



**TAVUK TÜYÜ PROTEİN HİDROLİZATI
UYGULAMASININ BUĞDAYIN
(*Triticum aestivum* L.) SOĞUK STRESİ
TOLERANSI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ebru GENÇ

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı
Prof. Dr. Ökkeş ATICI
2017**

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TAVUK TÜYÜ PROTEİN HİDROLİZATI UYGULAMASININ
BUĞDAYIN (*Triticum aestivum* L.) SOĞUK STRESİ TOLERANSI
ÜZERİNE ETKİLERİ

Ebru GENÇ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Botanik Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**TAVUK TÜYÜ PROTEİN HİDROLİZATI UYGULAMASININ BUĞDAYIN
(*Triticum aestivum* L.) SOĞUK STRESİ TOLERANSI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Prof. Dr. Ökkeş ATICI'nın danışmanlığında Ebru GENÇ tarafından hazırlanan bu çalışma 30/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Botanik Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği (3./3.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza :

Üye : Doç. Dr. Nevzat ESİM

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özkan AKSAKAL

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 13/07/2017 tarih ve 28/31 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Tubitak 3001 projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:113Z884

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TAVUK TÜYÜ PROTEİN HİDROLİZATI UYGULAMASININ BUĞDAYIN (*Triticum aestivum* L.) SOĞUK STRESİ TOLERANSI ÜZERİNE ETKİLERİ

Ebru GENÇ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Bu çalışmada, tavuk tüyünden elde edilen protein hidrolizatının bitkilerde soğuk stresi toleransı üzerindeki etkileri araştırılmak istenmiştir. Bu amaç için bitki materyali olarak buğdayın (*Triticum aestivum* L.) soğuğa duyarlı (Altındane) ve dirençli (Bezostaya) iki çeşidi kullanılmıştır. Tavuk tüyleri kuvvetli asit ve bazlarla hidrolizasyon, nötralizasyon ve filtrasyon işlemlerine tabi tutulduktan sonra suda çözünabilir Tavuk Tüyü Protein Hidrolizatu (TTH) elde edildi. TTH'nin aminoasit içeriği belirlendikten sonra üç farklı konsantrasyonu (%0.05, 0.075 ve 0.1), kontrollü şartlarda yetiştirilen 11 günlük buğday fidelerinin yapraklarına uygulandı. TTH uygulamasından 6 saat sonra, uygulama yapılan ve yapılmayan (kontrol) fidelerin bir kısmı soğuk şartlara (5/2°C) transfer edildi. Üç gün sonra fideler, fizyolojik ve biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere hasat edildi. Fidelerde öncelikle kök-gövde uzunlukları, yaş-kuru ağırlık ve donma hasarı parametreleri belirlendi. Ayrıca, lipid peroksidasyonu (LPO) ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) seviyeleri, antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve enzimatik olmayan antioksidanların içerikleri incelendi. Bunlara ilave olarak; fidelede protein, klorofil, prolin, şeker miktarları ve Rubisco aktivitesindeki değişimler de değerlendirildi. Bulgularımıza göre, TTH'nin toplam protein verimi %72 idi ve içeriğinde proteinik olan 19 aminoasit belirlendi. Tek başına soğuk uygulaması, her iki çeşitte kök-gövde uzunluğu ve yaş ağırlığı düşürdü, ancak donma hasarını artırdı. Soğuk stresi öncesi uygulanan TTH (TTH+S) ise soğukun bu parametreler üzerindeki olumsuz etkisini hafifleterek kök-gövde uzunlukları ile yaş ağırlığı artırdı ve donma hasarını düşürdü. Kuru ağırlık değişimlerinde ise anlamı sonuçlar elde edilemedi. Soğuk, her iki çeşitte pigment (klorofil ve karotenoid) içeriğini ve Rubisco aktivitesini düşürürken, TTH+S uygulamasında, kontrolüne göre, her iki parametrede artışlar belirlendi. Buna karşılık, soğuk stresi protein, şeker ve prolin içeriklerinde önemli bir artışa neden oldu, ancak TTH+S uygulamasıyla her iki çeşitte prolin içeriği artarken, protein içeriği Altındanede, şeker içeriği Bezostayada arttı. Soğuk, her iki çeşitte ROT'lerden O_2^- ile H_2O_2 içeriğini ve LPO seviyesini artırırken, TTH+S uygulamasıyla bu üç parametrede önemli düşüşler belirlendi. Soğuk, her iki çeşitte glutatyon ve askorbat içeriğini düşürdü ve fenolik içeriği artırdı. TTH+S ise bunu tersine çevirdi. Soğuk stresi, çalışılan çeşitlerde süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerini artırdı, TTH+S ise bu artışları daha fazla yükseltti. Ancak soğuk ile artan katalaz ile peroksidaz aktiviteleri, TTH+S ile önemli seviyede düştü. Soğuk stresiyle olumsuz etkilenen parametrelerin iyileştirilmesinde genelde TTH'nin en etkili konsantrasyonu %0.075 idi. Elde edilen bulgular karşılıklı olarak tartışıldı.

