veya uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrol grupları, $U+S_1$ =uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres grupları, S_1 =uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları, $U+S_2$ =uyum periyotlu 2°C'ye alınan stres grupları, S_2 =uyum periyotsuz 2°C'ye maruz bırakılan stres grupları).

Ortalama F_V'/F_M' ile standart hata ve AÖF %5 değerleri EK, Çizelge 7'de verilmiştir.

Uyum periyotsuz doğrudan 4°C (S₁) ve 2°C'ye (S₂) maruz bırakılan gruplar arasında, soğuk şiddetinin artmasına bağlı olarak oluşan F_V/F_M' değerindeki azalma, Canitez'de önemsiz ancak diğer genotiplerde önemli bulunmuştur.

Soğuk uygulamalarının yapraklardaki elektron taşıma hızı (ETH) üzerine etkisi incelendiğinde (Şekil 4.5); uyumlanmış bitkilerin kontrol gruplarının (K₁) ETH değerleri, ilk kontrol gruplarına (K₀) göre Canitez hariç diğer tüm genotiplerde önemli düzeyde artmış; ancak uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrollerinin (K₂) ETH'sinde, K₁'e göre zamana bağlı olarak gerçekleşen değişim hiçbir genotipte önemli bulunmamıştır. Aynı zamanda, uyum grupları (U) ile aynı yaştaki kontrolleri (K₁) arasındaki ETH değişimi de genotiplerin hiçbirinde önemli değildir.



Şekil 4.5. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının ışığa adapte edilmiş yapraklardaki elektron taşıma hızı (ETH) üzerine etkisi

K₀=Soğuk uygulamalarının başlatıldığı gündeki kontrol grubu, U=uyumlandırılan gruplar, K₁=uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları, K₂=uyum periyotlu veya uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrol grupları, U+S₁=uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres grupları, S₁=uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları, U+S₂=uyum periyotlu 2°C'ye alınan stres grupları, S₂=uyum periyotsuz 2°C'ye maruz bırakılan stres grupları).

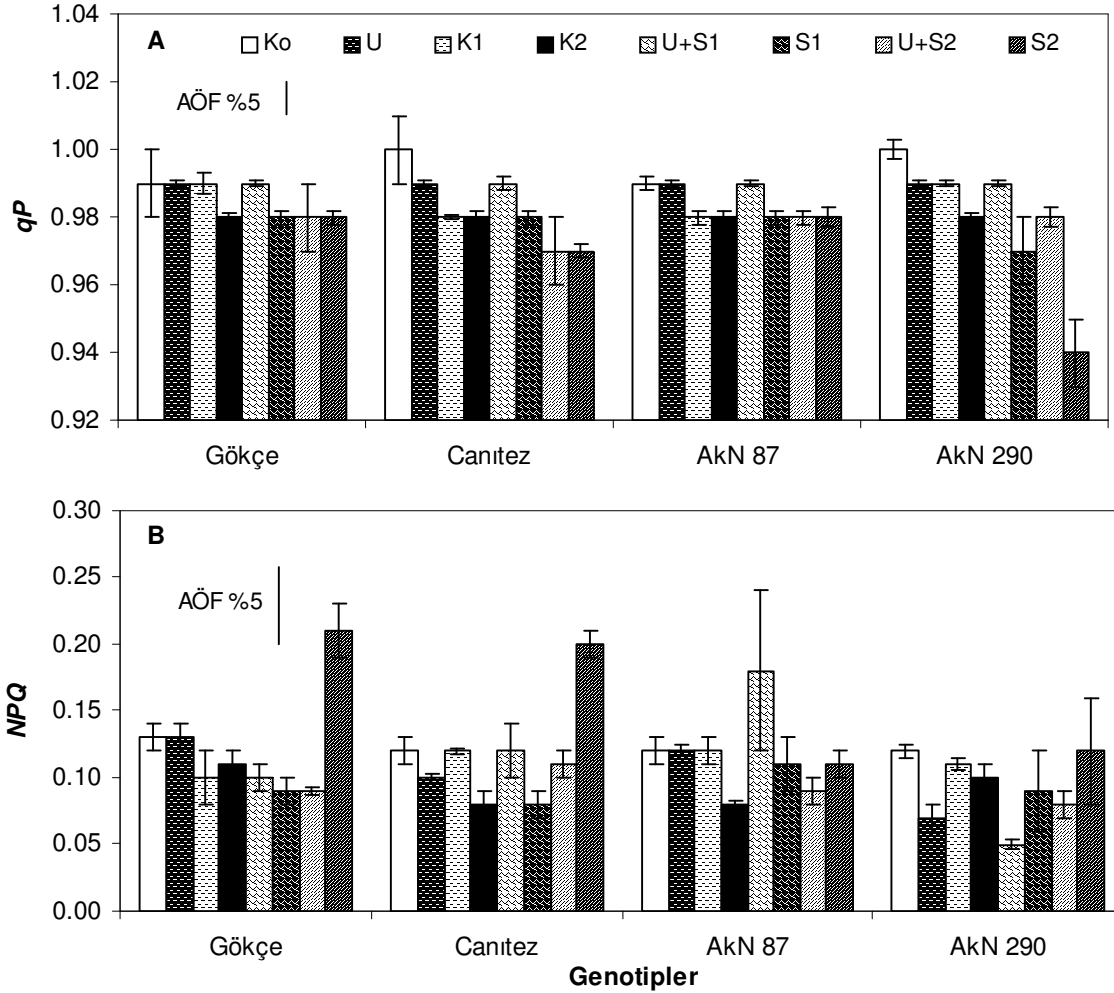
Ortalama ETH ile standart hata ve AÖF %5 değerleri EK, Çizelge 8'de verilmiştir.

Uyum periyotlu 4°C'ye (U+S₁) maruz bırakılan bitkilerin ETH'si kontrollerine (K₂) göre, hiçbir genotipte önemli bir değişikliğe uğramazken, uyum periyotsuz 4°C'ye alınan gruplarda (S₁) ETH, tüm genotiplerde aynı yaştaki kontrollerine (K₂) göre,

önemli derecede azalmıştır. Bunun yanı sıra, Gökçe haricindeki diğer tüm genotiplerde uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres gruplarının (S_1) ETH'sinde, uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres gruplarının ($U+S_1$) ETH'sine göre istatistiksel olarak önemli azalışlar meydana gelmiş ve en büyük azalışın %15.2 ile AkN 290'da gerçekleştiği belirlenmiştir. Uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan stres grupları ($U+S_2$) ile aynı yaştaki kontrolleri (K_2) ve uyum periyotlu uygulanan 4°C ($U+S_1$) ve 2°C ($U+S_2$) düşük sıcaklıklardaki ETH'de önemli azalma birbirlerine göre, Gökçe dışındaki tüm genotiplerde önemli bulunmuştur. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye alınan grupların (S_2) kontrollerine (K_2) göre ETH'leri tüm genotiplerde düşük sıcaklığa bağlı olarak önemli azalma göstermiştir ve en fazla azalma AkN 290'da (%48.3) görülürken en az azalmanın Canitez'de (%11.8) olduğu belirlenmiştir. Uyum periyotsuz doğrudan 4°C (S_1) ve 2°C'ye (S_2) maruz bırakılan gruplar arasında belirlenen ETH azalışı soğuk derecesinin azalmasına bağlı olarak tüm genotiplerde önemli bulunmuştur. Bu azalma Gökçe'de %11.8, Canitez'de %4.4, AkN 87'de %18 ve AkN 290'da ise %38.4'tür.

Soğuk ile uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları (K_1), uygulamanın başlatıldığı gündeki kontrol grupları (K_0) ile karşılaştırıldığında, Gökçe hariç diğer tüm genotiplerin yapraklarındaki ışık enerjisinin fotokimyasal kullanımının (qP) önemli düzeyde azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.6A). Uyum periyotlu veya uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış grupların aynı yaştaki kontrollerinin (K_2) K_1 'e göre qP 'sindeki zamana bağlı değişim ise sadece Gökçe ve AkN 290'da önemli bulunmuştur. Uyum periyotlu 4°C'ye alınan gruplar ($U+S_1$) ile aynı yaştaki kontrolleri (K_2) arasındaki qP değişimi incelendiğinde; $U+S_1$ gruplarında tüm genotiplerde önemli artış meydana gelmiştir. Buna karşın, uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres gruplarının (S_1) kontrollerine (K_2) göre qP değerlerindeki değişimi ise sadece AkN 290'da önemli bulunmuştur. Genotiplerin tümünde, uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık grupları ($U+S_1$) ile uyum periyotsuz 4°C'ye alınan gruplar (S_1) arasında belirlenen qP değerindeki azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Uyum periyotlu 2°C'ye alınan grupların ($U+S_2$) aynı yaştaki kontrol gruplarına (K_2) göre qP değerinde strese bağlı meydana gelen azalma, sadece Canitez'de istatistiksel olarak önemlidir. Uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan ($U+S_2$) grupların uyum periyotlu 4°C'ye alınan ($U+S_1$) gruplara göre sıcaklık azalmasına bağlı olarak qP değerinde tüm genotiplerde önemli bir azalma

meydana gelmiştir. Bunun yanı sıra, uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye alınan grupların (S_2) hem kontrollerine (K_2) hem de uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan gruplara (S_1) göre, qP değerindeki azalma Canitez ve AkN 290'da önemlidir.



Şekil 4.6. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının yapraklarındaki fotokimyasal qP (A) ve fotokimyasal olmayan kullanım, NPQ (B) üzerine etkisi

(K_0 =Soğuk uygulamalarının başlatıldığı gündeki kontrol grubu, U =uyumlandırılan gruplar, K_1 =uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları, K_2 =uyum periyotlu veya uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrol grupları, $U+S_1$ =uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres grupları, S_1 =uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları, $U+S_2$ =uyum periyotlu 2°C'ye alınan stres grupları, S_2 =uyum periyotsuz 2°C'ye maruz bırakılan stres grupları).

Ortalama qP ve NPQ ile standart hata ve AÖF %5 değerleri EK, Çizelge 9 ve 10'da verilmiştir.

Soğuk uygulamalarının genotiplerin yapraklarındaki ışık enerjisinin fotokimyasal olmayan kullanımı (NPQ) üzerine etkisi incelendiğinde (Şekil 4.6B); hiçbir

genotipin kontrol gruplarının (K_0 , K_1 ve K_2) *NPQ* değerleri, zamana bağlı olarak önemli bir değişikliğe uğramamıştır. Ayrıca, hiçbir genotipte uyum grupları (U) ile kendi kontrolleri (K_1) arasında *NPQ* değerlerinde meydana gelen değişiklikler önemli değildir. Gökçe ve Canitez'de uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye alınan grupların (S_2) *NPQ* değerleri tüm kontrol ve soğuk uygulama gruplarına göre önemli derecede artmıştır, bu genotiplerde diğer soğuk uygulama gruplarının birbirlerine ve kontrol gruplarına göre *NPQ* değerlerinde önemli değişiklik olmamıştır. Buna karşın, hatların soğuk uygulama gruplarının hiçbirinde *NPQ* değerlerinde kontrol gruplarına ya da diğer soğuk uygulama gruplarına göre, önemli değişiklik meydana gelmemiştir. AkN 87'de sadece uyum periyotlu 4°C'ye alınan soğuk uygulama gruplarının ($U+S_1$) tüm kontrol ve uygulama gruplarına göre önemli oranda arttığı belirlenmiştir.

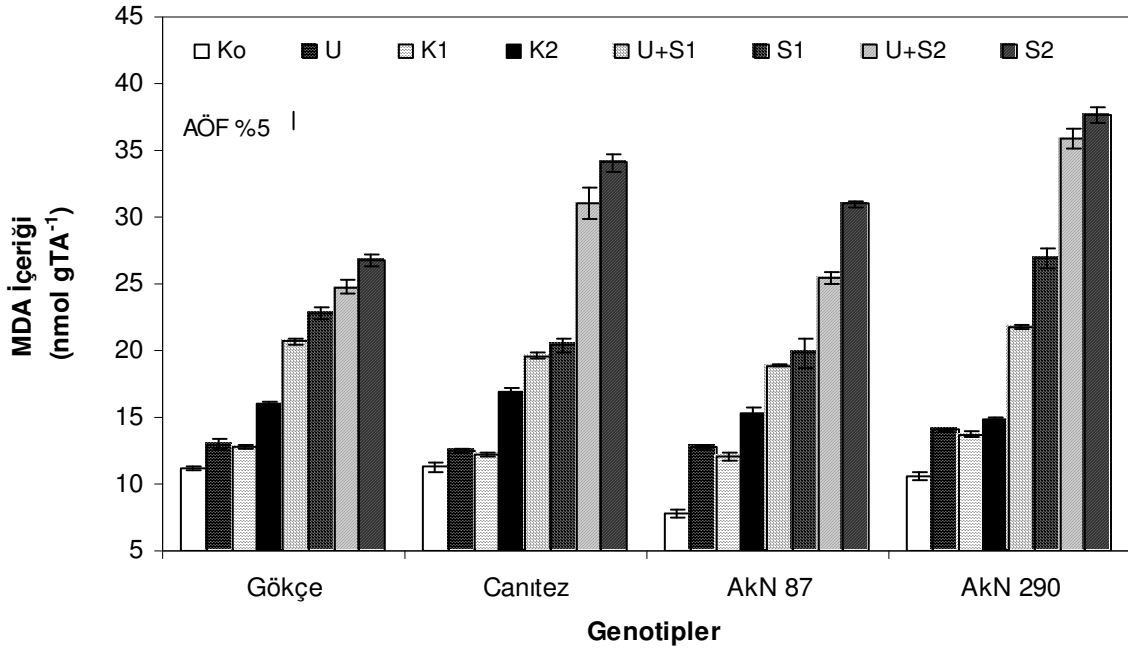
4.2. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkisi

4.2.1. Yaprak dokularındaki MDA içeriği üzerine etkisi

Stresin ilk başladığı günde hasat edilen kontrol grupları (K_0) ile uyum periyotlu ve uyum periyotsuz iki farklı sıcaklık (+4°C ve +2°C) uygulamasının kontrolleri (K_1 ve K_2)'nin MDA içerikleri karşılaştırıldığında (şekil 4.7); tüm genotiplerin MDA içeriğinde zamana bağlı olarak meydana gelen artış, önemli bulunmuştur. Bunun yanı sıra, uyum (K_1) ve uyum periyotlu ve uyum periyotsuz stres gruplarının kontrolleri (K_2) arasında saptanan MDA içeriklerindeki değişim ise sadece AkN 290 genotipinde önemli bulunmamıştır.

12 günlük bitkilere uygulanan farklı düşük sıcaklık uygulamalarının genotiplerin yaprak dokularındaki MDA içeriği üzerine etkisi incelendiğinde; her iki sıcaklık derecesine ait soğuk uyumu (U) genotiplerin hiç birinde kendi kontrolüne (K_1) göre MDA düzeyinde istatistiki olarak önemli bir artışa neden olmamıştır. Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık ($U+S_1$), tüm genotiplerde kendi kontrollerine (K_2) göre MDA içeriğinde önemli bir artışa neden olmuştur ve en fazla artış AkN 290'da belirlenmiştir. Uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres grupları ($U+S_1$) ile uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları (S_1) arasındaki MDA miktarındaki artış, Gökçe ve AkN 290'de önemli, Canitez ve AkN 87'de ise istatistiksel olarak

önemsiz bulunmuştur. Uyumdan sonra 2°C soğuk stresine (U+S₂) maruz kalan tüm genotiplerin MDA içeriği hem U+S₁'e hem de K₂'ye göre önemli düzeyde artmıştır. Ayrıca, tüm genotiplerde, uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan stres grupları (U+S₂) ile uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye alınan stres grupları (S₂) arasındaki MDA içeriği artışı önemli olup, en fazla artışın AkN 87'de (%21.6) ve en az artışın ise AkN 290 (%4.9)'da olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, uyum periyotsuz doğrudan uygulanan 2°C düşük sıcaklık uygulaması, 4°C uygulamasına (S₁) göre tüm genotiplerin MDA içeriğini önemli düzeyde arttırmıştır.



Şekil 4.7. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının yaprak dokularındaki MDA içeriği üzerine etkisi

(K₀=soğuk uygulamalarının başlatıldığı gündeki kontrol grubu, U=uyumlandırılan gruplar, K₁=uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları, K₂=uyum periyotlu veya uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrol grupları, U+S₁=uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres grupları, S₁=uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları, U+S₂=uyum periyotlu 2°C'ye alınan stres grupları, S₂=uyum periyotsuz 2°C'ye maruz bırakılan stres grupları).

Ortalama MDA ile standart hata ve AÖF %5 değerleri EK, Çizelge 11'de verilmiştir.

4.2.2. Yapraklardaki pigment içeriği üzerine etkisi

Soğuk uygulamalarının yapraklarda fotosentetik pigmentlerden klorofil a miktarı üzerine etkisi incelendiğinde (Çizelge 4.2); ilk kontrol grubu (K₀) ile uyumlanmış bitkilerin kontrol grubu (K₁) arasında zamana bağlı olarak meydana gelen değişim

sadece Canitez'de önemli bulunmuştur. Bunun yanı sıra, AkN 87 dışındaki tüm genotiplerde uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının aynı yaştaki kontrollerinin (K_2) K_0 'e göre klorofil *a* miktarındaki zamana bağlı azalış istatistiksel olarak önemlidir. Uyumlandırma (U) sadece AkN 290'da kendi kontrolüne (K_1) göre klorofil *a* miktarında önemli bir azalışa neden olurken, diğer genotiplerde klorofil *a* miktarında meydana gelen azalma önemli değildir. Gökçe ve AkN 290 genotiplerinde uyum periyotlu 4°C'ye ($U+S_1$) maruz bırakılma aynı yaştaki kontrollerine göre klorofil *a* miktarında sırasıyla %24.3 ve %25.9 önemli azalmaya neden olurken, Canitez ve AkN 87'de meydana gelen azalma istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres gruplarının (S_1) aynı yaştaki kontrollerine (K_2) göre klorofil *a* miktarındaki azalma hiçbir genotipte önemli bulunmamıştır. Ancak, genotiplerin hiçbirinde, uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık ($U+S_1$) ile uyum periyotsuz 4°C'ye alınan (S_1) gruplar arasında klorofil *a* miktarında istatistiksel olarak önemli değişim meydana gelmemiştir. Uyum periyotlu 2°C'ye alınan grupların ($U+S_2$) kontrol gruplarına (K_2) göre klorofil *a* miktarında strese bağlı meydana gelen azalma yalnızca Gökçe (%41.4) ve AkN 290'da (%25.9) önemlidir. Uyum periyotlu uygulanan 4°C ($U+S_1$) ve 2°C ($U+S_2$) sıcaklıklar klorofil *a* miktarında hiçbir genotipte önemli azalmaya neden olmamıştır. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye alınan grupların (S_2) kendi kontrollerine (K_2) göre klorofil *a* miktarları tüm genotiplerde düşük sıcaklığa bağlı olarak önemli azalma göstermiştir ve bu azalmalar Gökçe'de %34, Canitez'de %34.9, AkN 87'de %27.7 ve AkN 290'da ise %40.8'dir. Uyum periyotsuz doğrudan 4°C (S_1) ve 2°C'ye (S_2) maruz bırakılan gruplar arasındaki soğuk şiddetinin artmasına bağlı klorofil *a* miktarı azalışları sadece Canitez'de önemlidir (%29.5).

Soğuk uygulamalarının klorofil *b* içeriği üzerine etkisi incelendiğinde (Çizelge 4.2); hem 12 günlük kontrol grubu (K_0) ile 19 günlük uyumlanmış bitkilerin kontrol grubu (K_1) hem de K_1 ile uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış 31 günlük stres gruplarının kontrolleri (K_2) arasında sadece Canitez'de zamana bağlı olarak klorofil *b* içeriğinde önemli bir azalış meydana gelmiştir. Uyumlandırma (U) aynı yaştaki kontrolüne (K_1) göre sadece AkN 290'ın klorofil *b* içeriğinde önemli bir azalışa (%40.7) neden olmuştur. Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık ($U+S_1$) Gökçe ve AkN 290'ın klorofil *b* içeriğinde kontrollerine (K_2)

göre önemli bir azalışa neden olmuştur ve bu azalış Gökçe'de %36.8, AkN 290'da ise %31.8'dir. Uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres gruplarının (S_1) aynı yaştaki kontrollerine (K_2) göre klorofil *b* içeriğindeki azalma ise sadece Gökçe'de önemli bulunmuştur. Canitez ve AkN 87'de ise hem $U+S_1$ hem de S_1 gruplarının klorofil *b* içeriğindeki azalış K_2 'ye göre istatistiksel açıdan önemli değildir. Uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres grupları ($U+S_1$) ile uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları (S_1) arasındaki klorofil *b* içeriği değişimi incelendiğinde; genotiplerin hiçbirinde önemli değişim meydana gelmemiştir. Hem uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan ($U+S_2$) hem de uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye alınan (S_2) stres gruplarının kontrollerine (K_2) göre klorofil *b* içeriğindeki azalış tüm genotiplerde önemliyken; $U+S_2$ ile S_2 grupları arasındaki klorofil *b* içeriği değişimi genotiplerin hiçbirinde önemli bulunmamıştır. Buna ilaveten, uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan ($U+S_2$) grupların uyum periyotlu 4°C'ye alınan ($U+S_1$) gruplara göre, sıcaklık azalmasına bağlı klorofil *b* içeriğindeki azalma hiçbir genotipte önemli bulunmamıştır. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan (S_2) genotiplerden sadece Canitez'de uyum periyotsuz 4°C'ye alınanlara (S_1) göre, sıcaklığa bağlı olarak önemli klorofil *b* (%34.3) kaybı tespit edilmiştir.

Genotiplerin yaprak dokularındaki toplam klorofil (klorofil $a+b$) içeriği üzerine soğuk uygulamalarının etkisi karşılaştırıldığında (Çizelge 4.2); uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları (K_1) ile ilk kontrol (K_0) grupları arasında meydana gelen azalış sadece Canitez'de önemliyken, uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrollerinin (K_2) ilk kontrol (K_0) gruplarına göre toplam klorofil içeriğindeki azalış Gökçe, Canitez ve AkN 290'da önemli olup, bu azalma derecesi sırasıyla %19.7, %37.2 ve %18.8'dir. Soğuk uyum periyotlu bitkilerden (U) sadece AkN 290'nun toplam klorofil içeriğinde aynı yaştaki kontrollerine (K_1) göre %39.7 önemli azalış meydana gelmiştir. Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklığın ($U+S_1$) aynı yaştaki kontrolü (K_2) ile karşılaştırıldığında, Gökçe ve AkN 290'nun toplam klorofil içeriğinde önemli bir azalışa neden olduğu saptanmıştır. Uyumlanmadan doğrudan 4°C'ye maruz bırakılan (S_1) grupların kontrollerine (K_2) göre, toplam klorofil miktarında meydana gelen kayıp ise sadece Gökçe'de önemlidir. Ancak, genotiplerin hiçbirinde uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres gruplarının (S_1) uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres gruplarına ($U+S_1$) göre, toplam klorofil içeriğindeki değişimler istatistiksel olarak önemli

bulunmamıştır. Uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan stres gruplarının (U+S₂) kontrollerine (K₂) göre toplam klorofil içeriğinde belirlenen azalma, Gökçe, AkN 87 ve AkN 290'da önemlidir ve sırasıyla %43.5, %22.8 ve %29'dur. Hiçbir genotipte, uyum periyotlu 2°C'ye (U+S₂) ve 4°C'ye (U+S₁) maruz bırakılan gruplar arasındaki toplam klorofil miktarı azalması önemli değildir. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C soğuk stresine (S₂) maruz kalan tüm genotiplerin toplam klorofil içerikleri K₂'ye göre önemli oranda azalmıştır, bu azalışlar Gökçe ve Canitez'de %36.9, AkN 87'de %28.8 ve AkN 290'da ise %41.9 düzeyindedir. Uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan gruplar (U+S₂) ile uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye alınan (S₂) gruplar arasındaki toplam klorofil miktarındaki değişimler tüm genotiplerde önemsizdir. Soğuk derecesinin azalmasına bağlı olarak, uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan grupların (S₂), uyum periyotsuz 4°C'ye alınan gruplara (S₁) göre, toplam klorofil içeriğindeki azalma sadece Canitez (%30.7) ve AkN 290'da (%29.6) önemli bulunmuştur.

Hiçbir genotipin kontrol gruplarında (K₀, K₁ ve K₂) zamana bağlı olarak gerçekleşen karotenoid içeriği artışı önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.2). Ayrıca, hiçbir genotipte, uyum grupları (U) ile aynı yaştaki kontrolleri (K₁) arasındaki karotenoid içeriğinde meydana gelen artışların da önemli olmadığı saptanmıştır. Tüm genotiplerde, soğuk uyumundan sonra 4°C'ye alınan gruplar (U+S₁) ile uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları (S₁)'nın hem kendi kontrollerine (K₂) hem de birbirlerine göre karotenoid içeriğindeki artışların önemsiz olduğu belirlenmiştir. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C soğuk stresine (S₂) maruz kalan genotiplerden sadece Canitez ve AkN 87'de karotenoid içeriği K₂'ye göre önemli düzeyde artmıştır, Buna karşın, uyum periyotlu 2°C'ye (U+S₂) ve 4°C'ye (U+S₁) ya da uyum periyotsuz 2°C'ye (S₂) ve 4°C'ye (S₁) maruz kalan gruplar arasındaki karotenoid içeriğindeki artış ise hiçbir genotipte önemli bulunmamıştır.