2017, 125 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, buğday, donma hasarı, protein hidrolizatu, Rubisco, soğuk, tavuk tüyü.

ABSTRACT

MS Thesis

EFFECTS OF CHICKEN FEATHER PROTEIN HYDROLYSATE APPLICATION ON COLD STRESS TOLERANCE OF WHEAT (*Triticum aestivum* L.)

Ebru GENÇ

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

Supervisor: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

In this study, it was aimed to investigate the effects of protein hydrolysate from chicken feather on cold stress tolerance in plants. For this aim, two varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.) susceptible to cold (Altındane) and resistant (Bezostaya) were used as plant material. After chicken feathers were subjected to hydrolysis, neutralization and filtration processes with strong acids and bases, water-soluble Chicken Feather Protein Hydrolysate (CFPH) was obtained. The amino acid content of CFPH was determined and then its three different concentrations (0.05, 0.075 and 0.1%) were applied to the leaves of 11 day-old wheat seedlings growing under the controlled conditions. After 6 hours from the treatment, a portion of the treated and non-treated (control) seedlings were transferred to cold conditions (5/2°C). Three days later, the seedlings were harvested for use in physiological and biochemical analyzes. In the seedlings, root-stem lengths, fresh-dry weights and freezing injury parameters were determined first. In addition, the level of lipid peroxidation (LPO) and reactive oxygen species (ROS), the activity of antioxidant enzymes and the content of non-enzymatic antioxidants were examined. The changes in contents of protein, chlorophyll, proline and total sugar, the activity of Rubisco were also assessed in the seedlings. According to our findings, the total protein yield of CFPH was 72% and it contained 19 amino acids which were proteinic. Cold application alone reduced the root-stem length and the fresh weight in both varieties, but increased the freezing injury. CFPH applied before cold stress (CFPH+C) increased the fresh weight with root-stem lengths, and decreased the freezing injury, by alleviating the adverse effect of the cold application on these parameters. Statistically significant results were not obtained regarding the differences in dry weight. The cold application reduced the content of pigments (chlorophyll and carotenoid) and the activity of Rubisco in both varieties, but CFPH+C significantly increased both the parameters, as compared to control. On the other hand, cold stress caused a significant increase in the contents of protein, sugar and proline in both varieties. Whereas, CFPH+C application increased proline content in both varieties while it increased the content of protein and sugar in Altındane and Bezostaya, respectively. In the two varieties, while cold application increased LPO level and the contents of O₂⁻ and H₂O₂ these three parameters were significantly decreased by CFPH+C application. The cold decreased glutathione and ascorbate content, and increased phenolic content, but the application of CFPH+C reversed this situation. Cold increased superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase activities in the cultivars studied, while CFPH+C more increased the activities of these. However, increased catalase and peroxidase activities by cold were decreased at a significant level by CFPH+C application. In general, the most effective concentration of CFPH was 0.075% in improving the parameters affected by cold stress. The findings were discussed mutually.

2017, 125 pages

Keywords: Antioxidant, chicken feather, cold, freezing injury, protein hydrolysate, Rubisco, wheat

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlanan bu araştırma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmam süresince engin bilgilerinden yararlandığım, bana her konuda sonsuz sabırla destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince görüş ve tavsiyelerinden yararlandığım, bana her konuda destek veren hocam Sayın Prof. Dr. Yavuz DEMİR ve hocam Sayın Doç. Dr. Mesut TAŞKIN'a çok teşekkür ederim.