Soğuk uygulamalarının, genotiplerin yaprak dokularındaki antosiyanin içeriği üzerine etkisi incelendiğinde (Çizelge 4.2); uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları (K₁) ile ilk kontrol (K₀) grupları arasında meydana gelen artış, tüm genotiplerde önemsizken, uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış grupların kontrollerinin (K₂) ilk kontrol (K₀) gruplarına göre zaman bağlı olarak antosiyanin içeriğindeki artış AkN 87 ve AkN 290'da önemlidir. Uyum grupları (U) ile kontrolleri (K₁) arasındaki antosiyanin içeriği artışı genotiplerin hiçbirinde önemli

bulunmamıştır. Soğuk uyumundan sonra uygulanan 4°C sıcaklık (U+S₁) tüm genotiplerde kontrollerine (K₂) göre önemli düzeyde antosiyanin birikimine neden olmuştur ve bu artış Gökçe'de %18.7, Canitez'de %33.3, AkN 87'de %11.9 ve AkN 290'da %12.8 düzeyindedir. Uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres gruplarının (S₁) kontrollerine (K₂) göre, antosiyanin birikimi ise sadece Canitez ve AkN 87'de önemli bulunmuştur. Uyumdan sonra 4°C'ye alınan gruplar (U+S₁) ile uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları (S₁) arasındaki antosiyanin içeriği değişimi ise sadece Gökçe'de önemli bulunmuştur. Uyumdan sonra 2°C (U+S₂)'ye maruz kalan tüm genotiplerin antosiyanin içeriği hem U+S₁'e hem de K₂'ye göre önemli oranda artmıştır. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan grupların (S₂) aynı yaştaki kontrollerine (K₂) göre antosiyanin içeriğindeki artma, tüm genotiplerde önemli iken, U+S₂'ye göre antosiyanin miktarındaki azalma birbirlerine göre Canitez, AkN 87 ve AkN 290'da önemlidir. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan grupların (S₂) uyum periyotsuz 4°C'ye alınan gruplara (S₁) göre düşük sıcaklık şiddetinin artmasına bağlı olarak antosiyanin birikimi sadece AkN 87'de önemsizdir, diğer genotiplerdeki artışlar ise önemli olup, Gökçe ve AkN 290'da %24 ve Canitez'de %12.1 düzeyindedir.

Genotiplerin flavonoid içeriği üzerine soğğun etkisi incelendiğinde (Çizelge 4.2); tüm genotiplerin kontrol gruplarının (K₀, K₁ ve K₂) flavonoid içeriği zamana bağlı olarak artmıştır. Ayrıca, tüm genotiplerde uyum grupları (U) ile aynı yaştaki kontrolleri (K₁) arasında flavonoid içeriğinde artışlar meydana gelmiştir. Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık (U+S₁) tüm genotiplerde kontrollerine (K₂) göre flavonoid içeriğinde artışa neden olmuştur ve bu artış en fazla Gökçe'de (%83) ve en az AkN 290'dadır (%61).

Bunun yanı sıra, uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres gruplarının (S₁) flavonoid içeriği kendi kontrollerine (K₂) göre tüm genotiplerde artmıştır. Tüm genotiplerin flavonoid içeriği, S₁ ve U+S₁ uygulamalarında azalmış, bu azalmanın en çok Canitez çeşidinde (%40) olduğu saptanmıştır. Uyumdan sonra 2°C (U+S₂)'ye maruz kalan tüm genotiplerin flavonoid içerikleri aynı yaştaki kontrollerine (K₂) göre artmıştır.

Çizelge 4.2. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının pigment içeriği üzerine etkisi

Genotipler	Uygulamalar	Klorofil a (mg ml ⁻¹ TA ⁻¹)	Klorofil b (mg ml ⁻¹ TA ⁻¹)	Klorofil a+b (mg ml ⁻¹ TA ⁻¹)	Karotenoid (mg ml ⁻¹ TA ⁻¹)	Antosiyanin (mg ml ⁻¹ TA ⁻¹)	Flavonoid (%)
Gökçe	K ₀	2.208±0.272	0.774±0.078	2.982±0.347	0.509±0.013	0.0047±0.0001	100.00
	U	1.749±0.069	0.601±0.041	2.350±0.105	0.520±0.008	0.0049±0.0001	206.14
	K ₁	1.918±0.107	0.634±0.026	2.552±0.132	0.512±0.020	0.0048±0.0001	171.98
	K ₂	1.713±0.125	0.683±0.062	2.396±0.158	0.542±0.017	0.0048±0.0001	177.43
	U+S ₁	1.297±0.093	0.432±0.043	1.729±0.134	0.556±0.019	0.0057±0.0001	325.02
	S ₁	1.375±0.093	0.496±0.034	1.871±0.120	0.572±0.011	0.0050±0.0001	213.10
	U+S ₂	1.004±0.063	0.352±0.008	1.355±0.067	0.563±0.026	0.0065±0.0001	401.57
	S ₂	1.131±0.120	0.383±0.043	1.513±0.161	0.586±0.013	0.0062±0.0001	313.60
Canitez	K ₀	2.223±0.119	0.980±0.181	3.202±0.236	0.513±0.019	0.0024±0.0001	100.00
	U	1.742±0.076	0.580±0.045	2.322±0.117	0.519±0.007	0.0026±0.0001	155.33
	K ₁	1.863±0.070	0.682±0.048	2.546±0.101	0.515±0.021	0.0025±0.0001	100.43
	K ₂	1.481±0.035	0.532±0.026	2.012±0.058	0.544±0.019	0.0027±0.0001	131.41
	U+S ₁	1.397±0.097	0.502±0.040	1.899±0.130	0.559±0.014	0.0036±0.0001	223.70
	S ₁	1.367±0.105	0.466±0.021	1.833±0.122	0.577±0.008	0.0033±0.0001	134.20
	U+S ₂	1.185±0.058	0.376±0.017	1.561±0.068	0.561±0.020	0.0041±0.0002	222.96
	S ₂	0.964±0.079	0.306±0.028	1.270±0.106	0.595±0.014	0.0037±0.0001	135.36
AkN 87	K ₀	1.880±0.202	0.671±0.052	2.551±0.251	0.409±0.011	0.0055±0.0001	100.00
	U	1.884±0.111	0.651±0.032	2.535±0.138	0.417±0.010	0.0057±0.0001	130.90
	K ₁	1.951±0.131	0.679±0.042	2.630±0.170	0.412±0.015	0.0055±0.0001	100.19
	K ₂	1.566±0.096	0.592±0.015	2.158±0.108	0.435±0.015	0.0059±0.0001	166.62
	U+S ₁	1.401±0.056	0.501±0.026	1.902±0.059	0.455±0.012	0.0066±0.0001	287.72
	S ₁	1.362±0.096	0.517±0.042	1.879±0.120	0.467±0.014	0.0064±0.0001	193.14
	U+S ₂	1.277±0.066	0.389±0.010	1.666±0.074	0.462±0.012	0.0071±0.0002	285.07
	S ₂	1.133±0.134	0.404±0.032	1.537±0.163	0.498±0.023	0.0067±0.0001	182.14
AkN 290	K ₀	1.867±0.156	0.673±0.038	2.539±0.189	0.421±0.020	0.0040±0.0001	100.00
	U	1.136±0.109	0.401±0.032	1.537±0.140	0.428±0.022	0.0042±0.0001	189.94
	K ₁	1.875±0.095	0.676±0.035	2.550±0.129	0.422±0.017	0.0041±0.0001	106.06
	K ₂	1.494±0.104	0.569±0.042	2.063±0.134	0.458±0.016	0.0047±0.0001	163.42
	U+S ₁	1.107±0.062	0.388±0.025	1.495±0.083	0.469±0.013	0.0053±0.0001	262.80
	S ₁	1.269±0.089	0.432±0.035	1.702±0.120	0.482±0.012	0.0050±0.0001	188.27
	U+S ₂	1.107±0.062	0.358±0.019	1.465±0.076	0.471±0.026	0.0066±0.0001	289.73
	S ₂	0.885±0.094	0.313±0.035	1.198±0.126	0.502±0.014	0.0062±0.0001	166.80
AÖF %5	0.35	0.15	0.46	0.05	0.0004	77	

* (K₀=stresin başlatıldığı 12 günlük kontrol grubu, U=7 gün süreyle 10°C'de uyumlandırılan 19 günlük gruplar, K₁=19 günlük kontrol grubu, K₂=31 günlük kontrol grubu, U+S₁=uyumlandırıldıktan sonra 12

Gökçe ve AkN 290'da uyum periyotlu 2°C'ye (U+S₂) ve 4°C'ye (U+S₁) maruz bırakılan gruplar arasındaki flavonoid içeriği artarken, Canitez ve AkN 87'de bu gruplar arasında flavonoid içeriğinde azalma belirlenmiştir. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan grupların (S₂) kontrollerine (K₂) göre flavonoid içeriği tüm genotiplerde artmıştır. Bunun yanı sıra, genotiplerin tümünde, uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan stres grupları (U+S₂) ile uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye alınan stres grupları (S₂) arasında flavonoid miktarı azalmıştır ve bu azalma Gökçe'de %22, Canitez'de %39, AkN 87'de %36 ve AkN 290'da %42 düzeyindedir. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılanların (S₂) uyum periyotsuz 4°C'ye alınanlara (S₁) göre soğuk şiddetinin artmasına bağlı olarak Gökçe ve Canitez'de flavonoid içeriğinde artma ve AkN 87 ve AkN 290'da ise azalma meydana gelmiştir.

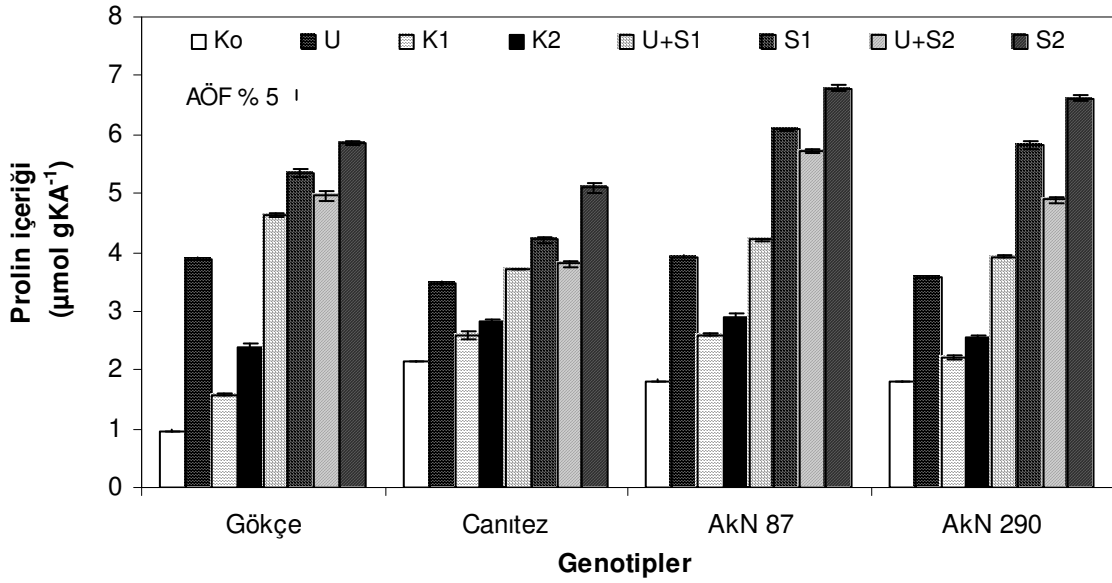
4.2.3. Yaprak dokularındaki prolin içeriği üzerine etkisi

Tüm genotiplerin prolin içeriğinde soğuk uygulamalarının başlatıldığı (12 günlük bitki) kontrol grubu (K₀) ile uyumlanmış bitkilerin kontrol grubu (K₁) arasında zamana bağlı olarak önemli bir artış meydana gelmiştir (Şekil 4.8). Bu önemli artış uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış grupların kontrollerinde (K₂) de devam etmiştir. Soğuk uyumu (U) bütün genotiplerde, kendi kontrolüne (K₁) göre önemli düzeyde prolin birikimine neden olmuştur, bu birikim Gökçe'de %146.2, Canitez'de %34, AkN 87'de %51.2 ve AkN 290'da ise %61.1 düzeyindedir.

Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık (U+S₁) prolin miktarında tüm genotiplerde aynı yaştaki kontrollerine (K₂) göre önemli bir artışa neden olmuştur ve bu artış en fazla Gökçe'de (%95.4), en az ise Canitez'dedir (%31.6). Uyum periyotlu 4°C'ye alınan gruplar (U+S₁) ile uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan gruplar (S₁) arasındaki prolin miktarı artışı incelendiğinde; bu etki genotiplerin tümünde önemli bulunmuştur. Uyumdan sonra 2°C düşük sıcaklığa (U+S₂) maruz kalan tüm genotiplerin prolin içeriği K₂'ye göre önemli oranda artmıştır. Uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan (U+S₂) grupların uyum periyotlu 4°C'ye alınan (U+S₁) gruplara göre düşük sıcaklık azalmasına bağlı olarak prolin miktarında Gökçe,

AkN 87 ve AkN 290'da önemli bir artma meydana gelirken, Canitez'de önemli bir değişiklik olmamıştır.

Tüm genotiplerde uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan gruplar (U+S₂) ile uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye alınan gruplar (S₂) arasındaki prolin miktarındaki artış önemlidir. En fazla artış %35.2 ile AkN 290'da ve en az artış ise %17.9 ile Gökçe'dedir. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan (S₂) Gökçe, Canitez, AkN 87 ve AkN 290'da uyum periyotsuz 4°C'ye alınanlara (S₁) göre düşük sıcaklığa bağlı önemli prolin artışı sırasıyla %9.8, %20.6, %11.5 ve %13.4 düzeydedir.



Şekil 4.8. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının yapraklardaki prolin içeriği üzerine etkisi

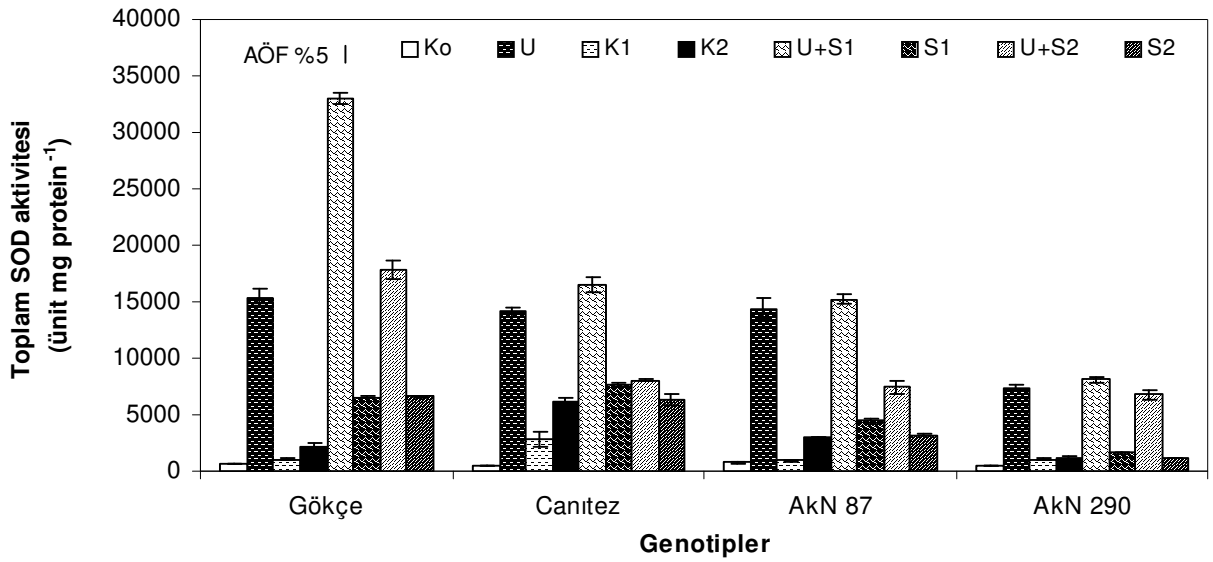
(K₀=Soğuk uygulamalarının başlatıldığı gündeki ilk kontrol grubu, U=uyumlandırılan gruplar, K₁=uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları, K₂=uyum periyotlu veya uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrol grupları, U+S₁=uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres grupları, S₁=uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları, U+S₂=uyum periyotlu 2°C'ye alınan stres grupları, S₂=uyum periyotsuz 2°C'ye maruz bırakılan stres grupları).

Ortalama prolin ile standart hata ve AÖF %5 değerleri EK, Çizelge 12'de verilmiştir.

4.2.4. Yaprak dokularındaki enzimatik antioksidant savunma sistemleri üzerine etkisi

Soğuk uygulamalarının genotiplerin yaprak dokularındaki toplam SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde (Şekil 4.9); sadece Canitez'de soğuk

uygulamalarının başlatıldığı gündeki ilk kontrol grubu (K_0) ile uyumlanmış bitkilerin kontrol grubu (K_1) arasında zamana bağlı olarak SOD aktivitesinde önemli bir artış belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrollerinin (K_2) ilk kontrol (K_0) gruplarına göre zaman bağlı olarak toplam SOD aktivitesindeki artış AkN 290 dışındaki tüm genotiplerde önemli bulunmuştur. Uyumlandırma (U) tüm genotiplerde aynı yaştaki kontrollerine (K_1) göre toplam SOD aktivitesinde önemli artışa neden olmuştur, bu önemli artış en fazla AkN 87 (13.78 kat), en az ise Canitez (3.9 kat) genotipinde belirlenmiştir. Uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres grupları ($U+S_1$) ile aynı yaştaki kontrolleri (K_2) arasındaki toplam SOD aktivitesi değişimi incelendiğinde, $U+S_1$ gruplarında tüm genotiplerde önemli düzeyde artış belirlenmiştir. Uyum periyotsuz 4°C (S_1) sıcaklık uygulanan gruplardaki toplam SOD aktivitesindeki artış kendi kontrolüne göre (K_2), sadece Gökçe'de önemli bulunmuştur.



Şekil 4.9. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının yaprak dokularındaki toplam SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi

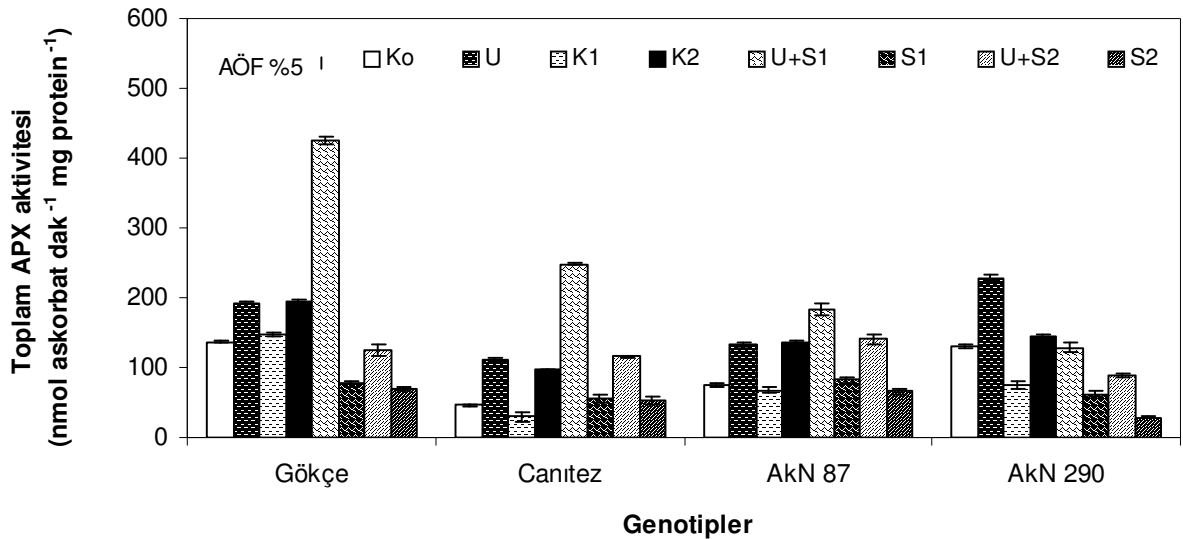
(K_0 =Soğuk uygulamalarının başlatıldığı gündeki ilk kontrol grubu, U=uyumlandırılan gruplar, K_1 =uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları, K_2 =uyum periyotlu veya uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrol grupları, $U+S_1$ =uyum periyotlu °C'ye alınan stres grupları, S_1 =uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları, $U+S_2$ =uyum periyotlu °C'ye alınan stres grupları, S_2 =uyum periyotsuz 2°C'ye maruz bırakılan stres grupları).

Ortalama SOD ile standart hata ve AÖF %5 değerleri EK, Çizelge 13'te verilmiştir.

Uyumdan sonra 4°C'ye alınan gruplar ($U+S_1$) ile uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan gruplar (S_1) arasındaki toplam SOD aktivitesi azalışı tüm genotiplerde

önemlidir. Uyumdan sonra 2°C soğuk stresine (U+S₂) maruz kalan tüm genotiplerin toplam SOD aktiviteleri kendi kontrollerine (K₂) göre önemli oranda artmıştır, en fazla artış Gökçe'de, en az artış ise Canitez'dedir. Uyum periyotlu 2°C'ye (U+S₂) ve 4°C'ye (U+S₁) maruz bırakılan gruplar arasındaki toplam SOD aktivitesi Gökçe, Canitez ve AkN 87'de önemli oranda azalırken, AkN 290'daki azalma istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan grupların (S₂) kendi kontrollerine (K₂) göre toplam SOD enzim aktivitesi, sadece Gökçe'de önemli derecede artmıştır. Ayrıca, tüm genotiplerde uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan gruplar (U+S₂) ile uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye alınan gruplar (S₂) arasındaki toplam SOD enzim aktivitesi azalışı önemli bulunmuştur. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılanların (S₂) uyum periyotsuz 4°C'ye alınanlara (S₁) göre düşük sıcaklık şiddetinin artmasına bağlı olarak gerçekleşen toplam SOD aktivitesi değişimlerinin, tüm genotiplerde önemsiz olduğu saptanmıştır.

Genotiplerin toplam APX enzim aktivitesine düşük sıcaklık uygulamalarının etkisi incelendiğinde (Şekil 4.10); uyumlanmış bitkilerin kontrol gruplarının (K₁) soğuk uygulamasının başlatıldığı gündeki kontrol gruplarına (K₀) göre toplam APX aktivitesindeki değişim, sadece AkN 290'da önemli bulunmuştur.



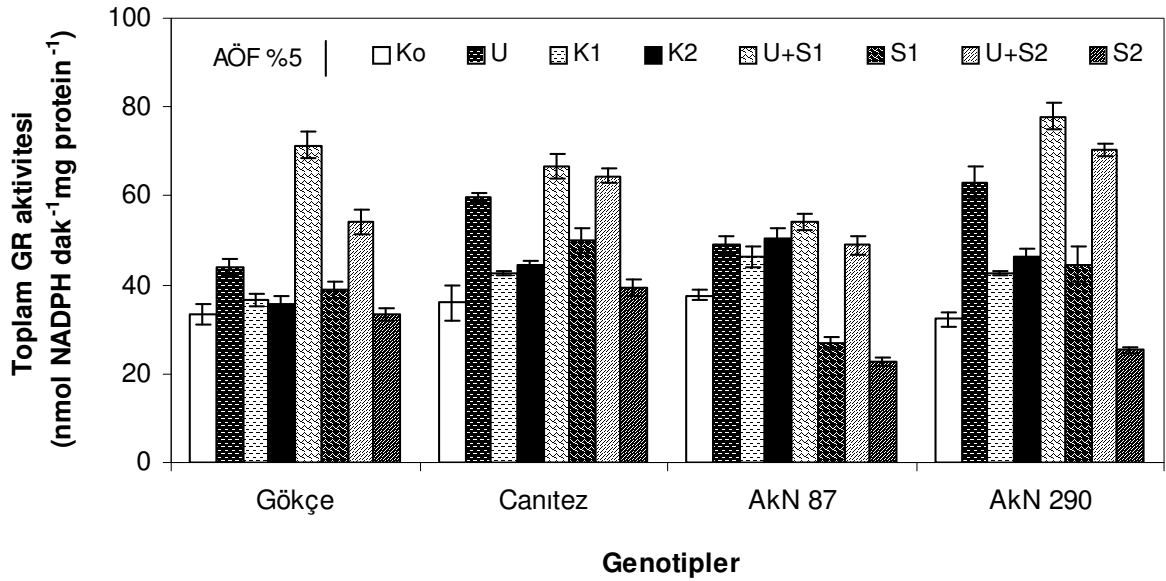
Şekil 4.10. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının yaprak dokularındaki toplam APX enzim aktivitesi üzerine etkisi

(K₀=Soğuk uygulamalarının başlatıldığı gündeki ilk kontrol grubu, U=uyumlandırılan gruplar, K₁=uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları, K₂=uyum periyotlu veya uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrol grupları, U+S₁=uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres grupları, S₁=uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları, U+S₂=uyum periyotlu 2°C'ye alınan stres grupları, S₂=uyum periyotsuz 2°C'ye maruz bırakılan stres grupları).

Ortalama APX ile standart hata ve AÖF %5 değerleri EK, Çizelge 14'te verilmiştir. Uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrollerinin (K_2) hem K_1 hem de K_0 'a göre toplam APX aktiviteleri Gökçe, Canitez ve AkN 87 genotiplerinde önemli derecede artmıştır. Buna karşın, AkN 290'da toplam APX aktivitesinin artışı, sadece K_1 'e göre önemli bulunmuştur. Uyum grupları (U) ile aynı yaştaki kontrolleri (K_1) arasındaki toplam APX aktivitesinin artışı, tüm genotiplerde önemlidir ve en fazla artış AkN 290'da, en az artış ise Gökçe'de belirlenmiştir. Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklığa maruz kalan grupların ($U+S_1$) kendi kontrollerine (K_2) göre, toplam APX aktivitelerinde meydana gelen artışın AkN 290 dışındaki genotiplerde önemli olduğu saptanmıştır. Uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları (S_1)'nda hem kendi kontrollerine (K_2) hem de $U+S_1$ gruplarına göre oluşan toplam APX aktivite azalışı, tüm genotiplerde önemlidir. Uyumdan sonra 2°C soğuğa ($U+S_2$) maruz kalan grupların kontrollerine (K_2) göre toplam APX aktivitesi Gökçe ve AKN 290'da önemli derecede azalırken, Canitez'de önemli oranda artmıştır. AkN 87'de meydana gelen artış ise istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bunun yanı sıra, düşük sıcaklık ile uyum periyotlu 2°C'ye ($U+S_2$) ve 4°C'ye ($U+S_1$) maruz bırakılan gruplar arasındaki toplam APX aktivitesi, genotiplerin tümünde önemli düzeyde azalmıştır. Aynı zamanda, uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan grupların (S_2) hem kendi kontrollerine (K_2) hem de $U+S_2$ 'ye göre toplam APX aktivitesindeki azalış tüm genotiplerde önemlidir. Uyum periyotsuz doğrudan 4°C (S_1) ve 2°C'ye (S_2) maruz bırakılan gruplar arasında soğuk şiddetinin artmasına bağlı olarak meydana gelen toplam APX aktivitesindeki azalış sadece AkN 290'da önemli bulunmuştur.

Yaprak dokularındaki toplam GR enzim aktivitesi üzerine düşük sıcaklık uygulamalarının etkisi incelendiğinde (Şekil 4.11); uyumlanmış bitkilerin kontrol gruplarının (K_1) ilk kontrol gruplarına (K_0) göre toplam GR aktivitesinde zamana bağlı meydana gelen artış sadece hatlarda önemli bulunmuştur. Uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrollerinin (K_2) K_0 'a göre toplam GR aktivitesindeki artış ise Canitez, AkN 87 ve AkN 290'da önemli iken, bu etki Gökçe'de önemsiz bulunmuştur. Soğuk uyumu (U), Canitez ve AkN 290'da kendi kontrollerine (K_1) göre toplam GR aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur, Gökçe ve AkN 87'de meydana gelen artış ise istatistiksel olarak önemli değildir. Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklığa maruz kalan

grupların (U+S₁) aynı yaştaki kontrollerine (K₂) göre toplam GR aktivitelerinde meydana gelen artışlar Gökçe, Canitez ve AkN 290'da önemli olup; en az artış Canitez'de en fazla artış ise Gökçe'de belirlenirken AkN 87'deki artış önemsizdir. Uyum periyotsuz 4°C (S₁) sıcaklık uygulanan gruplardaki toplam GR aktivitesi kontrolüne göre (K₂) sadece AkN 87'de önemli oranda azalmıştır. Uyumdan sonra 4°C'ye alınan gruplar (U+S₁) ile uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan gruplar (S₁) arasındaki toplam GR aktivitesi azalışı tüm genotiplerde önemlidir ve bu azalma Gökçe'de %45.9, Canitez'de %25, AkN 87'de %50.5 ve AkN 290'da ise %42.8 düzeyindedir. Uyumdan sonra 2°C (U+S₂)'ye maruz kalan grupların aynı yaştaki kontrollerine (K₂) göre toplam GR aktivitesi, AkN 87 hariç tüm genotiplerde önemli oranda artmıştır. Uyum periyotlu 2°C'ye (U+S₂) ve 4°C'ye (U+S₁) alınan gruplar arasındaki toplam GR aktivitesinin azalması ise sadece Gökçe'de önemli bulunmuştur. Uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan grupların (S₂) kontrollerine (K₂) göre toplam GR aktivitelerindeki azalış, nohut hatlarında önemli olup, bu azalma yaklaşık %50 civarındadır.



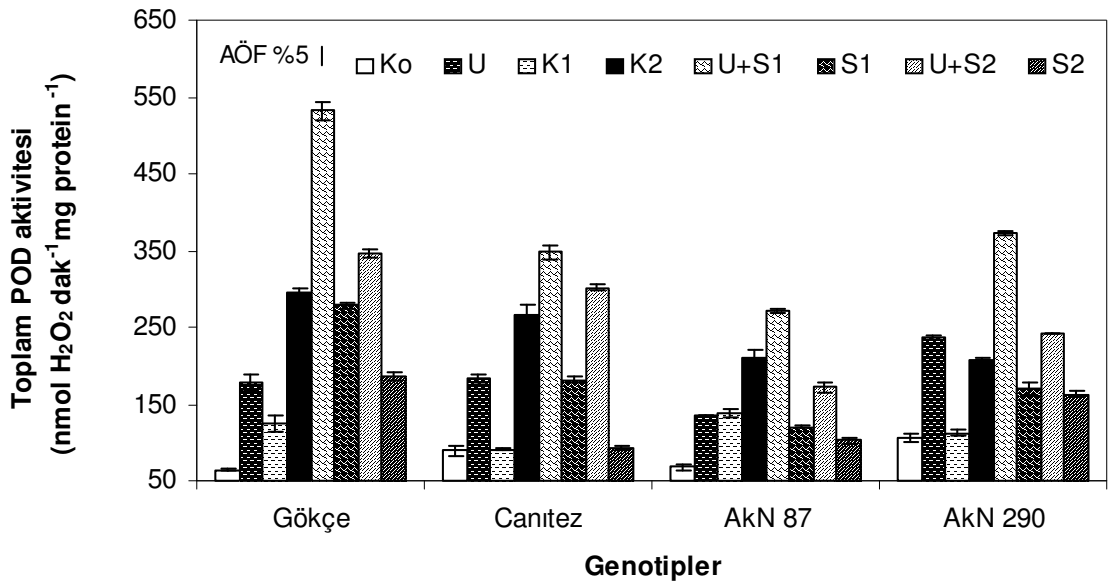
Şekil 4.11. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının yaprak dokularındaki toplam GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

(K₀=Soğuk uygulamalarının başlatıldığı gündeki ilk kontrol grubu, U=uyumlandırılan gruplar, K₁=uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları, K₂=uyum periyotlu veya uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrol grupları, U+S₁=uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres grupları, S₁=uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları, U+S₂=uyum periyotlu 2°C'ye alınan stres grupları, S₂=uyum periyotsuz 2°C'ye maruz bırakılan stres grupları).

Ortalama GR ile standart hata ve AÖF %5 değerleri EK, Çizelge 15'te verilmiştir.

Tüm genotiplerde, uyum periyotlu 2°C'ye maruz bırakılan gruplar (U+S₂) ile uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye alınan gruplar (S₂) arasındaki toplam GR aktivitesi azalışı önemli bulunmuştur. Uyum periyotsuz doğrudan 4°C (S₁) ve 2°C'ye (S₂) maruz bırakılan gruplar arasındaki düşük sıcaklık şiddetinin artmasına bağlı toplam GR aktivitesindeki azalma sadece Canitez ve AkN 290 genotiplerinde önemli bulunmuştur.

Soğuk uygulamalarının, genotiplerin toplam POD enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde (Şekil 4.12); uyumlanmış bitkilerin kontrol gruplarının (K₁) ilk kontrol gruplarına (K₀) göre, toplam POD aktivitesinde zamana bağlı meydana gelen artış, Gökçe ve AkN 87'de önemli bulunmuştur. Bunun yanı sıra, uyum periyotlu ve uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış soğuk uygulama gruplarının kontrollerinin (K₂) hem K₀'a hem de K₁'e göre, toplam POD aktivitesindeki artışın tüm genotiplerde önemli olduğu saptanmıştır. Gökçe, Canitez ve AkN 290'da uyum grupları (U) ile aynı yaştaki kontrolleri (K₁) arasında toplam POD aktivitesinde meydana gelen artış önemlidir.



Şekil 4.12. Soğuk uygulamalarının, nohut çeşit ve hatlarının yaprak dokularındaki toplam POD enzim aktivitesi üzerine etkisi

(K₀=Soğuk uygulamalarının başlatıldığı gündeki ilk kontrol grubu, U=uyumlandırılan gruplar, K₁=uyumlanmış bitkilerin kontrol grupları, K₂=uyum periyotlu veya uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye maruz bırakılmış stres gruplarının kontrol grupları, U+S₁=uyum periyotlu 4°C'ye alınan stres grupları, S₁=uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılan stres grupları, U+S₂=uyum periyotlu 2°C'ye alınan stres grupları, S₂=uyum periyotsuz 2°C'ye maruz bırakılan stres grupları).

Ortalama POD ile standart hata ve AÖF %5 değerleri EK, Çizelge 16'da verilmiştir.

Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklığa maruz kalan grupların (U+S₁) kendi kontrollerine (K₂) göre toplam POD aktivitesindeki artış, tüm genotiplerde önemli bulunmuştur. Uyum periyotsuz 4°C (S₁) düşük sıcaklık uygulanan grupların toplam POD aktivitelerindeki azalma kontrollerine (K₂) göre, Canitez, AkN 87 ve AkN 290'da önemliyken, U+S₁'e göre tüm genotiplerde önemsiz bulunmuştur. Uyumdan sonra 2°C soğuk stresine (U+S₂) maruz kalan grupların kendi kontrollerine (K₂) göre toplam POD aktivitesi Gökçe, Canitez ve AKN 290'da önemli derecede artarken, AkN 87'de ise önemli derecede azalmıştır. Uyum periyotlu 2°C'ye (U+S₂) ve 4°C'ye (U+S₁) maruz bırakılan gruplara göre ve uyum periyotsuz doğrudan 2°C'ye maruz bırakılan grupların (S₂) hem kendi kontrollerine (K₂) hem de U+S₂'ye göre, toplam POD aktivitesindeki azalma tüm genotiplerde önemli bulunmuştur. Uyum periyotsuz 4°C (S₁) ve 2°C'ye (S₂) maruz bırakılan gruplar arasındaki düşük sıcaklık şiddetinin artmasına bağlı olarak toplam POD aktivitesindeki azalma Gökçe (%33) ve Canitez (%49)'de önemlidir.

5. TARTIŞMA

Önemli bir çevresel stres faktörü olan soğğun, baklagiller de dahil olmak üzere birçok tropikal ve subtropikal bitkinin büyüme ve gelişimini engellediği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Wang et al., 1997b; Domisch et al., 2002; Provar, et al., 2003; Nayyar et al., 2005a; Hu et al., 2006; Lundmark et al., 2006; Mostafa and Hassan, 2006; Bertamini et al.,2007; Rymen et al., 2007). 10°C'lik uyum sıcaklığı AkN 290 dışındaki tüm genotiplerde gövde uzunluğunda aynı yaştaki kontrollerine göre önemli azalmaya neden olmuştur (Çizelge 4.1). Ayrıca uyumdan sonra uygulanan düşük sıcaklıklarda (4°C ve 2°C) gövde uzaması tüm genotiplerde kendi kontrollerine göre inhibisyona uğramış ve en fazla inhibisyon Gökçe'de en az inhibisyon ise AkN 290'da belirlenmiştir. Uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye alınan gruplarının gövde büyümesinin, uyumdan sonra 4°C ve 2°C'ye alınan gruplara göre daha fazla olmasının nedeni; uyumlanmış gruplarının uyum süreci sırasında (7 gün, 10°C) uyumlanmamış gruplarının, optimum koşullarda (7 gün, 25°C) büyümeye devam etmesidir. Uyum periyotsuz 4°C'ye alınan gruplarının gövde büyüme inhibisyonu, aynı yaştaki kontrolüne göre sadece nohut çeşitlerinde önemli iken, uyum periyotsuz 2°C'ye alınan gruplarında ise, bu etkinin tüm genotiplerde ve özellikle de Gökçe çeşidinde önemli olduğu saptanmıştır. Gökçe'de gerek uyum sıcaklığında gerekse, soğuk şiddetinin artmasına bağlı olarak gövde uzamasının azalması, muhtemelen bu çeşitte seçilen uyum sıcaklık derecesinin, soğuk toleransının kazanılması için gerekli olan moleküler ve biyokimyasal değişimlerin teşvikinde yeterli olduğunu gösteriyor olabilir. Buna karşın AkN 290'da seçilen uyum sıcaklığının gövde uzunluğunu kendi kontrolüne göre önemli bir değişikliğe uğratmaması, bu hatta soğuk toleransının kazanılması için gerekli değişimlerin [fotosentetik aktivite (Şekil 4.2; 4.3; 4.4; 4.5; 4.6), yaprak dokularındaki lipid peroksidasyonu (Şekil 4.7) ve bazı savunma enzim aktivitelerindeki değişimleri (Şekil 4.9; 4.12)] muhtemelen yetersiz kaldığını göstermektedir. Bu durum, farklı genotiplerin gereksinim duyduğu uyum sıcaklık derecelerinin de genotipik çeşitlilik gösterdiğini düşündürmektedir. Ayrıca, düşük sıcaklık uygulamalarında AkN 290'da fotosentetik aktivitenin azalmış olmasına karşın, gövde büyümesinin diğer genotiplere göre daha az etkilenmiş olması, bu genotipte büyümeyi sağlayan faktörün asimilatlardan çok mevcut rezervlerin kullanılması sonucu olabilir.

Düşük sıcaklık, yaprak oluşumunu da etkileyen önemli çevresel faktörlerden biridir (Lyons, 1973). Bitkideki toplam yaprak sayısının; genotip, ışık yoğunluğu ve sıcaklıktan etkilendiği bilinmektedir (Simmons, 1987). Robertson vd. (1996), farklı düşük sıcaklık derecelerinin (-1, 5, 8, 11, 14 ve 17°C) kışlık buğdayda toplam yaprak sayısını etkilediğini ve yaprak sayısının düşük sıcaklık şiddetinin artmasına bağlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, uyumlanmış veya uyumlanmamış düşük sıcaklık uygulamaları, hatta uyum sıcaklığı uygulaması bile, kendi kontrol gruplarına göre, tüm genotiplerin yaprak çıkışında önemli düzeyde inhibisyona neden olmuştur (Çizelge 4.1). Uyum periyotlu uygulanan her iki düşük sıcaklık uygulaması birbirlerine göre karşılaştırıldığında; 2°C düşük sıcaklık uygulaması genotiplerin yaprak sayısında önemli düzeyde inhibisyona neden olmuş ve en fazla inhibisyon Gökçe çeşidinde belirlenmiştir. Tüm genotiplerde, uyum periyotsuz 4°C ve 2°C'ye alınan grupların yaprak sayısının, uyumdan sonra 4°C ve 2°C'ye alınan gruplara göre daha fazla olmasının nedeni; uyumlanmış grupların uyum süreci sırasında, uyumlanmamış grupların optimum koşullarda büyüme ve gelişmeye devam etmesidir. Benzer şekilde, 14°C'de büyüyen mısır bitkileri 4 haftada üç yaprak evresine ulaşırken optimum koşullar altında büyüyenlerin aynı evreye 2 haftada ulaştıkları ve artan soğuk stresi derecelerinin bitki gelişimini baskıladığı Kingston-Smith vd. (1999) tarafından bildirilmiştir. Yaprak belirim hızı ve çıkışındaki azalmanın doğrudan gövde ucu meristeminin düşük sıcaklıktan olumsuz yönde etkilenmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (White et al., 1990; Rymen et al., 2007). Bu çalışmada da deneme süresince hiç bir genotipte yaprak absisyonunun gözlenmemesi; soğuk uygulamaları ile genotiplerde belirlenen yaprak sayısındaki azalmanın, muhtemelen gövde ucu meristemindeki hücre oluşum hızının ve hücre uzamasının soğuktan olumsuz etkilenmesi sonucunda gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Düşük sıcaklığın bitkilerde biyokütle üretimini azalttığı ve/veya arttırdığı bildiren araştırmalar bulunmaktadır (White et al., 1990; Dubert et al., 1994; Goulas et al., 2003). Soğuk uygulamalarının genotiplerin toplam toprak üstü organlarının taze ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi incelendiğinde; soğuk uyumunun hiçbir genotipin taze ya da kuru ağırlığında önemli bir değişime neden olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.1). Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık, kendi kontrol grubuna göre taze ağırlıkta sadece Gökçe'de, kuru ağırlıkta ise hem Gökçe hem de AkN 87'de

azalmaya neden olmuş, ve her iki parametre için de en fazla inhibisyon Gökçe'de saptanmıştır. Uyumdan sonra uygulanan 2°C sıcaklık ise, Gökçe'de belirgin olmak üzere tüm genotiplerde kendi kontrollerine göre taze ve kuru ağırlık değerlerinde önemli inhibisyona neden olmuştur. Uyum periyotsuz uygulanan 4°C sıcaklık hiçbir genotipte kontrollerine göre önemli inhibisyon meydana getirmezken, uyumlanmadan 2°C'ye alınan gruplarda taze ağırlık inhibisyonu Gökçe ve Canitez'de, kuru ağırlık inhibisyonu ise Gökçe ve AkN 87'dedir. Gökçe'de meydana gelen bu inhibisyon diğer büyüme parametreleri ile de uyum göstermektedir; ancak, biyokimyasal parametreler incelendiğinde Gökçe çeşidinin, MDA sonuçlarının da gösterdiği gibi, fizyolojik olarak en az hasara uğraması, bu çeşidin büyümeyi azaltma yolunu seçerek soğuk stresinden korunduğunu düşündürmektedir. Düşük sıcaklıkta büyüyen bitkilerin kök ve gövde kuru ağırlıklarındaki artışın, soğuk sırasında hücre duvarlarında artan selüloz birikimi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Clarkson and Deane-Drummond, 1983). Gökçe çeşidinde de, büyüme parametrelerinin soğuk uygulamalarından daha çok etkilenmesine karşılık, diğer genotiplere göre daha yüksek kuru ağırlık içeriğine sahip olması soğuk uyumlanması sırasında sentezlenen metabolitler ile ilişkili olabilir. Soğuk hasarı belirtilerinin düşük sıcaklığa maruz kalma süresinin artması ve sıcaklığın azalmasıyla arttığı bildirilmiştir (Jennings and Saltveit, 1994). Bu araştırma sonuçlarına benzer olarak, bu çalışmada da daha uzun süre düşük sıcaklığa maruz kalan grupların (U+S₁ ve U+S₂) taze ve kuru ağırlıkları genellikle daha çok inhibisyon göstermiştir.

Soğuk stresine bağlı olarak genotiplerin yaprak dokularındaki su içeriği (oransal ve gerçek su içeriği)'ndeki değişim incelendiğinde, soğuk uyumunun hiç bir genotipte önemli bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.1A ve B). Bu durum, uyum sıcaklık derecesinde topraktan köke suyun hareketinin ve suyun köke alımının olumsuz etkilenmediğini ve genotiplerin mevcut su içeriklerini koruduklarını gösteriyor olabilir. Uyumdan sonra ya da uyum periyotsuz uygulanan 4°C ve 2°C düşük sıcaklık uygulamaları genotiplerin hem oransal hem de gerçek su içeriğinde önemli düzeyde azalmaya neden olmuştur. Tüm grupların deneme boyunca tartılarak, son ağırlıkları tarla kapasitesine gelecek şekilde sulandıkları göz önüne alınırsa bu azalma, topraktaki suyun bitkilerin kökleri ile alımından ve kullanamamalarından kaynaklanabilir. Soğuk (üşüme) stresi sırasında bitkilerde

belirlenen su noksanlığının; suyun köklerle alınımındaki azalmanın, yapraklardan terleme ile kaybedilenden daha çok olması sonucu oluştuğu bildirilmiştir (Aroca et al., 2001). Tüm genotipler içerisinde oransal ve gerçek su içeriğinde en fazla azalma AkN 290'da görülmektedir. Soğuğa karşı duyarlı bitkilerin yapraklarında çoğunlukla düşük su potansiyeli içeriği ve solgunluk görülmektedir ve bu durum büyümeyi fotosentetik kapasiteyi ve hatta bitkinin yaşamını devam etmesini kısıtlayabilmektedir (Wilkinson et al., 2001). Uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklık oransal su içeriği bakımından Gökçe çeşidini önemli oranda etkilemezken uyumdan sonra uygulanan 2°C sıcaklık tüm genotiplerin oransal su içeriğinin azalmasına neden olmuştur. Aroca vd. (2003), mısır genotipleri arasındaki farklı derecelerdeki soğuk hassasiyetinin soğuk ile indüklenen su noksanlığından kaçınma kapasitesi ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir. Uyum periyotsuz uygulanan sıcaklıklar genotiplerin oransal su içeriğinde uyumlandırılan gruplara göre daha fazla azalma meydana getirmiştir ve uygulanan 2°C sıcaklığın 4°C'ye göre su dengesinin bozulmasında daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber çeşitlerde en şiddetli soğuk uygulamasından sonra bile belirlenen oransal ve gerçek su içeriklerinin hatlardan fazla olması, bazı soğuğa dayanıklı bitkilerde görüldüğü gibi, stomaların kapatılarak transpirasyonla su kaybının önlenmesi sayesinde gerçekleşmiş olabilir. Yang vd. (2005a; b) düşük sıcaklıkta stomaların kapanmasının, soğuk ile köklerde hidrolitik iletkenliğin azalması ve topraktan su alımının önemli derecede inhibe olması sonucu olabileceğini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra çeşitlerde uygulanan 2°C'de fotosentetik verimliliğin de hatlara göre yüksek bulunmasının, içsel su içeriğinin devam ettirilebilmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Tüm soğuk uygulamalarında hiçbir genotipte oransal su içeriği %50'nin, gerçek su içeriği ise %65'in altına düşmemiştir. Ayrıca, kontrol gruplarının oransal su içeriklerinin %70-80 arasında bulunması, hasat günü kontrol ve stres grupları arasında bir fark olmaması için sulama yapılmamasından kaynaklanmıştır.

Çeşitli bitki türlerinin, büyüme ve gelişimleri sırasındaki sıcaklık düşüşleri, fotosentetik aktivitenin şiddetli şekilde baskılanmasına sebep olur (Goulas et al., 2006). Ayrıca, düşük sıcaklıkların fotosentezi; stoma kapanması, tilakoidlerde elektron taşınımının ve fotofosforilasyonun inhibisyonu ve sukroz ve nişasta biyosentezindeki anahtar enzimlerin inhibisyonu ile sınırlayabileceği belirtilmiştir

(Allen and Ort, 2001; Huang and Guo, 2005; Bertamini et al., 2007). Düşük sıcaklık gibi bazı çevresel streslerle indüklenen fotosentetik kapasitedeki azalma, özellikle elektron taşınımındaki fotoinhibisyon nedeniyle, fotosentetik elektron taşınım sisteminde enerji (ATP) ve indirgeyici güç (NADPH) üretiminin inhibe olmasına ve sonuçta fotosentetik karbon metabolizmasının inhibisyonuna yol açmaktadır (Baker and Rosenqvist, 2004; Tambussi et al., 2004; Weng et al., 2006).