Araştırma süresi boyunca laboratuvarında beraber çalıştığım, her türlü yardım ve desteğini gördüğüm çalışmalarımın en zor aşamalarında, sıkıntıya düştüğüm anlarda ve karşılaştığım tüm zorluklarda bana desteğini hiç eksik etmeyen Aykut KARAMAN'a teşekkür ederim. Ekibimize sonradan katılmasına rağmen çalışkanlığı ve azmi ile örnek olan ve yardımlarını esirgemeyen Sakineh Mohammadi Kohneh SHAHRİ'ye teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım süresince her türlü desteklerini gördüğüm Özlem GÜLMEZ ve Dr. Deniz TİRYAKİ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca benim için ellerinden gelenin en iyisini yapmaya çalışan ve her an yanımda olan babam Mevlüt GENÇ'e, manevi annem Adalet GENÇ'e, biricik kardeşim Elif GENÇ'e ve her zaman destekçilerim ailemin diğer üyelerine canı gönülden teşekkür ederim.

Ebru GENÇ

Haziran, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	15
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	22
3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	22
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	22
3.3. Yöntemler	26
3.3.1. Tavuk tüyü protein hidrolizatının hazırlanması	26
3.3.2. Aminoasit içeriğinin belirlenmesi	28
3.3.3. Bitkilerin büyütülmesi	28
3.3.4. Elektrolit kaçağının belirlenmesi (Donma Hasarı).....	29
3.3.5. Çözünebilir protein miktarının belirlenmesi	29
3.3.6. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi	31
3.3.6.a. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi.....	31
3.3.6.b. Peroksidaz (POX) aktivitesinin belirlenmesi	32
3.3.6.c. Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi.....	33
3.3.6.d. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayini	33
3.3.6.e. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tayini	34
3.3.7. Enzimatik olmayan antioksidanların içeriklerinin belirlenmesi.....	34
3.3.7.a. Glutasyon ve askorbik asit ekstraksiyonu	34
3.3.7.b. Glutasyon (GSH) ve GSSG içeriğinin belirlenmesi	34
3.3.7.c. Askorbik asit (AsA) içeriğinin belirlenmesi.....	35
3.3.8. Lipid peroksidasyon miktarının belirlenmesi.....	36
3.3.9. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi	37

3.3.10. Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) içeriğinin belirlenmesi.....	38
3.3.11. Total klorofil içeriğinin belirlenmesi	39
3.3.12. Prolin miktarının belirlenmesi.....	40
3.3.13. Total karbohidrat içeriğinin belirlenmesi	41
3.3.14. Fenolik madde içeriğinin belirlenmesi	42
3.3.15. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE).....	43
3.3.16. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile izoenzimlerin belirlenmesi	44
3.3.16.a. Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzimlerinin belirlenmesi	45
3.3.16.b. Peroksidaz (POX) izoenzimlerinin belirlenmesi	45
3.3.16.c. Katalaz (CAT) izoenzimlerinin belirlenmesi	45
3.3.16.d. Askorbat peroksidaz (APX) izoenzimlerinin belirlenmesi	46
3.3.16.e. Glutasyon redüktaz (GR) izoenzimlerinin belirlenmesi	46
3.3.17. Westren blot ile Rubisco ifadesinin belirlenmesi.....	46
3.3.18. Nispi su içeriği.....	47
3.3.19. İstatistiksel analiz	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	48
4.1. Tavuk Tüyü Protein Hidrolizatının (TTH) Aminoasit İçeriği	48
4.2. TTH Uygulamasının Kök ve Gövde Uzunluğu Üzerine Etkileri	49
4.3. Yaş ve Kuru Ağırlık Bulguları	51
4.4. Pigment İçeriği ve Rubisco Aktivitesine Ait Bulgular.....	54
4.4.1. Pigment içeriği	54
4.4.2. Rubisco aktivitesi	57
4.5. Karbohidrat, Çözünabilir Protein ve Prolin İçeriğine Ait Bulgular	58
4.5.1. Total şeker içeriği.....	58
4.5.2. Çözünabilir protein içeriği.....	60
4.5.3. Prolin içeriği.....	63
4.6. Reaktif Oksijen Türleri İçeriğine Ait Bulgular	65
4.6.1. Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) içeriği	65
4.6.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriği.....	67
4.7. Oksidatif Hasar Parametrelerine Ait Bulgular	68
4.7.1. LPO göstergesi olarak MDA içeriği.....	68
4.7.2. Donma Hasarına (DH) ait bulgular	70