Yapraktaki klorofil molekülleri tarafından absorblanan ışık enerjisi üç yol izler: Enerjinin bir kısmı fotosentezi sürdürmek için (fotokimya) kullanılır, büyük bir kısmı ısı olarak dağılır, bir kısmı da ışık olarak tekrar yayılır – klorofil fluoresans (Maxwell and Johnson, 2000). Çeşitli stres koşulları fotosentez hızını azaltabilir ve ışık varlığında devam eden fotosentetik elektron taşınımını ışık absorpsiyon işlemini etkilemeden bozabilir ya da engelleyebilir. Bu durum ısı yayılımı ve klorofil fluoresans yolu ile absorblanan ışık enerjisinin de-eksitasyonunun artmasıyla sonuçlanır (Georgieva and Lichtenthaler, 1999). Yapraklardaki klorofil *a* fluoresansı ölçümü, kolay ve güvenilir bir yöntem olarak baklagiller de dahil olmak üzere farklı genotip ve türlerin soğuğa toleransını belirlemek için birçok araştırmada kullanılmıştır (Fracheboud et al., 1999; Van Heerden et al., 2003; Hirotsu et al., 2004; Tambussi et al., 2004). Bu çalışmada soğukla uyumlandırmanın, genotipler üzerinde klorofil *a* fluoresans parametreleri üzerine önemli değişiklikler meydana getirmediği saptanmıştır (Şekil 4.2; 4.3; 4.4; 4.5; 4.6). Bu durum, genotiplerin fotosentetik aktiviteleri üzerine uygulanan uyum sıcaklığı ve süresinin herhangi bir stres oluşturmamasından kaynaklanmış olabilir. Minimum fluoresans olarak ifade edilen F_o 'nun, uyumlandırmadan sonra uygulanan 4°C sıcaklıkta AkN 87 dışındaki tüm genotiplerde; doğrudan 4°C uygulamasında ise tüm genotiplerde önemli oranda arttığı görülmüştür. Buna karşın, 2°C uygulamaları (uyumlanmış ve uyumlanmamış) genotiplerin F_o değerinde kendi kontrollerine göre istatistiksel olarak önemli derecede artış meydana getirmişlerdir (Şekil 4.2A). Yüksek F_o değerleri PSII reaksiyon merkezlerindeki ya da antenden reaksiyon merkezlerine enerji transferindeki muhtemel bir bozulmanın (foton hasarı ve kronik fotoinhibisyon) bir göstergesi olup, strese karşı ışık-koruyucu kapasitenin aşıldığını ifade etmektedir (Osmond, 1994; Maxwell and Johnson, 2000; Rosenqvist and van Kooten, 2003; Kofidis et al., 2007). AkN 290'da 2°C uygulamaları, uyum periyotsuz

4°C uygulaması ile kıyaslandığında, F_o değerinin artması beklenirken, bu değer azalmıştır. Bunun nedeni bu genotip için 2°C uygulamalarının, muhtemelen zar bütünlüğünün bozması (Şekil 4.7) ve fotosentetik pigment (klorofil *a*, klorofil *b* ve klorofil *a+b*) içeriklerini (Çizelge 4.2) önemli derecede azaltması olabilir.

PSII alıcı (akseptör) bölgesindeki kinon moleküllerinin (Q_A , Q_B ve PQ) indirgenme derecesini ifade eden maksimum fluoresans (F_M) değeri, birçok olumsuz çevresel faktörün etkisiyle değişmektedir (Georgieva and Lichtenthaler, 1999; Maxwell and Johnson, 2000). Bu çalışmada da, genotiplerin tümünde doğrudan 4°C uygulaması ve tüm 2°C uygulamalarındaki F_M değerinde önemli azalma (Şekil 4.2B), elektron taşıma sisteminde yer alan kinon moleküllerinin tam olarak indirgenmemesinin bir göstergesi olabilir. Benzer olarak, 4°C sıcaklığa maruz bırakılan bezelye fidelerinde F_M 'in azaldığı Georgieva ve Lichtenthaler (1999) tarafından bildirilmiştir.

Karanlıkla adapte edilmiş yapraklarda, PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliğini ifade eden F_V/F_M oranı, fotosentetik aparatın fizyolojik durumunu ortaya koyan önemli bir parametredir (Kocheva et al., 2004). Düşük sıcaklıkla indüklenen PSII'nin fotoinhibisyonunun, fotokimyasal verimlilikte azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Szalai et al., 1997; Gray et al., 2003; Tambussi et al., 2004). Björkman ve Demming (1987) fotoinhibisyona uğramamış bir bitki için, F_V/F_M oranının 0.8 ile 0.83 arasında değiştiğini ifade etmektedir. Bu çalışmada da uyumdan sonra uygulanan 4°C sıcaklıkta, genotiplerin hiçbirinde F_V/F_M oranında (0.81-0.82) önemli bir düşüş meydana getirmediğinden bu uygulamanın genotiplerde fotosentezin fotoinhibisyonuna neden olmadığı söylenebilir (Şekil 4.2C). Uyum periyotsuz 4°C ve tüm 2°C uygulamaları ise tüm genotiplerde ve özellikle de AkN 290'da F_V/F_M oranında önemli bir azalmaya yol açmıştır. Bu oranın azalmasında hem F_o değerindeki artış hem de F_M değerindeki düşüş etkili olmuştur. Bu durumda soğuk stresinin genotiplerde, hem foton zararına hem de PSII ve PSI arasındaki elektron taşınımını kısmi olarak engelleyerek veya azaltmak suretiyle Q_A 'nın yükseltgenmesini sınırlayarak etkili olduğu söylenebilir. Yapılan çalışmada, tüm genotiplerde uyum periyotlu grupların F_V/F_M oranları uyumlandırılmayan gruplara göre daha yüksektir, bu durumun uyumlandırılan grupların PSII verimliliği açısından uygulanan soğuk uygulamalarına daha iyi adaptasyon sağlamalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Işığa adapte edilmiş yapraklarda PSII'nin gerçek fotokimyasal etkinliğini ifade eden Φ_{PSII} sonuçlarına göre, uygulanan soğuk stresi Gökçe'de sadece 2°C'de, diğer genotiplerde ise hem tüm 2°C hem de uyum periyotsuz 4°C uygulamalarında PSII elektron taşınımının fotokimyasal verimini azaltmıştır (Şekil 4.3). Genotiplerin Φ_{PSII} değerlerindeki azalmanın PSII'nin reaksiyon merkezindeki eksitasyon enerjisini yakalama etkinliğindeki (F_V'/F_M') azalmadan kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Şekil 4.4). Linger ve Brüggemann (1999), sıcaklık streslerinin çoğunda sıcaklık stresinin derecesine bağlı olarak Φ_{PSII} 'nin sadece F_V'/F_M' ya da qP tarafından belirlenmekten çok, her ikisinin bir kombinasyonu tarafından belirlendiğini vurgulamışlardır. qP ; fotokimyasal enerjiye çevrilen eksitasyon enerjisinin kullanımını ifade ederken, NPQ ise fotokimyasal olmayan kullanımın parametresi olup enerji dağılım yollarının etkisini ifade etmekte ve ısıya dönüşen enerjiyi ölçmek için kullanılmaktadır (Ralph and Gademann, 2005). Çalışmada, 4°C ve 2°C uygulamalarının AkN 290 dışındaki genotiplerin qP değeri üzerine etkisi (Şekil 4.6A), Φ_{PSII} değeri üzerine etkisinden daha azdır, bu durum antedeki enerji dağılımının, açık reaksiyon merkezlerinin (qP) yüksek oranda devamlılığına izin verecek şekilde, yeterince iyi çalıştığının göstergesi olabilir. AkN 290'da ise Φ_{PSII} , qP 'nin azalmasıyla daha da azalmıştır. F_V'/F_M' , antedeki ısı enerjisi dağılımının büyüklüğü olarak tanımlanır, bu dağılım örneğin enerjinin PSII merkezlerine ulaşmasından önce gerçekleşir ve potansiyel kuantum verimi (F_V'/F_M') ve/veya fotokimyasal olmayan kullanım (NPQ) ile belirlenir (Genty et al., 1990). Bütün genotiplerde hem doğrudan 4°C hem de tüm 2°C uygulamalarında F_V'/F_M' değerleri azalmıştır (Şekil 4.4) ve en büyük azalma AkN 290'da belirlenmiştir. F_V'/F_M' değerindeki azalmalar, enerji yayılımının artması ve absorblanan enerjiden fotokimyasal işlevler için yararlanmanın azalması ile ilişkilendirilebilir (Demmig-Adams et al. 1995; Kościelniak et al., 2005). Işık enerjisinin absorblanması ile fotosentezin bu enerjiden faydalanması arasında çevresel olarak indüklenen herhangi bir dengesizlik hem PSII'de fotohasara neden olabilir hem de PSII'nin ışıktan korunması için, aşırı ışık enerjisinin fotokimyasal olmayan yayılımını (fotokimyasal olmayan kullanım; NPQ) indükleyebilir (Gilmore, 1997; Ivanov et al., 2003). Araştırmada, 4°C ve 2°C soğuk stresi uygulamalarına maruz kalan genotiplerden AkN 87'nin sadece uyum periyotlu 4°C'ye alınan grupları ile Gökçe ve Canitez'in sadece doğrudan 2°C uygulanan gruplarında NPQ değerinde önemli artış gözlenmesi (Şekil 4.6B), bu uygulamalarda aşırı eksitasyon enerjisinin ısı

enerjisi olarak yayılmış olabileceğini düşündürmektedir. PSII'nin fotohasardan ısı enerjisi yayılımı ile korunduğunu gösteren *NPQ* değeri, AkN 290'da hiçbir uygulamada değişmemiştir, bu mekanizmanın özellikle bu genotip için etkin hale gelmediği düşünülebilir.

Soğuk stres uygulamalarında, diğer klorofil floresans parametrelerine uyumlu olarak, elektron taşıma hızı (*ETH*) tüm genotiplerde hem tüm 2°C hem de doğrudan 4°C uygulamalarında azalmıştır (Şekil 4.5). Düşük sıcaklıklarda fotosentetik elektron taşımadaki sınırlamanın CO₂ fiksasyonu için NADPH ve ATP kaynağını kısıtladığı bildirilmiştir (Janssen et al., 1992; Georgieva and Lichtenthaler, 1999).

Zar lipidlerinin serbest radikalle indüklenen peroksidasyonunun, hücresel düzeyde stresten kaynaklanan hasarın hem ölçütü hem de yansıması olduğu bilinmektedir (de Azevedo Neto et al., 2006). Düşük sıcaklık sırasında, doymamış yağ asitlerinin bozulmasıyla son ürün olarak oluşan malondialdehit (MDA) miktarındaki artış, bitkilerde zarların yapısal bütünlüğünün bozulduğunu gösteren iyi bir indikatördür (Posmyk et al., 2005; Lin et al., 2006). Bu çalışmada uyumlandırma hiçbir genotipte aynı yaştaki kontrolüne göre yapraklardaki MDA konsantrasyonunu önemli oranda arttırmamıştır, bunun nedeni 7 gün boyunca uygulanan 10°C'nin yaprak doku hücre zarlarında lipid peroksidasyonuna yol açacak bir zarar vermemesinden kaynaklanmış olabilir (Şekil 4.7). Uyum sırasında tüm genotiplerde belirlenen antioksidant enzim aktivitelerindeki artışın, muhtemelen oluşan serbest radikallerin uzaklaştırılmasında ve lipid peroksidasyonunun engellenmesinde etkili rol oynayarak, zarların yapısal bütünlüğünü koruduğu düşünülmektedir. Tüm genotiplerde 31 günlük kontrol gruplarının (K₂) MDA içeriğinde 12 günlük kontrol gruplarına (K₀) göre yaşa bağlı artış gözlenmiştir. 4°C uygulamaları için uyumlandırılmayan gruplarda uyumlandırılan gruplara göre Gökçe ve AkN 290'da MDA içeriğinin önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, Nayyar vd. (2005a) nohut fidelerinde zarlardaki oksidatif hasarı gösteren MDA içeriğinin uyum periyotsuz gruplarda uyum periyotlu olanlara göre çok daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. 2°C uygulamaları 4°C'ye göre, tüm genotiplerde, soğuk stresinin şiddetinin artmasına bağlı olarak, hem uyum periyotlu hem de uyum periyotsuz gruplarında kendi kontrollerine göre MDA konsantrasyonunda artışa neden belirlenmiştir. Özellikle AkN 290'da şiddetli soğuk stresinde oksidatif

hasarın yol açtığı zar bütünlüğündeki bozulma ve lipid peroksidasyonu ile ilişkili MDA artışının (%152.4), diğer genotiplerden daha fazla olması bu hattın yapraklarındaki antioksidant enzim aktivitelerinin de daha düşük olmasıyla desteklenmektedir. Buna karşılık Gökçe'nin yaprak dokularındaki MDA içeriğindeki artışın (%67.6) daha düşük, fotosentetik aktivitenin ve antioksidant savunma cevabının ise daha iyi olması bu çeşidin soğuk dayanıklılığının bir göstergesi olabilir.

Bitkiler hem yüksek hem de düşük sıcaklıklara maruz kaldıklarında, klorofil biyosentezi ve kloroplast gelişimi etkilenmektedir. Klorofil biyosentezinin inhibe olması sıcaklık stresleri yüzünden zarar gören plastidlerde belirlenmiş ilk olaylardan biridir (Tewari and Tripathy, 1999; Mohanty et al., 2006). Çalışmadaki tüm genotiplerde, klorofil *a* ve *b* miktarlarının uygulanan tüm soğuk streslerine ayrı ayrı verdikleri cevapların benzer olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2), bu nedenle klorofil *a* ve *b* miktarları toplam klorofil miktarı üzerinden tartışılmıştır. Tüm genotiplerde, 31 günlük kontrol gruplarında yaşa bağlı toplam klorofil içeriğinde azalma belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Ayrıca, uyumlandırma sıcaklığı ve süresi sadece AkN 290'da toplam klorofil miktarında önemli düzeyde azalmaya neden olmuştur, bu uygulama için lipid peroksidasyonunun ve klorofil floresans parametrelerinin AkN 290'da değişmediği göz önüne alınırsa; klorofil miktarının, klorofil sentezinin azalması ve/veya mevcut klorofillerin bozulması sonucu azalmış olabileceği düşünülmektedir. Benzer olarak, Mohanty vd. (2006) azalan klorofil içeriğinin, azalan klorofil sentezine ve/veya klorofilin daha hızlı bozulmasına bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Gökçe'de tüm 4°C uygulamalarında ve AkN 290'da sadece uyumlandırılan 4°C gruplarındaki toplam klorofil miktarındaki azalışın aynı yaştaki kontrollerine göre önemli olduğu belirlenmiştir. Düşük sıcaklıklarda mısır kloroplastlarında gelişim bozukluklarının meydana geldiği (Robertson et al., 1993) ve klorofil içeriğinin azaldığı bildirilmiştir (Haldimann, 1997; Kościelniak et al., 2005). Tüm genotiplerde, 2°C uygulamalarının 4°C uygulamalarına göre toplam klorofil miktarını azaltmada daha etkili olduğu ve artan MDA miktarı ve azalan fotosentetik kapasitenin bu bulguları desteklediği görülmüştür. Bu etkilerin özellikle AkN 290'da çok belirgin olduğu görülmüştür. Düşük sıcaklıklara cevap olarak fotosentetik pigmentlerin azalmasının fotosentetik zarların bozulmasına bağlı olduğu Mostafa ve Hassan (2006) tarafından da bildirilmiştir.

Bitkilerde karotenoidler, ışık toplayıcı anten pigmentleri ve serbest radikal uzaklaştırıcı pigmentler olarak ışık-koruyucu mekanizmada görev alırlar (Tracewell et al., 2001; Lefsrud et al., 2007). Karotenoidlerin fotosentezin fotoinhibisyonuna karşı üstlendikleri koruyucu görev, anten sisteminde absorblanan radyal enerjinin bir kısmının ısı olarak dağılımını arttırmak olarak bildirilmiştir (Kościelniak et al., 2005). Araştırmada, çeşitlerdeki karotenoid içeriklerinin tüm uygulamalarda hatlardakinden daha fazla olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Buna ek olarak, tüm genotiplerde tüm uygulamalarda karotenoid içeriğinde bir artış saptanmış, fakat bu etki sadece Canitez ve AkN 87 genotiplerinin uyum periyotsuz uygulanan 2°C'de aynı yaştaki kontrollerine göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.2). Optimum büyüme gelişme sıcaklıklarının altındaki sıcaklıklarda yetişen mısır yapraklarındaki karotenoid içeriğinin önemli oranda arttığı ve bu sonuçların klorofil fluoresansındaki değişimlerden kolayca saptanabildiği bildirilmiştir (Leipner et al., 1997; 1999). Bununla beraber, bu araştırmada doğrudan uygulanan 2°C düşük sıcaklıkta, çeşitlerdeki karotenoid birikiminin ve ışık enerjisinin fotokimyasal olmayan kullanımının bir ölçütü olan NPQ değerinin hatlardan daha fazla olması nedeniyle, karotenoidlerin eksitasyon enerjisinin ısı olarak yayılmasında koruyucu rol oynadıkları düşünülebilir. Düşük sıcaklıkta buğday yapraklarındaki karotenoid içeriğinin %25-50 arttığı ve düşük sıcaklığa adaptasyonda antioksidant cevabı kapsayabileceği bildirilmiştir (Keleş and Öncel, 2002).

Antosiyaninler yaprak dokularında ışığı yansıtıp klorofil pigmentlerini maskeleyerek fotoinhibisyonu ve klorofil beyazlamasını azaltmaktadır (Farrant, 2000; Johnston et al., 2007). Antosiyaninin 400 ile 600 nm arasındaki ışığı absorbe etmesi, antosiyaninlerin kloroplastlar için uygun ışığı ayarlayarak; klorofil-koruyucu (Neill and Gould, 1999; Close and Beadle, 2005), UV-koruyucu (Burger and Edwards, 1996; Jayakumar et al., 1999) ve antioksidant (Yamasaki et al., 1996; Wang et al., 1997a), olarak fonksiyon gösterdikleri bildirilmiştir. Araştırmada, 31 günlük kontrol gruplarında yaşa bağlı antosiyanin artışı sadece hatlarda belirlenmiştir. 4°C uygulamalarında uyumlanan grupların tümünde ve uyumlanmayan gruplardan Canitez ve AkN 87'de aynı yaştaki kontrollerine göre antosiyanin içeriğindeki artış önemli bulunmuştur (Çizelge 4.2). Benzer olarak, Solecka vd. (1999) düşük sıcaklık uygulamasının kışlık kolza bitkisi yapraklarında antosiyanin birikimine neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, çeşitli bitki türlerinde düşük sıcaklığın

antosiyenin seviyesini ve antosiyenin biyosentez yolundaki çeşitli yapısal genlerin ifadesini arttırdığı bildirilmiştir (Shaked-Sachray et al., 2002; Dela et al., 2003; Bednar et al., 2005; Islam et al., 2005; Stiles et al., 2007). Bu çalışmada da uygulanan tüm 2°C uygulamaları tüm genotiplerde antosiyenin içeriğini arttırmıştır; ancak bu uygulamalarda artan antosiyenin içeriği klorofil pigmentlerini maskeleyemede yetersiz kalmış olabilir, çünkü genotiplerin fotokimyasal aktivitesi olumsuz etkilenmiştir.

Bitkilerdeki ikincil metabolitlerden olan flavonoidler; cezbedici olarak tozlaşmada ve hücre duvarının katılaşmasında görev almalarının yanı sıra, predatörlere, patojenlere ve abiyotik stres koşullarına karşı savunmada da biyoaktif rollere sahiptirler (Winkel-Shirley, 2002; Dixon et al., 2005; Koes et al., 2005; Taylor and Grotewold, 2005; Murakami et al., 2007; Niemi et al., 2007). Çeşitli çevresel streslere maruz bırakılan dokulardaki flavonoidlerin; etkin olarak çiftleşmemiş elektronları yakalama yetenekleri ile (Yokozawa et al., 1998; Tattini et al., 2004) ve/veya serbest radikallerin oluşumunu inhibe ederek (Brown et al., 1998) serbest radikalleri uzaklaştırdığı (Nagai et al., 2005; Agati et al., 2007) ve böylece antioksidant olarak rol oynadıkları çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (Schoch et al., 2001; Agati et al., 2002; Babu et al., 2003; Pearse et al., 2005). Çalışmada, hem uyum hem de tüm 4°C ve 2°C sıcaklık uygulamaları bütün genotiplerde aynı yaştaki kontrollerine göre flavonoid miktarında artışa neden olmuştur (Çizelge 4.2). Özellikle Gökçe'de uyumlandırma ve uyum periyotlu uygulanan düşük sıcaklık süreçlerinde SOD ve POD enzim aktivitesinin önemli düzeyde arttığı göz önüne alınırsa, flavonoidlerin süperoksit ve H₂O₂ radikallerini ortadan kaldırmada SOD ve POD enzimlerine yardımcı olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.9).

Yüksek organizasyonlu bitkilerde yaygın olarak bulunan prolin amino asidi, genellikle çevresel streslere cevapta büyük miktarlarda biriktirilerek osmotik- (Paleg et al., 1984; Nayyar et al., 2005a), zar bütünlüğü- (Bandurska, 2001) ve enzim- (Öztürk and Demir, 2002; Sharma and Dubey, 2005) koruyucu ve reaktif oksijen türlerini uzaklaştırıcı (Alia et al., 2001) olarak rol oynamaktadır. Soğuk stresinin çeşitli bitkilerde prolin miktarını arttırdığı birçok çalışma ile bildirilmiştir (Ruiz et al., 2002; Atıcı et al., 2003; Hsu et al., 2003; Kavi Kishore et al., 2005; Nayyar et al., 2005a; Ashraf and Foolad, 2007). Araştırmada, uygulanan uyum sıcaklığı ve süresinde tüm genotiplerde serbest prolin içeriğinde belirlenen önemli

düzeydeki artış (Şekil 4.8) dokularda suyun muhafaza edilmesinde yeterli olurken, düşük sıcaklık derecesinin düşmesiyle beraber nisbi su içeriklerinin giderek azalması prolin birikimini daha da arttırmıştır. 4°C ve 2°C uygulamalarında bütün genotiplerde aynı yaştaki kontrollerine göre serbest prolin içeriğinde artış belirlenmiş ve uyumlandırılan gruplardaki serbest prolin artışının uyumlandırılmayan gruplardakinden daha fazla olduğu bulunmuştur. Benzer olarak, Nayyar vd. (2005a) nohut fidelerindeki serbest prolin miktarının uyum periyotlu gruplarda uyum periyotsuz olanlara göre çok daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Düşük sıcaklık sırasında; solunum ve fotosentetik elektron taşıma sistemlerinin aşırı eksitasyonuna bağlı olarak ROS konsantrasyonları artabilmektedir (Janda et al., 2003). Bitkiler düşük sıcaklıkla indüklenen oksidatif hasarı azaltmak ya da hasardan korunmak için, antioksidant bileşikler (askorbat, glutatyon, α -tokoferol vb.) ve antioksidant enzimler (SOD, CAT, APX, GR ve POD gibi) gibi savunma sistemleri aracılığıyla toksik ve reaktif oksijen türlerini uzaklaştırırlar (Yang et al., 2001; Atıcı and Nalbantoğlu, 2003; Kang et al., 2003; Sundar et al., 2004; Posmyk et al., 2005; Baek and Skinner, 2006; Taşgın et al., 2006). Bitkilerde soğuk dayanıklılığını geliştirmek için kullanılan işlevlerden biri de soğuk uyumudur, bu işlem belirli bir süre için soğuk duyarlı dokuların soğuk derecelerinden biraz yüksek sıcaklıklara maruz kalmasıyla, belirli bitkilerde düşük sıcaklık dayanıklılığının artması olayıdır (Schoner and Krause, 1990; Pennycooke et al., 2005). Çalışmada uyum sıcaklığı ve süresi SOD ve APX enzimlerinde tüm genotiplerde (Şekil 4.9; 4.10), GR enziminde Canitez ve AkN 290'da (Şekil 4.11) ve POD enziminde AkN 87 hariç tüm genotiplerde (Şekil 4.12) aynı yaştaki kontrolüne göre önemli aktivite artışı belirlenmiştir. Bu durum, uyumun antioksidant enzimlerin aktivitelerinin artışını teşvik ettiğinin bir göstergesi olabilir. Anderson vd. (1995) mısırdaki uyumlandırılmayan fidelerde soğuk hasarının kısmen ROS oluşumuna bağlı olduğunu, uyum periyotlu fidelerdeki soğuk dayanıklılığının ise ROS'ların birikimini engelleyen antioksidant sistemlerin artmasına bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

SOD, bitkilerdeki en önemli antioksidant enzim sistemlerinden biri olup, stres koşulları altında toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüşümünü katalizleyen metalloenzimlerdir (Miyake and Yakota, 2000;

Baek and Skinner, 2006). SOD, ROS'lara karşı hücrel savunmada anahtar enzim olarak görev alır ve Haber-Weiss reaksiyonu yolu ile süperoksitin hidroksil radikaline dönüşüm riskini azaltır (Apel and Hirt, 2004). Araştırmada, 4°C ve 2°C'nin uyum periyotlu gruplarında aynı yaştaki kontrollerine göre meydana gelen SOD aktivitesi artışının tüm genotiplerde önemli olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9). Özellikle Gökçe'de uyumlanmış 4°C ve 2°C düşük sıcaklık uygulamalarındaki SOD aktiviteleri kontrollerin sırasıyla 15.5 ve 8.4 katına çıkmıştır. Bununla beraber, 4°C ve 2°C'nin uyum periyotsuz gruplarında SOD aktivite artışı sadece Gökçe'de önemli hale gelmiştir, bu durum, ani sıcaklık düşüşlerinde Gökçe'de süperoksit radikalini uzaklaştırma yeteneğinin devam ettirilebildiğini göstermektedir. Soğuğa duyarlı olduğu bilinen salatalık ve pirinç bitkilerinde de uygulanan düşük sıcaklığın yapraklardaki toplam SOD aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Lee and Lee, 2000; Guo et al., 2006). Gökçe dışındaki genotiplerde özellikle 2°C'nin uyum periyotsuz gruplarında MDA içeriğinin yüksek olması (Şekil 4.7), SOD aktivitesindeki azalma nedeniyle biriken süperoksitin lipid perosidasyonuna yol açmasından kaynaklanmış olabilir.

SOD aracılığıyla katalizlenen reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 'nin detoksifikasyonu sağlayan enzimlerden biri olan APX, askorbatı yükseltgeyerek hidrojen peroksit uzaklaştırma metabolik yolunun ilk basamağını katalizler (Mano, 2002). APX'in aktivitesi, NAD(P)H'i elektron verici olarak kullanan glutatyon redüktaz (GR), dehidro askorbat redüktaz (DHAR) ve monodehidro askorbat redüktaz gibi enzimlerce sağlanan indirgenmiş askorbat ve glutatyonun ortamda hazır bulunmasına bağlıdır (Sundar et al., 2004). Çalışmada, tüm 4°C ve 2°C uygulamalarında tüm genotiplerde uyumlandırılmayan grupların uyumlandırılanlara göre APX aktivitelerinde azalma belirlenmiştir, bu durum APX enzimi için uyumlandırılmanın gerekli olduğunun göstergesi olabilir (Şekil 4.10). Ayrıca uyumlandırılan grupların tümünde soğuk şiddetinin artmasına bağlı olarak APX aktivitesinde azalma belirlenmiştir. Jahnke vd. (1991) azalan sıcaklıkla birlikte mısır bitkisi yapraklarındaki APX aktivitesinin de azaldığını belirlemişlerdir. Her ne kadar H_2O_2 APX'in fizyolojik substratlarından biri olsa da, H_2O_2 'nin eşik değeri üzerinde bulunması protein oksidasyonuna neden olarak enzimin aktivitesini doğrudan inhibe etmektedir (Hiner et al., 2000; Pinto et al., 2006). AkN 290 hattının tüm 4°C ve 2°C uygulamalarında diğer genotiplere göre APX aktivitesinin

daha düşük olduğu belirlenmiş, ancak H₂O₂'nin detoksifikasyonunda yer alan diğer bir enzim olan POD aktivitesinin bu genotipte özellikle uyumlandırılan gruplardaki artışı yine bu gruplarda artan SOD aktivitesi (Şekil 4.9) nedeniyle oluşan H₂O₂'nin APX yerine POD enzimi (Şekil 4.12) ile ortamdan uzaklaştırıldığını göstermektedir. APX hidrojen peroksit konsantrasyonunu kontrol altında tutmak için diğer enzimlerle birlikte çalışmaktadır (Gelhaye et al., 2006).

Askorbat-glutasyon döngüsünün son enzimi olan GR, okside glutasyonu NADPH yardımıyla indirgeyen (Asada, 1999) ve böylece askorbatın rejenerasyonu için gerekli yüksek GSH/GSSG oranının sürdürülmesini sağlayan bir enzimdir (Bray et al., 2000; Sumithra et al., 2006). Araştırmada, tüm 4°C ve 2°C uygulamalarının uyum periyotlu gruplarında AkN 87 hariç diğer genotiplerde aynı yaştaki kontrollerine göre GR aktivitesinde artış belirlenmiştir (Şekil 4.11). Düşük sıcaklıklarda toplam GR aktivitesindeki artış, düşük sıcaklık stresi ya da soğuk uyumu sırasında daha yüksek aktiviteye sahip yeni GR izoenzimlerinin ortaya çıkmasının sonucu olabilir (Kocsy et al., 2001). GR'nin yüksek seviyeleri NADP⁺/NADPH oranını artırabilir, böylece fotosentetik elektron zincirinden elektron alan NADP⁺'nin rejenerasyonunu sağlar (Sundar et al., 2004). Ayrıca APX'de olduğu gibi tüm 4°C ve 2°C uygulamalarında tüm genotiplerde uyumlandırılmayan grupların uyumlandırılanlara göre GR aktivitelerinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Uyum periyotsuz 4°C'ye maruz bırakılanlardan sadece AkN 87'de ve 2°C'ye maruz bırakılanlardan ise sadece hatlarda aynı yaştaki kontrollerine göre GR aktivitesi daha düşüktür. Bu durum hatların askorbat havuzunu indirgenmiş olarak tutmada çeşitlere göre daha başarısız olduğunun göstergesi olabilir. Buğday fidelerine uygulanan düşük sıcaklığın (5/-5°C gündüz/gece) GR aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Keleş and Öncel, 2002). Bununla beraber, üç hafta boyunca uygulanan 5°C'nin, soya fasulyesi yapraklarındaki GR aktivitesi üzerine etkisi olmadığı (Vierheller and Smith, 1990) ve hatta pirincin gövde kültürlerinde GR aktivitesinin azaldığı (Fadzillah et al., 1996) bildirilmiştir.

POD'un bitkilerde lignifikasyon, fenoliklerin oksidasyonu, hücre uzamasının düzenlenmesi, ve oksidatif stres sonucu bitki dokularında meydana gelen H₂O₂ gibi toksik bileşiklerin detoksifikasyonu gibi pek çok işlemlerde yer aldıkları bildirilmektedir (Scebba et al., 1998). Düşük sıcaklık stresi ve soğuk uyumu

sırasında H₂O₂'nin yüksek seviyeleri çoğunlukla düşük sıcaklıklarda düşük CO₂ fiksasyonu yüzünden daha yüksek hızda meydana gelen Mehler reaksiyonu nedeniyle (Prasad et al., 1994; Kocsy et al., 2001). POD, H₂O₂'yi fenolik bileşikler ve/veya antioksidantlar gibi metabolitlerin oksidasyonu aracılığıyla ayrıştırır (Sudhakar et al., 2001; Morsy et al., 2007). Uyumlandırma 4°C için tüm genotiplerde, 2°C için ise AkN 87 dışındaki genotiplerde aynı yaştaki kontrollerine göre POD aktivitelerinde artışa neden olmuştur (Şekil 4.12). Benzer olarak, uygulanan düşük sıcaklıkların buğday (Scebba et al., 1998), salatalık (JinFeng et al., 2005) ve karpuz (Hong et al., 2004), bitkilerinde POD aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Çalışmada, özellikle, Gökçe ve AkN 290'da uyum periyotlu gruplarda POD ve APX'de görülen aktivite artışları H₂O₂'nin enzimatik yıkımında hem Halliwel-Asada metabolik yolunun enzimlerinin hem de POD enziminin görev aldığını göstermektedir. Ancak AkN 290'da, artan POD ve APX aktivitelerinin, MDA içeriğindeki artış ve fotosentetik aktivitedeki düşüşten de görüldüğü gibi muhtemelen, H₂O₂'nin detoksifikasyonu için yeterli olmadığını göstermektedir. Gökçe dışındaki genotiplerde uyumlandırılmayan 4°C gruplarının aynı yaştaki kontrolleri ile karşılaştırıldığında POD aktivitesindeki düşüş önemli bulunmuştur; bu etki uyumlandırılmayan 2°C gruplarında ise tüm genotiplerde belirlenmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sıcaklığın optimum koşulların altına düşmesiyle meydana gelen soğuk stresi, bitkilerde gelişimi engelleyerek verim kayıplarına neden olan en önemli çevresel faktörlerden biridir. Yeryüzünde soğuk stresine maruz kalan tarım alanlarında, özellikle hızla artan nüfusun besin ihtiyacını karşılayabilmek için, soğuğa dayanıklı bitkilerin yetiştirilmesi ve ürün veriminin artırılması gerekmektedir. Ayrıca son yıllarda özellikle insan faaliyetlerine bağlı olarak gerçekleşen küresel ısınma

bitkilerin yüksek sıcaklık ve kuraklık streslerine de maruz kalmasına yol açmakta ve bu nedenle, bu etkilerin daha az olduğu dönemlerdeki ekim için uygun soğuk stresine dayanıklı bitkilerin belirlenmesinde soğuğa karşı dayanıklılığı sağlayan mekanizmaların aydınlatılmasına olan gereksinim artmaktadır.

Dünyada en çok üretilen baklagiller arasında dördüncü sırada yer alan nohut (*Cicer arietinum* L.), hem yüksek bir besin içeriğine sahip olması hem de azot fiksasyonu sayesinde toprağı azotça zenginleştirmesi gibi önemli özellikleri nedeniyle ülkemizde oldukça fazla miktarda yetiştirilmekte ve Türkiye, dünya nohut üretiminde 3. sırada yer almaktadır. Ancak ülkemizde yazlık olarak yetiştirildiğinden, kuraklık ve yüksek sıcaklık streslerine maruz kalmakta ve verimi düşmektedir. Bu streslerden kaynaklanan hasarın giderilmesi nohudun kışlık ekiminin yapılabilmesine ve bu nedenle de soğuğa karşı yüksek uyum ve dayanıklılık yeteneğine sahip olan nohut genotiplerinin karakterizasyonuna bağlıdır.

Nohut çeşit ve hatlarında düşük sıcaklığın büyüme parametreleri üzerine etkisi incelendiğinde, soğuk stresinin tüm genotiplerde büyümeyi olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir (Şekil 6.1). Gövde uzunluğunun, yaprak sayısının ve taze-kuru ağırlığın genotipler arasında en çok Gökçe'de, en az ise AkN 290'da etkilendiği saptanmıştır. Ancak, Gökçe'de fotosentetik verim ile antioksidant savunmada görev alan enzim aktivitelerinin daha fazla, lipid peroksidasyonunun ise daha az miktarda olması, büyümedeki inhibisyonun bu çeşit için soğuğa karşı geliştirilen bir adaptasyon olduğunu düşündürmektedir.

Soğukun dokularda yol açtığı su stresinin bir ölçüsü olan oransal ve gerçek su içeriğinin, genotiplerin hiçbirinde uyum sıcaklığından etkilenmediği, soğuk uygulamalarında ise uyumlandırmanın içsel suyun dokularda tutulmasında etkili olduğu saptanmıştır (Şekil 6.1). Soğuk sırasında çeşitlerin hatlara göre suyu tutma yeteneklerinin daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Nohut genotiplerinin özellikle şiddetli soğuk stresine karşı dayanıklılıklarının karakterizasyonunda, PSII'nin fotokimyasal aktivitesini ölçmek için kullanılan kolay ve güvenilir bir teknik olan klorofil *a* floresans ölçümü ile belirlenen fotosentetik aktivitenin önemli olduğu saptanmıştır (Şekil 6.1). Fotosentetik aktivite

parametreleri bakımından en dayanıklı genotipin Gökçe, en duyarlı genotipin ise AkN 290 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçların MDA içeriğindeki artış ile paralel olması, Gökçe’de özellikle antioksidant enzimlerin düşük sıcaklık stresine karşı geliştirilen etkili bir savunma sistemi olabileceğini göstermektedir. Uyum sıcaklığı hiçbir genotipte fotosentetik aktivitenin olumsuz etkilenmesine neden olmamıştır. Soğuk stresinin genotiplerin yapraklarındaki fotokimyasal aktivite üzerine etkisi dikkate alındığında; genotipler dayanıklıdan duyarlıya doğru Gökçe, Canitez, AkN 87 ve AkN 290 olarak sıralanmaktadır.

Düşük sıcaklık stresinden kaynaklanan oksidatif stresin tüm çeşit ve hatların zarlarında lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve soğuk stresine maruz kalan bitkilerde lipid peroksidasyon ürünü olan MDA içeriğinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 6.1). Ancak uyum sıcaklığında MDA içeriğinin hiçbir genotipte değişmemesi, uygulanan uyum sıcaklığının zar hasarına yol açmadığını göstermektedir. Şiddetli soğuk stresine maruz kalmanın genotipler arasında en az Gökçe’de en fazla ise AkN 290’da MDA birikimine neden olduğu saptanmıştır.

Soğuk uygulamalarının nohut çeşit ve hatlarının toplam klorofil pigmenti içeriğini olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir (Şekil 6.1). Hem uyum sıcaklığı hem de düşük sıcaklık uygulamalarında toplam klorofil miktarındaki en fazla düşüş AkN 290’da meydana gelmiştir. Bu sonuç, şiddetli soğuk uygulamalarında fotosentetik aktivitedeki düşüş ile paralellik göstermektedir. Soğuk stresi uygulamalarında çeşitlerdeki karotenoid içeriklerinin tüm uygulamalarda hatlardakinden daha fazla olduğu belirlenmiştir; ancak bu pigmentlerin genotiplerin kontrollerindeki normal seviyelerine göre benzer oranda artması, bu parametrenin düşük sıcaklığa karşı genotiplerin karakterizasyonunda ayırt edici olmadığını göstermektedir. Özellikle uygulanan soğuk şiddetinin artmasıyla tüm genotiplerin antosiyanin pigmenti içeriğinde benzer artışlar olduğu görülmüştür. Antosiyanin pigmenti gölgeleyici rolüyle klorofilleri strese bağlı hasarlardan korunmak üzere bir tepki olarak artmışsa da, tüm genotiplerde toplam klorofil miktarında görülen azalma bu pigmentin birikiminin yetersiz kaldığını düşündürmektedir. Strese bağlı olarak hücrelerde oluşan serbest radikalleri uzaklaştırarak antioksidant rol oynadıkları ve böylece hücrel savunmaya katkıda buldukları bilinen flavonoidlerin; tüm genotiplerde, düşük sıcaklık uygulamalarında ve uyumda arttığı ancak en fazla artış gösterdiği Gökçe dışındaki genotipler için ayırt edici olmadığı belirlenmiştir.

Soğuk stresinin bir sonucu olarak ortaya çıkan osmotik stresin, tüm çeşit ve hatlarda osmotik koruyuculardan biri olan prolin amino asidi birikimini teşvik ettiği ve bu birikimin özellikle uyum sıcaklığında dokulardaki su içeriğinin korunmasında etkili bir rol oynadığı saptanmıştır (Şekil 6.1). Doğrudan uygulanan 2°C soğuk, hatlardaki prolin birikimini çeşitlere göre daha fazla arttırdığı halde, çeşitlerdeki su içeriklerinin daha yüksek bulunması hatlardaki prolin artışının içsel suyu korumada çeşitlerdeki kadar etkili olmadığını düşündürmektedir. Şiddetli soğuk uygulamasında genotiplerdeki prolin artışı oranlarının 4 genotipin birbirinden ayrılmasında ayırt edici bir parametre olarak kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır.

Antioksidant enzim aktivitelerinin düşük sıcaklık stresine bağlı olarak tüm çeşit ve hatların önemli ölçüde değişikliğe uğradığı belirlenmiştir (Şekil 6.2). Uyumlandırma genel olarak genotiplerdeki enzimatik antioksidant savunma sistemlerini aktive etmiş ve en önemli aktivite artışı da SOD enziminde belirlenmiştir. Uyum periyotlu uygulanan soğuk streslerindeki enzim aktivitelerinin uyumlandırılmayanlara göre daha yüksek olması, uyumlandırmanın genotiplerin antioksidant sisteme dayalı savunmasında gerekli olduğunu düşündürmektedir. Gökçe'deki SOD aktivitesi dışında, tüm genotiplerde uyum periyotsuz uygulanan soğuktan kaynaklanan oksidatif strese karşı muhtemelen yeterli bir ROS giderme kapasitesinin bulunmadığı özellikle 2°C'deki MDA artışlarında da görülmüştür. Gökçe'nin oksidatif stresten korunmada diğer genotiplere göre daha başarılı olduğu belirlenmiştir.

Düşük sıcaklığın nohut yetiştiriciliğinde oldukça önemli bir stres faktörü olması, soğuğa karşı dayanıklı ve/veya uyum yapabilecek nohut genotiplerinin belirlenmesini zorunlu kıldığından bu araştırmanın bu alandaki çalışmalara bir ölçüde katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

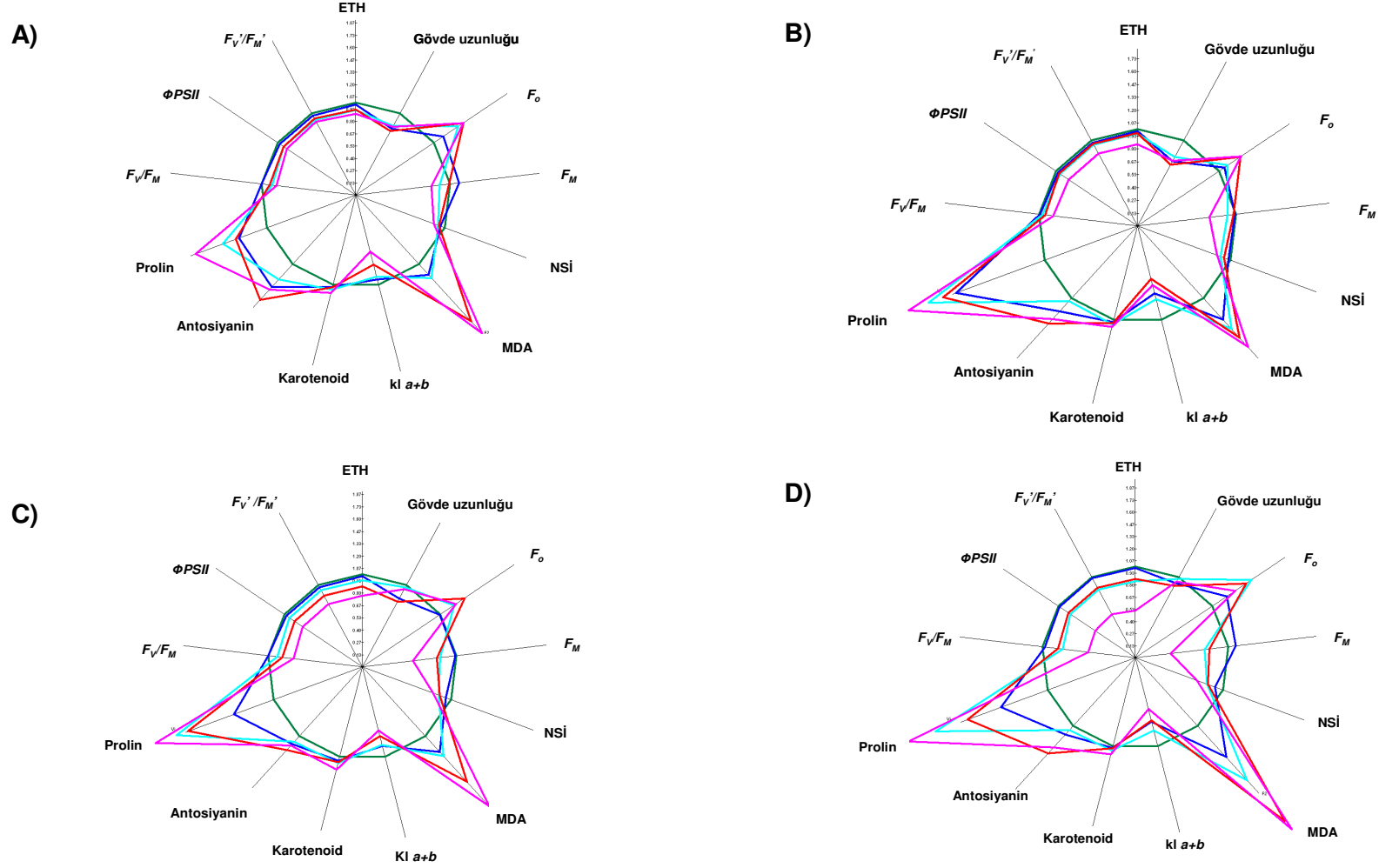
Nohut, soğuğa duyarlı bir baklagil olmasına rağmen; bu araştırma sonuçları incelendiğinde, 4°C sıcaklık tüm parametreler için genotiplerin karakterizasyonunda yeterli olmadığından nohutta soğuk stresi çalışmaları için 2°C ve altındaki sıcaklıkların tercih edildiği araştırmalara ağırlık verilmelidir. Ayırt edici parametreler göz önüne alındığında; çeşitler arasında Gökçe'nin Canitez'e oranla, hatlar arasında ise AkN 87'nin AkN 290'a oranla soğuk stresine karşı daha

dayanıklı olduğu söylenebilir. Araştırma bulgularına göre, hatlardan AkN 87'nin soğuğa dayanıklı çeşit olarak geliştirilme potansiyelinde olduğu düşünölmektedir. Bu amaçla daha kapsamlı araştırmalar yapılmalıdır.

Nohudun soğuğa karşı oluşturduğu cevaplarda birçok fizyolojik karakter rol oynamaktadır. Düşük sıcaklık koşullarına dayanıklı nohut genotiplerinin geliştirilmesinde seçim kriteri olarak bu araştırmadaki ayırt edici parametre olan klorofil a floresans tekniğinin kullanıldığı çalışmalara ağırlık verilmelidir.

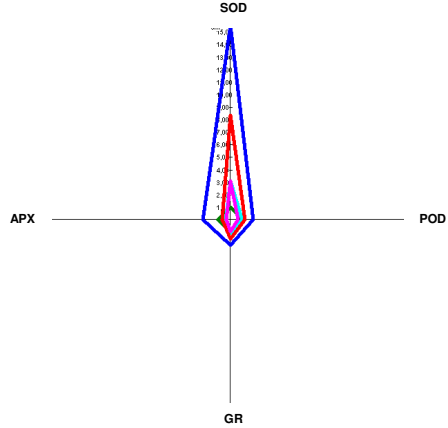
Ölkemizde nohut bitkisinin güzlük ekiminin yapılabilmesi ve böylece ürün veriminin arttırılabilmesi için bu dönemde sıkça maruz kalabileceği biyotik streslerden antraknoza ve abiyotik streslerden soğuğa dayanıklı çeşit ve hatların belirlenip geliştirilmesi için daha fazla genotip (çeşit ve özellikle hatlar)'in taranmasına gereksinim vardır.

Soğuğa dayanıklılığı sağlayan genlerin ifadesindeki değişikliklerin temel mekanizmalarının aydınlatılması, soğukla indüklenen genler için sinyalizasyon yollarının ve uyum sırasında meydana gelen değişikliklerin anlaşılmasına yönelik çalışmaların da yapılmasına gereksinim vardır.

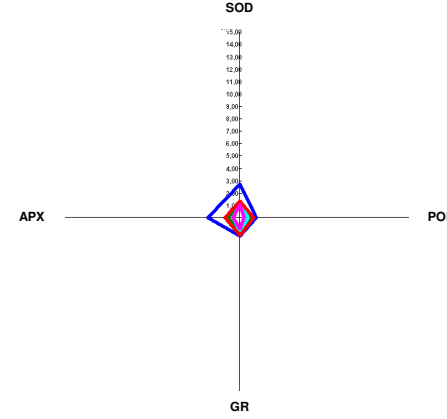


Şekil 6.1. Farklı düşük sıcaklık uygulamalarında, nohut çeşit ve hatlarında belirlenen bazı fizyolojik ve biyokimyasal parametreler arasındaki etkileşiminin radar-çizimi (Biolyzer HP₃) ile gösterimi
 A) Gökçe, B) Canitez, C) AkN 87, D) AkN 290; Yeşil, kontrol (K₂); koyu mavi, uyum periyotlu 4°C soğuk uygulaması (U+S₁); açık mavi, uyum periyotsuz 4°C soğuk uygulaması (S₁); kırmızı, uyum periyotlu 2°C soğuk uygulaması (U+S₂); pembe, uyum periyotsuz 2°C soğuk uygulaması (S₂).

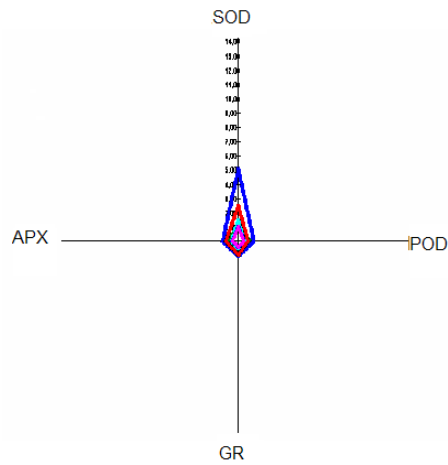
A)



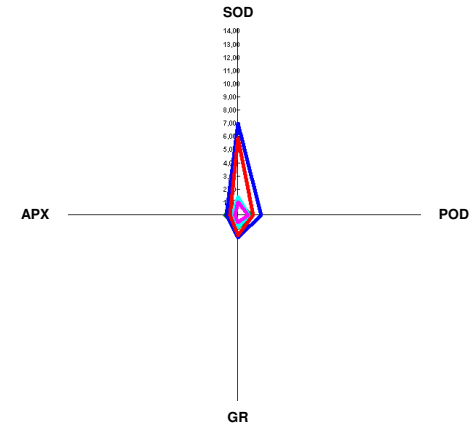
B)



C)



D)



Şekil 6.2. Farklı düşük sıcaklık uygulamalarında, nohut çeşit ve hatlarında belirlenen antioksidant enzim aktiviteleri arasındaki etkileşiminin radar-çizimi (Biolyzer HP₃) ile gösterimi

A) Gökçe, B) Canitez, C) AkN 87, D) AkN 290; Yeşil, kontrol (K₂); koyu mavi, uyum periyotlu 4°C soğuk uygulaması (U+S₁); açık mavi, uyum periyotsuz 4°C soğuk uygulaması (S₁); kırmızı, uyum periyotlu 2°C soğuk uygulaması (U+S₂); pembe, uyum periyotsuz 2°C soğuk uygulaması (S₂).

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agati, G., Galardi, C., Gravano, E., Romani, A., Tattini, M., 2002, Flavonoid distribution in tissues of *Phillyrea latifolia* L. leaves as estimated by microspectrofluorometry and multispectral fluorescence microimaging, *Photochem. Photobiol.*, 76, 350-360.
- Agati, G., Matteini, P., Goti, A., Tattini, M., 2007, Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen, *New Phytol.*, 174, 77-89.
- Ahmad, F., 1999, Random amplified polymorphic DNA (RADP) analysis reveals genetic relationships among the annual *Cicer* species, *Theor. Appl. Genet.*, 98, 657-663.
- Alia, Mohanty, P., Matysik, J., 2001, Effect of proline on the production of singlet oxygen, *Amino Acids*, 21, 195-200.
- Allen, D.J. and Ort, D.R., 2001, Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants, *Trends Plant Sci.*, 6, 36-42.
- Allen, R.D., 1995, Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants, *Plant Physiol.*, 107, 1049-1054.
- Alscher, R.G., Donahue, J.L., Cramer, C., 1997, Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells, *Physiol. Plantarum*, 100, 224-233.
- Anderson, M.D., Prasad, T.K., Stewart, C.R., 1995, Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings, *Plant Physiol.*, 109, 1247-1257.
- Anonymous, 2006, last updated 24 April 2006, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Statistical Databases, <http://www.fao.org>.
- Apel, K. and Hirt, H., 2004, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Aroca, R., Tognoni, F., Irigoyen, J.J., Sánchez-Díaz, M., Pardossi, A., 2001, Different root low temperature response of two maize genotypes differing in chilling sensitivity, *Plant Physiol. Biochem.*, 39, 1067-1073.
- Aroca, R., Vernieri, P., Irigoyen, J.J., Sánchez-Díaz, M., Tognoni, F., Pardossi, A., 2003, Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (*Zea mays* L.) in avoiding chilling-induced water stress, *Plant Sci.*, 165, 671-679.
- Asada, K., 1999, The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 601-639.
- Ashraf, M. and Foolad, M.R., 2007, Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance, *Environ. Exp. Bot.*, 59, 206-216.

- Atıcı, Ö. and Nalbantoğlu, B., 2003, Antifreeze proteins in higher plants, *Phytochem.*, 64, 1187-1196.
- Atıcı, Ö., Demir, Y., Kocaçalışkan, İ., 2003, Effects of low temperature on winter wheat and cabbage leaves, *Biol. Plantarum*, 46, 603-606.
- Babu, T.S., Akhtar, T.A., Lampi, M.A., Tripuranthakam, S., Dixon, R., Greenber, B.M., 2003, Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemna gibba*: implication of reactive oxygen species as common signals, *Plant Cell Physiol.*, 44, 1320-1329.
- Baek, K-H. and Skinner, D.Z., 2006, Differential expression of manganese superoxide dismutase sequence variants in near isogenic lines of wheat during cold acclimation, *Plant Cell Rep.*, 25, 223-230.
- Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., Döme, D., 1996, Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seed as related to deterioration during accelerated aging, *Physiol. Plant.*, 97, 104-110.
- Baker, N.R. and Rosenquist, E., 2004, Applications of chlorophyll fluorescences can improve crop production strategies: an examination of future possibilities, *J. Exp. Bot.*, 55, 1607-1621.
- Bakht, J., Bano, A., Dominy, P., 2006, The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (*Cicer arietinum*) cold tolerans. II. Effects on plasma membrane structure and function, *J. Exp. Bot.*, 57, 3707-3715.
- Ballantyne, J.S., Chamberlin, M.E., 1994, Regulation of cellular amino acid levels, *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, K. Strange (eds), CRC Press, Boca Raton, pp.111-122.
- Bandurska, H., 2001, Does proline accumulated in leaves of water deficit stressed barley plant confine cell membrane injuries? II. Proline accumulation during hardening and its involvement in reducing membrane injuries in leaves subjected to severe osmotic stress, *Acta Physiol. Plant.*, 23, 483-490.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973, Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant Soil*, 39, 205-207.
- Bednar, P., Papouskova, B., Muller, L., Bartak, P., Stavek, J., Pavlousek, P., Lemr, K., 2005, Utilization of capillary electrophoresis/mass spectrometry (CE/MSn) for the study of anthocyanin dyes, *J. Sep. Sci.*, 28, 1291-1299.
- Bergmeyer, H.U., 1974, *Methods of enzymatic analysis*, vol. II, Section C: *Methods for Determination of Enzyme activity*, 2nd Edition, pp. 685-690.
- Bertamini, M., Muthuchelian, K., Rubinigg, M., Zorer, R., Nedunchezian, N., 2005, Photoinhibition of photosynthesis in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling). Effect of chilling nights, *Photosynthetica*, 43 (4), 551-557.

- Bertamini, M., Zulini, L., Muthuchelian, K., Nedunchezian, N., 2007, Low night temperature effects on photosynthetic performance on two grapevine genotypes, *Biol. Plantarum*, 51, 381-385.
- Beyer, W.F. and Fridovich, I., 1987, Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions, *Anal. Biochem.*, 161, 559-566.
- Biemelt, S., Keetman, U., Mock, H.P., Grimm, B., 2000, Expression and activity of isoenzymes of superoxide dismutase in wheat roots in response to hypoxia and anoxia, *Plant Cell Environ.*, 23, 135-144.
- Björkman, O. and Demming, B., 1987, Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plant of diverse origins, *Planta*, 170, 489-504.
- Bois, J.F., Winkel, T., Lhomme, J.P., Raffailac, J.P., Rocheteau, A., 2006, Response os some Andean cultivars of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to temperature: effects on germination, phenology, growth and freezing, *Eur. J. Argon.*, 25, 299-308.
- Bolwell, G.P. and Wojtaszek, P., 1997, Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence-a broad perspective, *Physiol. Mol. Plant P.*, 51, 347-366.
- Borovskii, G.B., Stupnikova, I.V., Antipina, A.I., Anuchina, O.S., Voinikov, V.K., 2005, Association of dehydrins with wheat mitochondria during low-temperature adaptation, *Russ. J. Plant Physiol.*, 52, 194-198.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., 1994, Superoxide dismutase in plants, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 13, 199-218.
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inzé, D., 1992, Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 43, 83-116.
- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Bravo, L.A., Gallardo, J., Olave, N., Martinez, J., Alberdi, M., Close, T.J., Corcuera, L.J., 2003, Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley, *Physiol. Plantarum*, 118, 262-269.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., 2000, Responses to abiotic stresses, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones (eds), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 158-1249.
- Brown, J., Khodr, H., Hider, R.C., Rice-Evans, C.A., 1998, Structural dependence of flavonoid interactions with Cu(II) ions: implications for their antioxidant properties, *Biochem. J.*, 339, 1173-1178.

- Browse, J. and Xin, Z., 2001, Temperature sensing and cold acclimation, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 241-246.
- Burger, J. and Edwards, G.E., 1996, Photosynthetic efficiency and photodamage by UV and visible radiation, in red versus green leaf coleus varieties, *Plant Cell Environ.*, 37, 395-399.
- Burke, J.J. and Oliver, M.J., 1992, Differential temperature sensitivity of pea superoxide dismutase, *Plant Physiol.*, 100, 1595-1598.
- Burton, G.W. and Ingold, K.U., 1984, β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant, *Science*, 224, 569-573.
- Campbell, S.A. and Close, T.J., 1997, Dehydrins: genes, proteins, and association with phenotypic traits, *New Phytol.*, 137, 61-74.
- Cheng, H.Y. and Song, S.Q., 2006, Species and organ diversity in the effect of hydrogen peroxide on superoxide dismutase activity *in vitro*, *Journal of Integrative Plant Biology*, 48 (6), 672-678.
- Cheng, S-H., Willmann, M.R., Chen, H-C., Sheen, J., 2002, Calcium signalling through protein kinases, The Arabidopsis calcium- dependent protein kinase gene family, *Plant Physiol.*, 129, 469-485.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu., J.K., 2006, Gene regulation during cold acclimation in plants, *Physiol. Plantarum*, 126, 52-61.
- Choi, S.M., Jeong, S.W., Jeong, W.J., Kwon, S.Y, Chow, W.S., Park, Y., 2002, Chloroplast Cu/Zn-superoxide dismutase is a highly sensitive site in cucumber leaves chilled in the light, *Planta*, 216, 315-324.
- Clarke, H.J. and Siddique, K.H.M., 2004, Response of chickpea genotypes to low temperature stress during reproductive development, *Field Crop Res.*, 90, 323-334.
- Clarkson, D.T. and Deane-Drummond, C.E., 1983, Thermal adaptation of nitrate transport and assimilation in roots?, *Nitrogen as an Ecological Factor*, Lee, J.A., McNeil, S. And Rorison, I.H., Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 211-224.
- Close, D.C. and Beadle, C.L., 2005, Xanthophyll-cycle dynamics and rapid induction of anthocyanin synthesis in *Eucalyptus nitens* seedlings transferred to photoinhibitory conditions, *J. Plant Physiol.*, 162, 37-46.
- Close, T.J., 1996, Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins, *Physiol. Plantarum*, 97, 795-803.
- Close, T.J., 1997, Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature, *Physiol. Plantarum*, 100, 291-296.
- Conklin, P.I., 2001, Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants, *Plant Cell Environ.*, 24, 383-394.

- Cubero, J.I., 1987, Morphology of chickpea, *The Chickpea*. M.C. Saxena and K.B. Singh (eds.), CAB. International Publ., Wallingford, Oxon, UK, pp. 35-66.
- Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N., Sarhan, F., 1998, Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of plasma membrane during cold acclimation of wheat, *Plant Cell*, 10, 623-638.
- Davidson, J.F., Schiestl, R.H., 2001, Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell Biol.*, 21, 8483-8489.
- de Azevedo Neto, A.D., Prisco, J.T., Enéas-Filho, J., de Abreu, C.E.B., Gomes-Filho, E., 2006, Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes, *Environ. Exp. Bot.*, 56, 87-94.
- De Virville, J.D., Cantrel, C., Bousquet, A.L., Hoffelti, M., Tenreiro, A.M., Pinto, V.V., Arrabaça, J.D., Caiveau, O., Moreau, F., Zachowski, A., 2002, Homeoviscous and functional adaptations of mitochondrial membranes to growth temperature in soybean seedlings, *Plant Cell Environ.*, 25, 1289-1297.
- Dela, G., Or, E., Ovadia, A., Nissim-Levi, A., Weiss, D., Oren-Shamir, M., 2003, Changes in anthocyanin concentration and composition in 'jaguar' rose flowers due to transient high-temperature conditions, *Plant Sci.*, 164, 333-340.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W., III, Logan, B.A., Verhoeven, A.S., 1995, Xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and flexible photosystem II efficiency in plants acclimated to light stress, *Aust. J. Plant Physiol.*, 22, 249-260.
- Demming-Adams, B., Gilmore, A.M., Adams, W.W., 1996, In vivo functions of carotenoids in higher plants, *FASEB J.*, 10, 403-412.
- Dixon, R.A., Xie, D-Y., Sharma, S.B., 2005, Proanthocyanidins-a final frontier in flavonoid research, *New Phytol.*, 165, 9-28.
- Domisch, T., Finér, L., Lehto, T., 2002, Growth, carbohydrate and nutrient allocation of Scots pine seedlings after exposure to simulated low soil temperature in spring, *Plant Soil*, 246, 75-86.
- Dubert, F., Skoczowski, A., Biesaga-Koscielniak, J., 1994, The long-term effect of cold on the metabolism of winter wheat seedlings. I: Growth and hydration of seedlings at in vitro conditions, *J. Therm. Biol.*, 19, 103-110.
- Duke, J.A., 1981, *Handbook of legumes of world economic importance*, Plenum Press, New York, pp. 52-57.
- Ensminger, I., Busch, F., Huner, N.P.A., 2006, Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis, *Physiol. Plantarum*, 126, 28-44.

- Fadzillah, N.M., Gill, V., Finch, R.P., Burdon, R.H., 1996, Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice, *Planta*, 199, 552-556.
- Farrant, J.M., 2000, A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species, *Plant Eco.*, 151, 29-39.
- Fennell, A. and Markhart, A.H., 1998, Rapid acclimation of root hydraulic conductivity to low temperature, *J. Exp. Bot.*, 49, 879-884.
- Flexas, J., Badger, M., Chow, W.S., Medrano, H., Osmond, C.B., 1999, Analysis of the relative increase in photosynthetic O₂ uptake when photosynthesis in grapevine leaves is inhibited following low night temperatures and/or water stress, *Plant Physiol.*, 121, 675-684.
- Fowler, S. and Thomashow, M.F., 2002, Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway, *Plant Cell*, 14, 1675-1690.
- Foyer, C.H. and Noctor, G., 2005, Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in physiological context, *Plant Cell Environ.*, 28, 1056-1071.
- Foyer, C.H., Descourvieres, P., Kunert, K.J., 1994a, Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants, *Plant Cell Environ.*, 17, 507-523.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Galap, C., Kunert, K.J., 1991, Effects of elevated glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions, *Plant Physiol.*, 97, 863-872.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.H., 1994b, Photooxidative stress in plants, *Physiol. Plantarum*, 92, 696-717.
- Foyer, C.H., Vanacker, H., Gomez, L.D., Harbinson, J., 2002, Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures: review, *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 659-668.
- Fracheboud, Y., Haldimann, P., Leipner, J., Stamp, P., 1999, Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.), *J. Exp. Bot.*, 50, 1533-1540.
- Fryer, M.J., 1992, The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α-tocopherol), *Plant Cell Environ.*, 15, 381-392.
- Geervani, P., 1991, Utilization of chickpea in India and scope for novel and alternative uses, *Uses of Tropical Grain Legumes, Proceedings of Consultants' Meeting, 27-30 March, 1989, ICRISAT Center, Patancheru, India*, pp. 47-54.

- Gelhaye, E., Navrot, N., Macdonald, I.K., Rouhier, N., Raven, E.L., Jacquot, J-P., 2006, Ascorbate peroxidase-thioredoxin interaction, *Photosynth. Res.*, 89, 193-200.
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta*, 990, 87–92.
- Genty, B., Harbinson, J., Briantais, J.M., Baker, N.R., 1990, The relationship between non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem 2 photochemistry in leaves, *Photosynth. Res.*, 25, 249-258.
- Georgieva, K. and Lichtenthaler, H.K., 1999, Photosynthetic activity and acclimation ability of pea plants to low and high temperature treatment as studied by means of chlorophyll fluorescence, *J. Plant Physiol.*, 155, 416-423.
- Gilmore, A.M., 1997, Mechanistic aspects of xanthophyll cycle dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves, *Physiol. Plantarum*, 99, 197-209.
- Goulas, E., Le Dily, F., Ozouf, J., Ourry, A., 2003, Effects of cold treatment of the root system on white clover (*Trifolium repens* L.) morphogenesis and nitrogen reserve acculamation, *J. Plant Physiol.*, 160, 893-902.
- Goulas, E., Schubert, M., Kieselbach, T., Kleczkowski, I.A., Gardeström, P., Wolfgang, S., Hurry, V., 2006, The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature, *Plant J.*, 47, 720-734.
- Graham, T.L., 1998, Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in *Arabidopsis*, *Plant Physiol. Biochem.*, 36, 135-144.
- Gray, G.R., Hope, B.J., Qin, X., Taylor, B.G., Whitehead, C.L., 2003, The characterization of photoinhibition and recovery during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* using chlorophyll fluorescence imaging, *Physiol. Plantarum*, 119, 365-375.
- Griffith, M. and McIntyre, H.C.H., 1993, The interrelationship of growth and frost tolerance in winter rye, *Physiol. Plantarum*, 87, 335-344.
- Guo, Z., Ou, W., Lu, S., Zhong, Q., 2006, Differentail responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity, *Plant Physiol. Biochem.*, 44, 828-836.
- Guy, C.L. and Li, Q.B., 1998, The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family, *Plant Cell*, 10, 539-556.
- Hagar, H., Udea, N., Shah, S.V., 1996, Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK1 cells, *Am. J. Physiol.*, 271, F209- F215.

- Haldimann, P., 1997, Chilling-induced changes to carotenoid composition, photosynthesis and the maximum quantum yield of photosystem II photochemistry in two maize genotypes differing in tolerance to low temperature, *J. Plant Physiol.*, 151, 610-619.
- Hara, M., Terashima, S., Kuboi, T., 2001, Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshui*, *J. Plant Physiol.*, 158, 1333-1339.
- Hara, M., Terashima, T.F., Fukaya, T., Kuboi, T., 2003, Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco, *Planta*, 217, 290-298.
- Hare, P.D. and Cress, W.A., 1997, Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants, *Plant Growth Regul.*, 21, 79-102.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J., 1998, Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress, *Plant Cell Environ.*, 21, 535-553.
- Harmon, A.C., Gribskov, M., Harper, J.F., 2000, CDPKs- a kinase for every Ca⁺² signal?, *Trends Plant Sci.*, 5, 154-159.
- Hausladen, A and Alscher, R.G., 1993, Glutathione, Antioxidants in higher plants, Alscher, R.G. and Hess, J.L. (eds), CRC Press, Boca Raton, pp. 1-30.
- Hawtin, G.C. and Singh, K.B., 1984, Prospects and potential of winter sowing of chickpeas in the Mediterranean region, *Ascochyta Blight and Winter Sowing of Chickpeas*, Saxena, M.C. and Singh, K.B. (eds), Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague, pp. 7-16.
- Heino, P. and Palva, E.T., 2003, Signal transduction in plant cold acclimation, *Plant responses to abiotic stress*, Topics Current Genetics, Hirt, H. and Shinozaki, K. (eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 4, 151-186.
- Hernández-Nistal, J., Dopico, B., Labrador, E., 2002, Cold and salt stress regulates the expression and activity of a chickpea cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase, *Plant Sci.*, 163, 507-514.
- Heyen, B.J., Alsheikl, M.K., Smith, E.A., Torvik, C.F., Seals, D.F., Randall, S.K., 2002, The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation, *Plant Physiol.*, 130, 675-687.
- Hiner, A.N., Rodriguez-Lopez, J.N., Arnao, M.B., Lloyd Raven, E., Garcia-Canovas, F., Acosta, M., 2000, Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide, *Biochem. J.*, 348, 321-328.
- Hirotsu, N., Makino, A., Ushio, A., Mae, T., 2004, Changes in the thermal dissipation and the electron flow in the water-water cycle in rice grown under conditions of physiologically low temperature, *Plant Cell Physiol.*, 45, 635-644.

- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buitink, J., 2001, Mechanism of plant desiccation, *Trends Plant Sci.*, 6, 431-438.
- Hogewoning, S.W. and Harbinson, J., 2007, Insights on the development, kinetics, and variation of photoinhibition using chlorophyll fluorescence imaging of a chilled, variegated leaf, *J. Exp. Bot.*, 58, 453-463.
- Holmberg, S.A., 1973, Soybean for cool temperate climates, *Agrihortique Genetica*, 31, 1-20.
- Hong, Z., Ming, W., WenGe, L., ZhiHong, Y., 2004, Effect of cold hardening on SOD, POD activities and on contents of MDA in different ploidy watermelon seedling, *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 24, 578-582.
- Hsu, S.Y., Hsu, Y.T., Kao, C.H., 2003, The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves, *Biol. Plantarum*, 46, 73-78.
- Hu, W.H., Shi, K., Song, X.S., Xia, X.J., Zhou, Y.H., Yu, J.Q., 2006, Different effects of chilling on respiration in leaves and roots of cucumber (*Cucumis sativus*), *Plant Physiol. Biochem.*, 44, 837-843.
- Huang, M. and Guo, Z., 2005, Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity, *Biol. Plantarum*, 49, 81-84.
- Huisman, J. and van der Poel, A.F.B., 1994, Aspects of the nutritional quality and use of cool season food legumes in animal feed, *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes*, F.J. Muehlbauer and W.J. Kaiser (eds.), Kluwer Academic Publ., Netherlands, pp. 53-76.
- Hull, M.R., Long, S.P., Jahnke, L.S., 1997, Instantaneous and developmental effects of low temperature on the catalytic properties of antioxidant enzymes in two *Zea* species, *Aust. J. Plant Physiol.*, 24, 337-343.
- Ishikawa, H.A., 1996, Ultrastructural features of chilling injury: injured cells and the early events during chilling of suspension-cultured mung bean cells, *Am. J. Bot.*, 83, 825-835.
- Islam, M.S., Jalaluddin, M., Garner, J.O., Yoshimoto, M., Yamakawa, O., 2005, Artificial shading and temperature influence on anthocyanin compositions in sweet potato leaves. *Hort. Sci.* 40, 176-180.
- Ivanov, A.G., Sane, P., Król, M., Sveshnikov, D., Huner, N.P.A., Öquist, G., 2003, Low-temperature modulation of redox properties of the acceptor side of photosystem II: photoprotection through reaction center quenching of excess energy, *Physiol. Plantarum*, 119, 376-383.
- Jahnke, L.S., Hull, M.R., Long, S.P., 1991, Chilling stress and oxygen metabolising enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*, *Plant Cell Environ.*, 14, 97-104.

- Janda, T., Szalai, G., Rios-Gonzalez, K., Veisz, O., Páldi, E., 2003, Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals, *Plant Sci.*, 164, 301-306.
- Janssen, L.H.J., Wams, H.W., van Hasselt, P.R., 1992, Temperature dependence of chlorophyll fluorescence induction and photosynthesis in tomato as affected by temperature and light conditions during growth, *J. Plant Physiol.*, 139, 549-554.
- Jayakumar, M., Eyini, M., Selvinthangadurai, P., Lingakumar, K., Premkumar, A., Kulandaivelu, G., 1999, Changes in pigment composition and photosynthetic activity of aquatic fern (*Azolla microphylla* Kaulf.) exposed to low doses of UV-C (254 nm) radiation, *Photosynthesis*, 37, 33-38.
- Jennings, P., Saltveit, M.E., 1994, Temperature and chemical shocks induce chilling tolerance of germinating *Cucumis sativus* (cv. Poinsett 76) seeds, *Physiol. Plant.* 91, 703-707.
- JinFeng, C., Hui, S., XiaoMing, L., MingHui, L., 2005, Changes of SOD, CAT and POD activities in cucumber leaves during cold damage, *Acta Botanica Boreali-Occidentali Sinica*, 25, 1570-1573.
- Johnston, J.W., Harding, K., Benson, E.E., 2007, Antioxidant status and genotypic tolerances of *Ribes* in vitro cultures to cryopreservation, *Plant Sci.*, 172, 524-534.
- Jonak, C., Ligterink, W., Hirt, H., 1999, MAP kinases in plant signal transduction, *Cell Mol. Life Sci.*, 55, 204-213.
- Jones, H.G. and Jones, M.B., 1989, Introduction: some terminology and common mechanisms, *Plants Under Stress*, H.G. Jones, T.J. Flowers, M.B. Jones (eds), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-10.
- Kaiser, W.J., 1992, Epidemiology of *Ascochyta rabiei*, *Disease Resistance Breeding in Chickpea*, K.B. Singh and M.C. Saxena (eds), ICARDA, Aleppo, Syria, pp. 117-134.
- Kang, G., Wang, C., Sun, G., Wang, Z., 2003, Salicylic acid changes activities of H₂O₂-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings, *Environ. Exp. Bot.* 50, 9-15.
- Kaplan, F., Sung, D.Y., Guy, C.L., 2006, Roles of β -amylase and starch breakdown during temperatures stress, *Physiol. Plantarum*, 126, 120-128.
- Kaur, M. and Singh, N., 2007, Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars, *Food Chem.*, 102, 366-374.
- Kaur, M., Singh, N., Sodhi, N.S., 2005, Physicochemical, cooking, textural and roasting characteristics of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars, *J. Food Eng.*, 69, 511-517.

- Kavi Kishore, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N., 2005, Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance, *Curr. Sci.*, 88, 424-438.
- Keleş, Y. and Öncel, I., 2002, Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings, *Plant Sci.*, 163, 783-790.
- Kingston-Smith, A.H., Harbinson, J., Foyer, C.H., 1999, Acclimation of photosynthesis, H₂O₂ content and antioxidants in maize (*Zea mays*) grown at sub-optimal temperatures, *Plant Cell Environ.*, 22, 1071-1083.
- Klimov, S.V., Popov, V.N., Dubinina, I.M., Burakhanova, E.A., Trunova, T.I., 2002, The decreased cold-resistance of chilling-sensitive plants is related to suppressed CO₂ assimilation in leaves and sugar accumulation in roots, *Russ. J. Plant Physiol.*, 49, 776-781.
- Knight, H. and Knight, M.R., 2000, Imaging spatial and cellular characteristic of low temperature calcium signature after cold acclimation in *Arabidopsis*, *J. Exp. Bot.*, 51, 1679-1686.
- Knight, H., Trewavas, A.J., Knight, M.R., 1996, Cold calcium signalling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after cold acclimation, *Plant Cell*, 8, 489-503.
- Kocheva, K., Lambrev, P., Georgiev, G., Goltsev, V., Karabaliev, M., 2004, Evaluation of chlorophyll fluorescence and membrane injury in the leaves of barley cultivars under osmotic stress, *Bioelectrochemistry*, 63, 121–124.
- Kocsy, G., Galiba, G., Brunold, C., 2001, Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants, *Physiol. Plantarum*, 113, 158-164.
- Koes, R., Verweij, W., Quattrocchio, F., 2005, Flavonoids: a colourful model for the regulation and evolution of biochemical pathways, *Trends Plant Sci.*, 10, 236-242.
- Kofidis, G., Bosabalidis, A.M., Moustakas, M., 2007, Combined effects of altitude and season on leaf characteristics of *Clinopodium vulgare* L. (Labiatae), *Environ. Exp. Bot.*, 60, 69-76.
- Kościelniak, J., Janowiak, F., Kurczyk, Z., 2005, Increase in photosynthesis of maize hybrids (*Zea mays* L.) at suboptimal temperature (15°C) by selection of parental lines on the basis of chlorophyll a fluorescence measurements, *Photosynthetica*, 43, 125-134.
- Kratsch, H.A. and Wise, R.R., 2000, The ultrastructure of chilling stress, *Plant Cell Environ.*, 23, 337-350.

- Krebs, J.A., Wu, Y., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Harper, J.F., 2002, Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress, *Plant Physiol.*, 130, 2129-2141.
- Kuk, I.Y., Sin, J.S., Burgos, N.R., Hwang, T.E., Han, O., Cho., B.H., Jung, S., Guh, J.O., 2003, Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants, *Crop Sci.*, 43, 2109-2117.
- Ladizinsky, G., 1975, A new *Cicer* from Turkey, *Notes of the Royal Botanic Edinburgh*, 34, 201-202.
- Ladizinsky, G., Pickersgill, B., Yamamoto, K., 1988, Exploitation of wild relatives of the food legumes. *World Crops: Cool Season Food Legumes*, R.J. Summerfield (eds), Kluwer Academic Publ., Netherlands, pp. 967-978.
- Lee, D.H. and Lee, C.B., 2000, Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays, *Plant Sci.*, 159, 75-85.
- Lefsrud, M.G., Kopsell, D.A., Kopsell, D.E., 2007, Nitrogen levels influence biomass, elemental accumulations, and pigment concentrations in spinach, *J. Plant Nutr.*, 30, 171-185.
- Leipner, J., Fracheboud, Y., Stamp, P., 1997, Acclimation by suboptimal growth temperature diminishes photooxidative damage in maize leaves, *Plant Cell Environ.*, 20, 366-372.
- Leipner, J., Fracheboud, Y., Stamp, P., 1999, Effect of growing season on the photosynthetic apparatus and leaf antioxidative defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance, *Environ. Exp. Bot.*, 42, 129-139.
- Leipner, J., Stamp, P., Fracheboud, Y., 2000, Artificially increased ascorbate content affects zeaxanthin formation but not thermal energy dissipation or degradation of antioxidants during cold-induced photooxidative stress in maize leaves, *Planta*, 210, 964-969.
- Leng, P., Itamura, H., Yamamura, H., Deng, X.M., 2000, Anthocyanin accumulation in apple and peach shoots during cold acclimation, *Scientia Horticulturae*, 83, 43-50.
- Lev-Yadun, S., Gopher, A., Abbo, S., 2000, The cradle of agriculture, *Science*, 288, 1602-1603.
- Li, C., Junttila, O., Heino, P., Palva, E.T., 2003, Different responses of northern and southern ecotypes of *Betula pendula* to exogenous ABA application, *Tree Physiol.*, 23, 481-487.
- Li, C., Puhakainen, T., Welling, A., Viherä-Aarnio, A., Ernstsén, A., Junttila, O., Heino, P., Palva, E.T., 2002, Cold acclimation in silver birch (*Betula pendula*). Development of freezing tolerance in different tissues and climatic ecotypes, *Physiol. Plantarum*, 116, 478-488.

- Lichtenthaler, H.K., 1998, The stress concept in plants: An introduction, *Ann. NY Acad. Sci.*, 851, 187-198.
- Lichtenthaler, H.K., 1987, Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods Enzymol.*, 148, 350-382.
- Lin, K.H., Pai, F.H., Hwang, S.Y., Lo, H.F., 2006, Pre-treating paclobutrazol enhanced chilling tolerance of sweet potato, *Plant Growth Regul.*, 49, 249-262.
- Linger, P. and Brüggemann, W., 1999, Correlations between chlorophyll fluorescence quenching parameters and photosynthesis in a segregating *Lycopersicon esculentum* X *L. peruvianum* population as measured under constant conditions, *Photosynth. Res.*, 61, 145-156.
- Logan, B.A., Korniyev, D., Hardison, J., Holaday, A.S., 2006, The role of antioxidant enzymes in photoprotection, *Photosynth Res.*, 88, 119-132.
- Lone, M.I., Kueh, J.S.H., Wyn Jones, R.G., Bright, S.W.J., 1987, Influence of proline and glycinebetaine on salt tolerance of cultured barley embryos, *J. Exp. Bot.*, 38, 479-490.
- Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S., Grisse, W., 2002, Calmodulins and calcineurin B-like proteins: Calcium sensors for specific signal response coupling in plants, *Plant Cell Suppl.*, S389-S400.
- Ludvig, A.A., Romeis, T., Jones, J.D.G., 2004, CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk, *J. Exp. Bot.*, 55, 181-188.
- Lukatkin, A.S., 2002, Contribution of oxidative stress to the development of cold-induced damage to leaves of chilling-sensitive plants: 2. the activity of antioxidant enzymes during plant chilling, *Russ. J. Plant Physiol.*, 49, 782-788.
- Lundmark, M., Cavaco, A.M., Trevanion, S., Hurry, V., 2006, Carbon partitioning and export in transgenic *Arabidopsis thaliana* with altered capacity for sucrose synthesis grown at low temperature: a role for metabolite transporters, *Plant Cell Environ.*, 29, 1703-1714.
- Lyons, J.M., 1973, Chilling injury in plants, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 24, 445-466.
- Mahajan, S. and Tuteja, N., 2005, Cold, salinity and drought stresses: an overview, *Arch. Biochem. Biophys.*, 444, 139-158.
- Malhotra, R.S., Pundir, R.P.S., Slinkard, A.E., 1987, Genetic resources of chickpea, *The Chickpea*, M.C. Saxena and K.B. Singh (eds), CAB International Publ., Aberystwyth, UK, pp. 67-81.
- Malone, J.G., Mittova, V., Ratcliffe, R.G., Kruger, N.J., 2006, The response of carbohydrate metabolism in potato tubers to low temperature, *Plant Cell Physiol.*, 47, 1309-1322.

- Mancinelli, A.L., Yang, C.P.H., Lindquist, P., Anderson, O.R., Rabino, I., 1975, Photocontrol of anthocyanin synthesis III. The action of streptomycin on the synthesis of chlorophyll and antyocyanin, *Plant Physiol.*, 55, 251-257.
- Mano, J., 2002, Early events in environmental stresses in plants induction mechanisms of oxidative stress, *Oxidative Stress in Plants*, Inze, D. and Montag, M.V. (eds), Taylor and Francis, New York, pp. 217-245.
- Mäntylä, E., Lång, V., Palva, E.T., 1995, Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LTI78 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.*, 107, 141-148.
- Martz, F., Kiviniemi, S., Palva, T.E., Sutinen, M.L., 2006, Contribution of omega-3 fatty acid desaturase and 3-ketoacyl-ACP synthase II (*KASI*) genes in the modulation of glycerolipid fatty acid composition during cold acclimation in birch leaves, *J. Exp. Bot.*, 57, 4, 897-909.
- Mathis, P. and Kleo, J., 1973, The triplet state of β -carotene and analog polyenes of different length, *Photochem. Photobiol.*, 18, 343-346.
- Maxwell, K. and Johnson, G.N., 2000, Chlorophyll fluorescence- a practical guide, *J. Exp. Bot.*, 51, 659-668.
- McKersie, D.B., 1996, Oxidative stress, <http://cropsoil.psu.edu/Courses>.
- Mimuro, M. and Kato, T., 1991, Carotenoids in photosynthesis: absorption, transfer and dissipation of light energy, *Pure Appl. Chem.*, 63, 123-130.
- Mirecki, R.M. and Teramura, A.H., 1984, Effects of ultraviolet-B irradiance on soybean V, The dependence of plant sensitivity on the photosynthetic photon flux density during and after leaf expansion, *Plant Physiol.*, 74, 475-480.
- Mittler, R., 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Sci.*, 7, 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F., 2004, Reactive oxygen gene network of plants, *Trends Plant Sci.*, 9, 490-498.
- Miyake, C. and Yakota, A., 2000, Determination of the rate of photoreduction of O₂ in the water–water cycle in water melon leaves and enhancement of the rate by the limitation of photosynthesis, *Plant Cell. Physiol.*, 41, 335-343.
- Mizoguchi, T., Ichimura, K., Shinozaki, K., 1997, Environmental stress response in plants, The role of mitogen-activated protein kinases, *TIB TECH*, 15, 15-19.
- Mohanty, S., Grimm, B., Tripathy, B.C., 2006, Light and dark modulation of chlorophyll biosynthetic genes in response to temperature, *Planta*, 224, 692-699.

- Møller, I.M., 2001, Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52, 561-591.
- Monroy, A.F. and Dhindsa, R.S., 1995, Low temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25°C, *Plant Cell*, 7, 321-331.
- Monroy, A.F., Labbé, E., Dhindsa, R.S., 1997, Low temperature perception in plants: effects of cold on protein phosphorylation in cell-free extracts, *FEBS Letter*, 410, 206-209.
- Moran, J.F., James, E.K., Rubio, M.C., Sarath, G., Klucas, R.V., Becana, M., 2003, Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules, *Plant Physiol.*, 133, 773-782.
- Morsy, M.R., Jouve, L., Hausman, J-F., Hoffmann, L., Stewart, J.McD., 2007, Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance, *J. Plant Physiol.*, 164, 157-167.
- Mostafa, E.M. and Hassan, A.M.A., 2006, Effect of chilling on growth and nitrogen assimilation in *Azolla caroliniana*, *Biol. Plantarum*, 50, 641-646.
- Muehlbauer, F.J., 1996, Advances in the production of cool season legumes, *Am. J. Alternative Agr.*, 11, 71-76.
- Müller, M., Weidner, W., De Kok, L.J., Tausz, M., 2002, Differential effects of H₂S on cytoplasmic and nuclear thiol concentrations in different tissues of *Brassica* roots, *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 585-589.
- Murakami, S., Takahara, H., Shiraiwa, M., 2007, Purification and characterization of three neutral extracellular isoperoxidases from rye leaves, *Phytochem.*, 68, 777-784.
- Murata, N. and Los, D.A., 1997, Membrane fluidity and temperature perception, *Plant Physiol.*, 115, 875-879.
- Nagai, S., Ohara, K., Mukai, K., 2005, Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in ethanol solution, *J. Phys. Chem. B.*, 109, 4234-4240.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J.P., 2007, Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria, *Physiol. Plantarum*, 129, 185-195.
- Nayyar, H., Bains, T.S., Kumar, S., 2005a, Chilling stressed chickpea: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage, *Environ. Exp. Bot.*, 54, 275-285.

- Nayyar, H., Bains, T.S., Kumar, S., 2005b, Low temperature induced floral abortion in chickpea: relationship to abscisic acid and cryoprotectants in reproductive organs, *Environ. Exp. Bot.*, 53, 39-47.
- Nayyar, H., Kaur, S., Singh, S., Upadhyaya, D.H., 2006, Differential sensitivity of Desi (small-seeded) and Kabuli (large-seeded) chickpea genotypes to water stress during seed filling: effects on accumulation of seed reserves and yield, *J. Sci. Food Agric.*, 86, 2076-2082.
- Neill, S. and Gould, K.S., 1999, Optical properties of leaves in relation to anthocyanin concentration and distribution, *Can. J. Bot.*, 77, 1777-1782.
- Niemi, K., Julkunen-Tiitto, R., Häggman, H., Sarjala, T., 2007, *Suillus variegatus* causes significant changes in content of individual polyamines and flavonoids in Scots pine seedling during mycorrhiza formation *in vitro*, *J. Exp. Bot.*, 58, 391-401.
- Noctor, G. and Foyer, C.H., 1998, Ascorbate and glutathione : keeping active oxygen under control, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49, 249-279.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H., 2002, Interactions between biosynthesis, compartmentation, and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling, *J. Exp. Bot.*, 53, 1283-1304.
- Nordin-Hendriksson, K. and Trewavas, A.J., 2003, The effect of short-term low temperature treatments on gene expression in *Arabidopsis* correlates with changes in intracellular Ca^{2+} levels, *Plant Cell Environ.*, 26, 485-496.
- Nylander, M., Svesson, J., Palva, E.T., Welin, B.V., 2001, Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.*, 45, 263-279.
- O'Kane, D., Gill, V., Boyd, P., Burdon, R., 1996, Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus, *Planta*, 198, 371-377.
- Ohira, S., Morita, N., Suh, H.J., Jung, J., Yamamoto, Y., 2005, Quality control of photosystem II under light stress-turnover of aggregates of the D1 protein *in vivo*, *Photosynth. Res.*, 84, 29-33.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, Y., 1979, Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, 95, 351-358.
- Orvar, B.L., Sangwan, V., Omann, F., Dhindsa, R., 2000, Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity, *Plant J.*, 23, 785-794.
- Osmond, C.B., 1994, What is photoinhibition? Some insights from comparison of shade and sun plants, *Photoinhibition of photosynthesis*, Baker, R.R. and Bowyer, J.R. (eds.), Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford, pp. 1-24.

- Öncel, I., 1984, A study on the relation of cold acclimation and hardness to mineral nutritional and biochemical fluctuations of three agricultural forms of *Brassica oleracea* L., I. Soluble Carbohydrate and Strach Fluctuations, Communications, 2, 13-37.
- Öztürk, L. and Demir, Y., 2002, In vivo and in vitro protective role of proline, Plant Growth Regul., 38, 259-264.
- Paleg, L.G., Stewart, G.R., Bradbeer, J.W., 1984, Proline and glycine-betaine influence on protein salvation, Plant Physiol., 75, 974-978.
- Pasini, L., Bruschini, S., Bertoli, A., Mazza, R., Fracheboud, Y., Marocco, A., 2005, Photosynthetic performance of cold-sensitive mutants of maize at low temperature, Physiol. Plantarum, 124, 362-370.
- Paul, M.J. and Foyer C.H., 2001, Sink regulation of photosynthesis, J. Exp. Bot., 52, 1383-1400.
- Pearce, R.S., 1999, Molecular analysis of acclimation to cold, Plant Growth Regul., 29, 47-76.
- Pearse, I.S., Heath, K.D., Cheeseman, J.M., 2005, Biochemical and ecological characterization of two peroxidase isoenzymes from the mangrove, *Rhizophora mangle*, Plant Cell Environ., 28, 612-622.
- Pennycooke, J.C., Cox, S., Stushnoff, C., 2005, Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia X hybrida*), Environ. Exp. Bot., 53, 225-232.
- Pinto, M.C., Paradiso, A., Leonetti, P., Gara, L.D., 2006, Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death, Plant J., 48, 784-795.
- Plieth, C., Hansen, U.P., Knight, H., Knight, M.R., 1999, Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response, Plant J., 18, 491-497.
- Polisensky, D.H. and Braam, J., 1996, Cold shock regulation of Arabidopsis *TCH* genes and the effects of modulating intracellular calcium levels, Plant Physiol., 111, 1271-1279.
- Posmyk, M.M., Bailly, C., Szafrńska, K., Janas, K.M., Corbineau, F., 2005, Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings, J. Plant Physiol., 162, 403-412.
- Prasad, P.V.V., Boote, K.J., Thomas, J.M.G., Allen Jr, L.H., Gorbet, D.W., 2006, Influence of soil temperature on seedling emergence and early growth of peanut cultivars in field conditions, J. Argon. Crop Sci., 192, 168-177.
- Prasad, T.K., 1997, Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings, Plant Physiol., 114, 1369-1376.

- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., Stewart, C.R., 1994, Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 6, 65-74.
- Provat, N.J., Gil, P., Chen, W., Han, B., Chang, H.S., Wang, X., Zhu, T., 2003, Gene expression phenotypes of *Arabidopsis* associated with sensitivity to low temperatures, *Plant Physiol.*, 132, 893-906.
- Purvis, A.C., Shewfelt, R.L., Gegogaine, J.W., 1995, Superoxide production by mitochondria isolated from green bell pepper fruit, *Physiol. Plantarum*, 94, 743-749.
- Rab, A. and Saltveit, M.E., 1996, Differential chilling sensitivity in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings, *Physiol. Plantarum*, 96, 375-382.
- Ralph, P.J. and Gademann, R., 2005, Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity, *Aquat. Bot.*, 82, 222-237.
- Rao, V.M., Hale, B.A., Omrod, D.P., 1995, Amelioration of ozone induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide, *Plant Physiol.*, 109, 421-432.
- Rinne, P.L.H., Kaikuranta, P.L.M., van der Plas, L.H.W., van der Schoot, C., 1999, Dehydrins in cold-acclimated apices of birch (*Betula pubescent* Ehrh.): production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration, *Planta*, 209, 377-388.
- Robertson, E.J., Baker, N.R., Leech, R.M., 1993, Chloroplast thylakoid protein changes induced by low growth temperature in maize revealed by immunocytology, *Plant Cell Environ.*, 16, 809-818.
- Robertson, M.J., Brooking, I.R., Ritchies, J.T., 1996, Temperature response of vernalization in wheat: Modelling the effect on the final number of main stem leaves, *Annals of Botany*, 78, 371-381.
- Rorat, T., Grygorowicz, W., Irzykowski, P.R., 2004, Expression of KS-type Dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf development stage during vegetative growth, *Planta*, 218, 878-885.
- Rosenqvist, E. and van Kooten, O., 2003, Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature, *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*, DeEll J.R. and Toivonen P.M.A. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, MA, USA, pp. 32-77.
- Ruiz, J.M., Sánchez, E., García, P.C., López-Lefebvre, L.R., Rivero, R.M., Romero, L., 2002, Proline metabolism and NAD kinase activity in greenbean plants subjected to cold-shock, *Phytochem.*, 59, 473-478.
- Rymen, B., Fiorani, F., Kartal, F., Vandepoele, K., Inzé, D., Beemster, G.T.S., 2007, Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes, *Plant Physiol.*, 143, 1429-1438.

- Ryu, S.B., Costa, A., Xin, Z., Li, P.H., 1995, Induction of cold hardiness by salt stress involves synthesis of cold- and abscisic acid-responsive proteins in potato (*Solanum commersonii* Dun), *Plant Cell Physiol.*, 36, 1245-1251.
- Saltveit, M.E. and Morris, L.L., 1990, Overview of chilling injury in horticultural crops, *Chilling Injury of Horticultural Crops*, C.Y. Wang (eds), CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 3-15.
- Sanchez-Ballesta, M.T., Rodrigo, M.J., Lafuente, M.T., Granell, A., Zacarias, L., 2004, Dehydrin from *Citrus*, which confers in vitro dehydration and freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves, *J. Agri. Food Chem.*, 52, 1950-1957.
- Sangwan, V., Foulds, I., Singh, J., Dhindsa, R.S., 2001, Cold-activation of *Brassica napus* BN 115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx, *Plant J.*, 27, 1-12.
- Santarius, K.A., 1992, Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VIII. Differential cryoprotection by sucrose, proline and glycerol, *Physiol. Plantarum*, 84, 87-93.
- Santoro, M.M., Liu, Y., Khan, S.M.A., Hou, L-X., Bolen, D.W., 1992, Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes, *Biochemistry*, 31, 5278-5283.
- Savitch, L.V., Harney, T., Huner, N.P.A., 2000, Sucrose metabolism in spring and winter wheat in response to high irradiance, cold stress and cold acclimation, *Physiol. Plantarum*, 108, 270-278.
- Saxena, M.C., 1984, Agronomic studies on winter chickpeas, Ascochyta Blight and Winter Sowing of Chickpeas, Saxena, M.C. and Singh, K.B. (eds) Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague, pp. 123-139.
- Scandalios, J.G., 1993, Oxygen stress and superoxide dismutases, *Plant Physiol.*, 101, 7-12.
- Scandalios, J.G., 2001, Molecular responses to oxidative stress, *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*, M.J. Hawkesford and P. Buchner (eds), Kluwer Academic Publ., pp. 181-208.
- Scebba, F., Sebastiani, L., Vitagliano, C., 1998, Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation, *Physiol. Plantarum*, 104, 747-752.
- Scebba, F., Sebastiani, L., Vitagliano, C., 1999, Protective enzymes against activated oxygen species in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings: Responses to cold acclimation, *J. Plant Physiol.*, 155, 762-768.
- Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., Werk-Reichert, D., 2001, CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-

- hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway, *J. Biol. Chem.*, 276, 36566-36574.
- Schoner, S. and Krause, G.H., 1990, Protective systems against active oxygen species in spinach: Response to cold acclimation in excess light, *Plant*, 180, 383-389.
- Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C., 1994, Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. *Ecophysiology of Photosynthesis*. Schulze, E.D., Martyn, M., Caldwell, M.M. (eds), Springer-Verlag, Berlin, pp. 49-70.
- Scrase-Field, S. and Knight, M.R., 2003, Calcium; just a chemical switch?, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6, 1-7.
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K., 2001, Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray, *Plant Cell*, 13, 61-72.
- Seppänen, M.M., Fagerstedt, K., 2000, The role of superoxide dismutase activity in response to cold acclimation in potato, *Physiol. Plantarum*, 108, 279-285.
- Sfakianaki, M., Sfichi, L., Kotzabasis, K., 2006, The involvement of LHCII-associated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature, *J. Photoch. Photobio. B*, 84, 181-188.
- Shaked-Sachray, L., Weiss, D., Reuveni, M., Nissim-Levi, A., Oren-Shamir, M., 2002, Increased anthocyanin accumulation in aster flowers at elevated temperatures due to magnesium treatment, *Physiol. Plantarum*, 114, 559-565.
- Sharma, P. and Dubey, R.S., 2005, Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant, *J. Plant Physiol.*, 162, 854-864.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000, Molecular response to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 217-223.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., 2003, Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6, 1-8.
- Simmons, R.S., 1987, Growth, development and Physiology, *Wheat and Wheat improvement*, Heyne, E.G. (eds), American Society of Agronomy, USA, pp. 77-113.
- Singh, K.B., 1987, Chickpea breeding, *The Chickpea*, M.C. Saxena and K.B. Singh (eds.), CAB International Publ., UK, pp. 127-162.

- Singh, K.B., 1997, Chickpea (*Cicer arietinum* L.), Field Crops Res., 53, 161-170.
- Singh, K.B., Malhotra, R.S., Halila, M.H., Knights, E.J., Verma, M.M., 1994, Current status and future strategy in breeding chickpea for resistance to biotic and abiotic stresses, Euphytica, 73, 137-149.
- Ślesak, I., Miszalski, Z., Karpinska, B., Niewiadomska, E., Ratajczak, R., Karpinski, S., 2002, Redox control of oxidative stress responses in the C₃-CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*, Plant Physiol. Biochem., 40, 669-677.
- Smirnoff, N. and Cumbes, Q.J., 1989, Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes, Phytochemistry, 28, 1057-1060.
- Smithson, J.B., Thompson, J.A., Summerfield, R.J., 1985, Chickpea (*Cicer arietinum* L.), Grain Legume Crops, Summerfield, R.J. and Roberts, E.H. (eds), Collins, London, UK, pp. 312-390.
- Snedden, W.A. and Fromm, H., 2001, Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants, New Phytol., 151, 35-66.
- Solecka, D., Boudet, A.M., Kacperska, A., 1999, Phenylpropanoid and anthocyanin changes in low-temperature treated winter oil rape leaves, Plant Physiol. Biochem., 47, 491-496.
- Srinivas, V. and Balasubramanian, D., 1995, Proline is a protein-compatible hydrotrope, Langmuir 11, 2830-2833.
- Stiles, E.A., Cech, N.B., Dee, S.M., Lacey, E.P., 2007, Temperature-sensitive anthocyanin production in flowers of *Plantago lanceolata*, Physiol. Plantarum, 129, 756-765.
- Strand, Å., Hurry, V., Gustafsson, P., Gardeström, 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 J., 12 (3), 605-614.
- Sudhakar, C., Lakshmi, A., Giridarakumar, S., 2001, Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity, Plant Sci., 2001, 161, 613-619.
- Sumithra, K., Jutur, P.P., Carmel, B.D., Reddy, A.R., 2006, Salinity-induced changes in two cultivars of *Vigna radiata*: responses of antioxidative and proline metabolism, Plant Growth Regul., 50, 11-22.
- Sundar, D., Chaitanya, K.V., Jutur, P.P., Reddy, A.R., 2004, Low temperature-induced changes in antioxidative metabolism in rubber-producing shrub, guayule (*Parthenium argentatum* Gray), Plant Growth Regul., 44, 175-181.

- Suzuki, N. and Mittler, R., 2006, Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signalling and destruction, *Physiol. Plantarum*, 126, 45-51.
- Svensson, J., Ismail, A.M., Palva, E.T., Close, T.J., 2002, Dehydrins, Sensing, Signalling and Cell Adaptation, Storey K.B. and Storey J.M. (eds), Elsevier Science B.V., pp. 155-171.
- Szalai, G., Janda, T., Bartók, T., Páldi, E., 1997, Role of light in changes in free amino acid and polyamine contents at chilling temperature in maize (*Zea mays*), *Physiol. Plantarum*, 101, 434-438.
- Szilárd, A., Sass, L., Hideg, E., Vass, I., 2005, Photoinactivation of Photosystem II by flashing light, *Photosynth Res.*, 84, 15-20.
- Tambussi, E.A., Bartoli, G.G., Guiamet, J.J., Beltrano, J., Araus, J.L., 2004, Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves, *Plant Sci.*, 167, 19-26.
- Taşgın, E., Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B., Popova, L.P., 2006, Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves, *Phytochem.*, 67, 710-715.
- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D., Agati, G., 2004, Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress, *New Phytol.*, 163, 547-561.
- Tausz, M., Šircelj, H., Grill, D., 2004, The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid?, *J. Exp. Bot.*, 55, 1955-1962.
- Taylor, L.P. and Grotewold, E., 2005, Flavonoids as developmental regulators, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8, 317-323.
- Tester, M. and Davenport, R., 2003, Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants, *Ann. Bot.*, 91, 503-527.
- Tewari, A.K. and Tripathy, B.C., 1999, Acclimation of chlorophyll biosynthetic reactions to temperature stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.), *Planta*, 208, 431-437.
- Thomashow, M.F., 1999, Plant cold acclimation, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 571-599.
- Timasheff, S.N., 1993, The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes?, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22, 67-97.

- Tracewell, C.A., Vrettos, J.S., Bautista, J.A, Frank, H.A., Brudvig, G.W., 2001, Carotenoid photooxidation in photosystem II, Arch. Biochem. Biophys., 385, 61-69.
- Trewavas, A.J. and Malhó, R., 1997, Signal perception and transduction: The origin of the phenotype, Plant Cell, 9, 1181-1195.
- Uemura, M. and Steponkus, P.L., 1999, Cold acclimation in plants: relation between lipid composition and cryostability of the plasma membrane, J. Plant Res., 112, 245-254.
- Uemura, M., Tominaga, Y., Nakagawara, C., Shigematsu, S., Minami, A., Kawamura, Y., 2006, Responses of the plasma membrane to low temperatures, Physiol. Plantarum, 126, 81-89.
- van der Luit, A.H., Olivari, C., Haley, A., Knight, M.R., Trewavas, A.J., 1999, Distinct calcium signalling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco, Plant Physiol., 121, 705-714.
- van der Maesen, L.J.G., 1972, *Cicer* L. a monograph of the genus with special reference to chickpea (*Cicer arietinum* L.), its ecology and cultivation, Commun. Agric. University, Wageningen, 72-10. 342 p.
- van der Maesen, L.J.G., 1987, *Cicer* L. origin, history and taxonomy of chickpea, The Chickpea, M.C. Saxena and K.B. Singh (eds.), CAB. International Publ., UK., pp. 11-34.
- Van Heerden, P.D.R., Tsimilli-Michael, M., Krüger, G.H.J., Strasser, R.J., 2003, Dark chilling effects on soybean genotypes during vegetative development: parallel studies of CO₂ assimilation, chlorophyll a fluorescence kinetics O-J-I-P and nitrogen fixation, Physiol. Plant., 117, 476-491.
- Venema, J.H., Villerius, L., van Hasselt, P.R., 2000, Effect of acclimation to suboptimal temperature on chilling-induced photo damage: Comparison between a domestic and a high-altitude wild *Lycopersicon* species, Plant Sci., 152, 153-163.
- Vernieri, P., Lenzi, A., Figaro, M., Tognoni, F., Pardossi, A., 2001, How the roots contribute to the ability of *Phaseolus vulgaris* L. to cope with chilling-induced water stress, J. Exp. Bot., 52, 2199-2206.
- Vierheller, T.L. and Smith, I.K., 1990, Effect of chilling glutathione reductase and total glutathione in soybean leaves (*Glycine max* (L.) Merr.), Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants, Rennenberg, H., Brunold, C., de Kok, L.J., Stulen, I. (eds), SPB Academic Publishing bv, The Hague, pp. 261-265.
- Vranová, E., Inzé, D. and Van Breusegem, F., 2002, Signal transduction during oxidative stress, J. Exp. Bot., 53, 1227-1236.

- Wang, H., Cao, G., Prior, R.L., 1997a, Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 304-309.
- Wang, S.Y., Jiao, H. and Faust, M., 1991, Changes in ascorbate, glutathione and related enzyme activity, during thidiazuron-induced bud break of apple, *Plant Physiol.*, 82, 231-236.
- Wang, X., Li, W., Li, M., Welti, R., 2006, profiling lipid changes in plant response to low temperatures, *Physiol. Plantarum*, 126, 90-96.
- Wang, Z., Reddy, V.R., Quebedeaux, B., 1997b, Growth and photosynthetic responses of soybean to short-term cold temperature, *Environ. Exp. Bot.*, 37, 13-24.
- Wanner, L.A. and Junttila, O., 1999, Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 120, 391-399.
- Warren, G.J., 2001, Responses to low temperature and adaptations to freezing, *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*, M.J. Hawkesford and P. Buchner (eds), Kluwer Academic Publ., pp. 209-247.
- Weimberg, R., 1987, Solute adjustments in leaves of two species of wheat at two different stages of growth in response to salinity, *Physiol. Plant.*, 70, 381–388.
- Weng, J.H., Jhaung, L.H., Jiang, J.Y., Lai, G.M., Liao, T.S., 2006, Down-regulation of photosystem 2 efficiency and spectral reflectance in mango leaves under very low irradiance and varied chilling treatments, *Photosynthetica*, 44, 248-254.
- White, P.J., Cooper, H.D., Earnshaw, M.J., Clarkson, D.T., 1990, Effects of low temperature on the development and morphology of rye (*Secale cereale*) and wheat (*Triticum aestivum*), *Annals of Botany*, 66, 559-566.
- Wilkinson, S., Clephan, A.L., Davies, W.J., 2001, Rapid low temperature-induced stomatal closure occurs in cold-tolerant *Commelina communis* leaves but not in cold-sensitive tobacco leaves, via a mechanism that involves apoplastic calcium but not abscisic acid, *Plant Physiol.*, 126, 1566-1578.
- Williamson, J.D., Jennings, D.B., Guo, W., Pharr, D.M., Ehrenshaft, M., 2002, Sugar alcohols, salt stress and fungal resistance: polyols – multifunctional plant protection?, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 127, 467-473.
- Winkel-Shirley, B., 2002, Biosynthesis of flavonoids and effects of stress, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 218-223.
- Winkler, B.S., Orselli, S.M., Tonia, S., 1994, The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiology perspective, *Free Radic. Biol. Med.*, 17, 333-349.

- Wise, R.R., 1995, Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light, *Photosynth. Res.*, 45, 79-97.
- Wisniewski, M., Webb, R., Balsamo, R., Close, T.J., Yu, X.M., Griffith, M., 1999, Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*), *Physiol. Plantarum*, 105, 600-608.
- Xin, Z. and Browse, J., 2000, Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures, *Plant Cell Environ.*, 23, 893-902.
- Xu, Y.N., Wang, Z.N., Jiang, G.Z., Li, L.B., Kuang, T.Y., 2003, Effect of various temperatures on phosphatidylglycerol biosynthesis in thylakoid membranes, *Physiol. Plantarum*, 118, 57-63.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., Ikehara, N., 1997, Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂, *Plant Physiol.*, 115, 1405-1412.
- Yamasaki, H., Uefuji, H., Sakihama, Y., 1996, Bleaching of the red anthocyanin induced by superoxide radical, *Arch. Biochem. Biophys.*, 332, 183-186.
- Yancey, P.H., 1994, Compatible and counteracting solutes, *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, K. Strange (eds), CRC Press, Boca Raton, pp. 81-109.
- Yang, H.M., Zhang, J.H., Zhang, X.Y., 2005b, Regulation mechanisms of stomatal oscillation, *Acta Bot. Sin.*, 47, 1159-1172.
- Yang, M-T., Chen, S-L., Lin, C-Y., Chen, Y-M., 2005a, Chilling stress suppresses chloroplast development and nuclear gene expression in leaves of mung bean seedlings, *Planta*, 221, 374-385.
- Yang, S.J., Hosokawa, M., Mizuta, Y., Yun, J.G., Mano, J., Yazawa, S., 2001, Antioxidant capacity is correlated with susceptibility to leaf spot caused by a rapid temperature drop in *Saintpaulia* (African violet), *Sci. Hort.*, 88, 59-69.
- Yokozawa, T., Chen, C.P., Tanaka, T., Kuono, I., 1998, Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 1919-1921.
- Young, A.J., 1991, The photoprotective role of carotenoids in higher plants, *Physiol. Plantarum*, 83, 702-708.
- Yruela, I., Pueyo, J.J., Alonso, P.J., Picorel, R., 1996, Photoinhibition of photosystem II from higher plants. Effect of copper inhibition, *J. Biol. Chem.*, 271, 27408-27415.

- Yun, J.G., Hayashi, T., Yazawa, S., Katoh, T., Yasuda, Y., 1996, Acute morphological changes of palisade cells of *Saintpaulia* leaves induced by induced by a rapid temperature drop, J. Plant Res., 109, 339-342.
- Zykova, V.V., Kolesnichenko, A.V., Voinikov, V.K., 2002, Involvement of reactive oxygen species in plant mitochondrial response to low-temperature stress, Russ. J. Plant Physiol., 49, 269-276.

EK. ŞEKİLLERİ VERİLEN PARAMETRELERİN TABLO DEĞERLERİ

Çizelge 1. Soğuk uygulamalarının genotiplerin yaprak oransal su içeriği üzerine etkisi

Uygulamalar								
Genotipler	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	73.13±1.50	72.49±1.26	72.84±0.63	72.69±0.21	71.21±0.8	65.17±1.04	67.76±0.45	62.15±0.66
Canitez	66.78±1.44	65.77±0.20	66.32±1.25	66.45±0.51	63.36±0.47	61.59±0.71	62.34±0.76	58.24±1.04
AkN 87	74.85±1.25	74.06±0.50	74.56±0.49	74.70±0.40	70.35±0.73	64.29±0.49	65.15±0.69	59.49±0.73
AkN 290	76.48±0.42	75.27±0.62	76.28±0.77	76.14±0.87	69.23±0.64	62.35±0.52	63.03±0.34	53.44±0.57

AÖF%5= 2.5

Ortalama standart hata \pm olarak verilmiştir. Her bir değer 6 verinin ortalamasıdır (n=6).

Çizelge 2. Soğuk uygulamalarının genotiplerin yaprak gerçek su içeriği üzerine etkisi

Uygulamalar								
Genotipler	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	84.32±0.56	82.68±0.80	83.63±0.46	83.52±0.10	81.44±0.86	75.82±0.40	78.87±0.39	73.40±0.27
Canitez	82.12±0.42	84.16±0.47	82.82±0.60	82.57±0.46	80.03±0.41	78.14±0.52	78.34±0.46	75.97±1.05
AkN 87	84.63±0.65	83.21±1.10	84.64±0.46	84.01±0.50	80.89±0.44	75.51±0.07	77.57±0.53	71.70±0.74
AkN 290	84.75±0.97	83.67±0.76	84.17±0.23	84.28±0.50	78.85±0.11	72.32±0.31	73.77±0.48	69.21±0.55

AÖF%5= 1.8

Ortalama standart hata \pm olarak verilmiştir. Her bir değer 6 verinin ortalamasıdır (n=6).

Çizelge 3. Soğuk uygulamalarının genotiplerin karanlık adapte edilmiş yapraklarındaki minimum fluoresans, F_o üzerine etkisi

Uygulamalar								
Genotipler	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	216.8±3.4	198.2±3.0	197.5±3.3	195.7±3.0	208.8±5.0	216.0±1.4	246.8±5.4	247.7±4.7
Canitez	192.3±4.4	182.7±0.7	177.3±2.3	181.2±4.2	202.7±1.7	237.3±6.9	249.0±4.4	249.7±6.2
AkN 87	198.0±4.5	190.7±1.7	195.0±2.9	200.8±3.0	199.5±4.4	235.7±5.2	262.5±6.3	240.8±4.4
AkN 290	208.0±3.6	206.0±1.7	204.3±2.3	179.0±3.9	212.2±0.8	269.3±5.1	257.8±5.8	232.2±5.1

AÖF%5= 12.93

Ortalama standart hata \pm olarak verilmiştir. Her bir değer 6 verinin ortalamasıdır (n=6).

Çizelge 4. Soğuk uygulamalarının genotiplerin karanlık adapte edilmiş yapraklarındaki maksimum fluoresans, F_M üzerine etkisi

Uygulamalar								
Genotipler	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	1238.2±24	1199.8±32	1151.2±21	1177.5±19	1163.7±30	1075.0±29	1144.3±52	862.2±28
Canitez	1135.2±25	1102.5±10	1080.0±17	1002.2±24	1099.2±29	887.3±29	990.5±27	805.7±38
AkN 87	1111.0±18	1147.8±10	1143.0±21	1117.2±10	1106.5±30	922.2±4	881.8±44	600.2±24
AkN 290	1166.2±12	1131.7±7	1195.0±15	1046.3±23	1128.2±16	779.7±29	831.3±7	399.0±11

AÖF%5= 77.94

Ortalama standart hata \pm olarak verilmiştir. Her bir değer 6 verinin ortalamasıdır (n=6).

Çizelge 5. Soğuk uygulamalarının genotiplerin karanlık adapte edilmiş yapraklarındaki PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliği, F_V/F_M üzerine etkisi

Uygulamalar								
Genotipler	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	0.82±0.01	0.83±0.002	0.83±0.01	0.83±0.003	0.82±0.01	0.80±0.01	0.78±0.01	0.71±0.01
Canitez	0.83±0.003	0.83±0.002	0.84±0.0004	0.82±0.004	0.82±0.01	0.73±0.02	0.75±0.01	0.69±0.01
AkN 87	0.82±0.01	0.83±0.001	0.83±0.002	0.82±0.002	0.82±0.004	0.74±0.005	0.70±0.02	0.60±0.02
AkN 290	0.82±0.004	0.82±0.001	0.83±0.003	0.83±0.005	0.81±0.003	0.65±0.02	0.69±0.01	0.42±0.01

AÖF%5= 0.027

Ortalama standart hata \pm olarak verilmiştir. Her bir değer 6 verinin ortalamasıdır (n=6).

Çizelge 6. Soğuk uygulamalarının genotiplerin ışık adapte edilmiş yapraklarındaki PSII gerçek fotokimyasal etkinliği, Φ_{PSII} üzerine etkisi

Uygulamalar								
Genotipler	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	0.74±0.005	0.77±0.004	0.78±0.01	0.78±0.003	0.76±0.005	0.74±0.01	0.75±0.01	0.66±0.01
Canitez	0.75±0.004	0.78±0.001	0.78±0.001	0.77±0.003	0.75±0.01	0.71±0.01	0.71±0.01	0.68±0.01
AkN 87	0.74±0.004	0.77±0.001	0.77±0.003	0.77±0.003	0.75±0.01	0.72±0.01	0.67±0.02	0.59±0.01
AkN 290	0.74±0.004	0.76±0.001	0.78±0.003	0.77±0.005	0.76±0.003	0.65±0.02	0.67±0.01	0.40±0.02

AÖF%5= 0.04

Ortalama standart hata \pm olarak verilmiştir. Her bir değer 6 verinin ortalamasıdır (n=6).

Çizelge 7. Soğuk uygulamalarının genotiplerin ışık adapte edilmiş yapraklarındaki PSII'nin eksitasyon enerjisini yakalama etkinliği, F_V'/F_M' üzerine etkisi

Uygulamalar								
Genotipler	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	0.74±0.005	0.78±0.002	0.79±0.005	0.79±0.003	0.77±0.004	0.75±0.004	0.76±0.01	0.67±0.01
Canitez	0.75±0.004	0.79±0.001	0.79±0.0002	0.78±0.005	0.76±0.01	0.72±0.01	0.73±0.01	0.70±0.01
AkN 87	0.75±0.003	0.78±0.001	0.79±0.002	0.78±0.001	0.76±0.01	0.73±0.01	0.68±0.02	0.60±0.02
AkN 290	0.74±0.002	0.77±0.002	0.79±0.003	0.78±0.01	0.77±0.003	0.66±0.02	0.68±0.01	0.42±0.02

AÖF%5= 0.029

Ortalama standart hata \pm olarak verilmiştir. Her bir değer 6 verinin ortalamasıdır (n=6).

Çizelge 8. Soğuk uygulamalarının genotiplerin ışık adapte edilmiş yapraklarındaki elektron taşıma hızı, *ETH* üzerine etkisi

Uygulamalar								
Genotipler	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	74.2±0.5	77.7±0.44	78.1±0.57	78.2±0.31	77.0±0.46	74.9±0.52	75.3±0.81	66.1±1.17
Canitez	76.0±0.37	78.5±0.15	78.2±0.09	77.3±0.34	76.0±0.99	71.3±1.51	71.7±1.13	68.2±1.18
AkN 87	74.7±0.36	78.1±0.1	78.0±0.32	77.3±0.28	75.8±1.5	72.5±0.61	67.3±2.16	59.4±1.46
AkN 290	74.8±0.42	77.0±0.14	78.2±0.32	77.6±0.5	76.8±0.34	65.1±2.36	67.3±0.60	40.1±2.01

AÖF%5= 3.05

Ortalama standart hata ± olarak verilmiştir. Her bir değer 6 verinin ortalamasıdır (n=6).

Çizelge 9. Soğuk uygulamalarının genotiplerin yapraklarındaki fotokimyasal kullanım, *qP* üzerine etkisi

Uygulamalar								
Genotipler	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	0.99±0.01	0.99±0.003	0.99±0.001	0.98±0.001	0.99±0.001	0.98±0.002	0.98±0.01	0.98±0.002
Canitez	1±0.01	0.99±0.0003	0.98±0.001	0.98±0.002	0.99±0.002	0.98±0.002	0.97±0.01	0.97±0.002
AkN 87	0.99±0.002	0.99±0.002	0.98±0.001	0.98±0.002	0.99±0.001	0.98±0.002	0.98±0.002	0.98±0.003
AkN 290	1±0.003	0.99±0.001	0.99±0.001	0.98±0.001	0.99±0.001	0.97±0.01	0.98±0.003	0.94±0.01

AÖF%5= 0.01

Ortalama standart hata ± olarak verilmiştir. Her bir değer 6 verinin ortalamasıdır (n=6).

Çizelge 10. Soğuk uygulamalarının genotiplerin yapraklarındaki fotokimyasal olmayan kullanım, *NPQ* üzerine etkisi

Uygulamalar								
Genotipler	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	0.13±0.01	0.13±0.02	0.1±0.01	0.11±0.01	0.1±0.01	0.09±0.01	0.09±0.003	0.21±0.02
Canitez	0.12±0.01	0.1±0.002	0.12±0.003	0.08±0.01	0.12±0.02	0.08±0.01	0.11±0.01	0.2±0.01
AkN 87	0.12±0.01	0.12±0.01	0.12±0.004	0.08±0.003	0.18±0.06	0.11±0.02	0.09±0.01	0.11±0.01
AkN 290	0.12±0.005	0.07±0.004	0.11±0.01	0.1±0.01	0.05±0.003	0.09±0.03	0.08±0.01	0.12±0.04

AÖF%5= 0.058

Ortalama standart hata ± olarak verilmiştir. Her bir değer 6 verinin ortalamasıdır (n=6).

Çizelge 11. Soğuk uygulamalarının genotiplerin yaprak dokularındaki MDA içeriği üzerine etkisi

Uygulamalar								
Genotipler	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	11.16±0.10	13.00±0.33	12.81±0.19	15.97±0.14	20.69±0.25	22.81±0.43	24.76±0.49	26.77±0.45
Canitez	11.29±0.38	12.52±0.10	12.21±0.19	16.97±0.27	19.60±0.21	20.39±0.49	31.03±1.14	34.08±0.68
AkN 87	07.77±0.27	12.81±0.12	12.06±0.28	15.32±0.46	18.85±0.06	19.81±1.12	25.47±0.40	30.97±0.26
AkN 290	10.61±0.29	14.05±0.14	13.71±0.24	14.92±0.11	21.82±0.16	26.90±0.74	35.89±0.79	37.66±0.60

AÖF%5= 1.46

Ortalama standart hata ± olarak verilmiştir. Her bir değer 6 verinin ortalamasıdır (n=6).

Çizelge 12. Soğuk uygulamalarının genotiplerin yaprak dokularındaki prolin içeriği üzerine etkisi

Uygulamalar								
Genotipler	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	0.97±0.03	3.89±0.01	1.58±0.03	2.37±0.07	4.63±0.02	5.33±0.07	4.96±0.09	5.85±0.03
Canitez	2.15±0.01	3.47±0.02	2.59±0.07	2.82±0.04	3.71±0.01	4.22±0.05	3.81±0.05	5.09±0.08
AkN 87	1.82±0.03	3.93±0.03	2.6±0.02	2.91±0.05	4.21±0.01	6.09±0.02	5.72±0.02	6.79±0.04
AkN 290	1.81±0.01	3.56±0.01	2.21±0.03	2.55±0.03	3.92±0.02	5.83±0.06	4.89±0.05	6.61±0.05

AÖF%5= 0.16

Ortalama standart hata ± olarak verilmiştir. Her bir değer 3 verinin ortalamasıdır (n=3).

Çizelge 13. Soğuk uygulamalarının genotiplerin yapraklarındaki toplam SOD aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar								
Genotipler	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	623±18	15411±715	1066±56	2129±288	33029±544	6553±79	17792±838	6620±82
Canitez	464±8	14118±398	2883±669	6143±413	16523±646	7619±187	8029±101	6317±435
AkN 87	754±40	14373±946	973±82	2986±61	15200±417	4437±198	7434±594	3208±63
AkN 290	476±26	7396±270	1069±137	1167±158	8120±272	1633±69	6820±408	1157±43

AÖF%5= 1534.98

Ortalama standart hata ± olarak verilmiştir. Her bir değer 3 verinin ortalamasıdır (n=3).

Çizelge 14. Soğuk uygulamalarının genotiplerin yapraklarındaki toplam APX aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar								
Genotipler	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	136.9±1.2	192.9±2.1	147.6±2.4	194.0±2.4	425.0±4.7	76.8±4.7	125.0±7.1	69.6±3.1
Canitez	46.4±2.1	111.9±6.6	29.8±3.1	96.4±2.1	248.2±1.8	55.4±4.7	116.1±1.8	53.6±5.4
AkN 87	75.0±2.1	132.1±4.1	67.9±4.1	136.9±1.2	182.1±8.2	82.1±3.6	141.1±6.4	66.1±4.7
AkN 290	131.0±3.1	228.6±6.2	75.0±3.6	145.2±3.1	128.6±6.2	62.5±3.6	89.3±3.6	28.6±1.8

AÖF%5= 16.79

Ortalama standart hata ± olarak verilmiştir. Her bir değer 3 verinin ortalamasıdır (n=3).

Çizelge 15. Soğuk uygulamalarının genotiplerin yapraklarındaki toplam GR aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar								
Genotipler	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	33.3±2.2	44.1±1.9	36.6±1.4	35.5±1.9	71.5±2.8	38.7±1.9	54.3±2.8	33.3±1.4
Canitez	36.0±3.9	59.7±0.9	42.5±0.5	44.6±0.5	66.7±2.7	50.0±2.8	64.5±1.6	39.2±1.9
AkN 87	37.6±1.1	48.9±1.9	46.2±2.3	50.5±2.3	54.3±1.9	26.9±1.4	48.9±2.2	22.6±0.9
AkN 290	32.3±1.6	62.9±3.7	42.5±0.5	46.2±1.9	78.0±2.8	44.6±3.8	70.4±1.4	25.3±0.5

AÖF%5= 8.39

Ortalama standart hata ± olarak verilmiştir. Her bir değer 3 verinin ortalamasıdır (n=3).

Çizelge 16. Soğuk uygulamalarının genotiplerin yapraklarındaki toplam POD aktivitesi üzerine etkisi

Genotipler	Uygulamalar							
	Ko	U	K ₁	K ₂	U+S ₁	S ₁	U+S ₂	S ₂
Gökçe	64.6±2.4	178.1±10.2	125.7±10.7	296.0±3.5	532.3±11.9	278.7±3.5	345.9±4.9	186.8±5.7
Canitez	89.4±6.1	183.3±6.6	91.2±2.0	267.0±12.5	347.8±9.6	181.5±3.9	301.1±3.6	92.5±2.6
AkN 87	68.3±4.3	135.2±1.0	138.0±4.5	208.8±10.9	271.0±2.3	120.4±2.1	172.4±6.6	102.3±4.2
AkN 290	105.4±5.8	237.5±2.3	112.5±4.5	208.3±1.5	373.5±2.4	170.0±6.9	241.3±0.6	162.9±3.7

AÖF%5= 23.83

Ortalama standart hata \pm olarak verilmiştir. Her bir değer 3 verinin ortalamasıdır (n=3).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özlem TURAN

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 28.05.1982

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 1993-2000 Süleyman Demirel Anadolu Lisesi-Ankara

Lisans : 2000-2004 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

Yayımlar:

Turan, Ö., Doğru, A., Çiçek, N. and Çakırlar, H., 2004, Response of Winter Rapeseed (*Brassica napus* L. ssp *oleifera*) to Salinity at the Germination Stage, 14th FESPP Congress, 23-27 August Krakow, Poland.

Turan, Ö., Ekmekçi, Y. and Kalefetoğlu, T., 2005, The Effect of Different Osmotic Potential Levels of NaCl on Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Cultivars and Lines at Seedling Stage, II. International Environmental Protection Symposium, Kütahya, Turkey, 8-10 September.