4.8. Antioksidan Sistem Parametrelerine Ait Bulgular	73
4.8.1. Antioksidan enzim aktiviteleri ve izoenzim bulguları	73
4.8.1.a. SOD aktivitesi ve izoenzimleri.....	73
4.8.1.b. POX aktivitesi ve izoenzimleri.....	76
4.8.1.c. CAT aktivitesi ve izoenzimleri.....	79
4.8.1.d. APX aktivitesi ve izoenzimleri.....	82
4.8.1.e. GR aktivitesi ve izoenzimleri	85
4.8.2. Enzimatik olmayan antioksidanlara ait bulgular	88
4.8.2.a. Total AsA, AsA ve DHA içerikleri	88
4.8.2.b. GSH, GSSG ve total GSH içerikleri	93
4.8.2.c. Fenolik madde içeriği	98
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	100
5.1. Sonuç.....	112
KAYNAKLAR	113
ÖZGEÇMİŞ	126

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

APX	: Askorbat peroksidaz
AsA	: Askorbik asit
CAT	: Katalaz
DHA	: Dehidroaskorbik asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
gr	: Gram
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
NBT	: Nitroblue tetrazolium klorür
nmol	: Nano mol
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
POD	: Peroksidaz
PVP	: Polivinilpirrolidon
ROT	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Devir/dakika
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksid dismutaz
TBA	: Tiobarbutirik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TTH	: Tavuk tüyü hidrolizati
U	: Enzim ünitesi
xg	: Yerçekimi ivmesinin katı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Askorbat-glutatyon çemberi	10
Şekil 3.1. Tavuk tüyü hidrolizatı hazırlanmasının şematik gösterimi	27
Şekil 3.2. Tavuk tüyü hidrolizatının hazırlanması aşamaları.....	28
Şekil 3.3. Protein tayini için kullanılan standart grafik	30
Şekil 3.4. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik	32
Şekil 3.5. Glutatyon içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik.....	35
Şekil 3.6. Askorbik asit içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik	36
Şekil 3.7. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik ...	38
Şekil 3.8. Süperoksit anyon (O ₂ ^{•-}) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik	39
Şekil 3.9. Prolin içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik	41
Şekil 3.10. Total karbohidrat içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik	42
Şekil 3.11. Fenolik madde içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik	43
Şekil 4.1. Kök ve uzunlukları (cm/bitki) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	51
Şekil 4.2. Yaş ağırlık (gr/bitki) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri ..	53
Şekil 4.3. Kuru ağırlık (gr/bitki) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	54
Şekil 4.4. Total klorofil içeriği (mg/gr doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	56
Şekil 4.5. Karotenoid (mg/gr doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	57
Şekil 4.6. Altındane çeşidinde %0.1 TTH uygulamasının Rubisco enzimi ifadesi üzerine etkisi	58
Şekil 4.7. Bezostaya çeşidinde %0.1 TTH uygulamasının Rubisco enzimi ifadesi üzerine etkisi	58
Şekil 4.8. Total şeker içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının etkileri	60
Şekil 4.9. Çözünebilir protein içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	62
Şekil 4.10. Altındane çeşidinde protein profilinin SDS-PAGE ile görüntülenmesi	62

Şekil 4.11. Bezostaya çeşidinde protein profilinin SDS-PAGE ile görüntülenmesi	63
Şekil 4.12. Prolin içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	65
Şekil 4.13. Süperoksit anyonu (O_2^-) içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	67
Şekil 4.14. Hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	68
Şekil 4.15. MDA içerikleri üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	70
Şekil 4.16. Soğuk stresine maruz buğday (<i>Triticum aestivum</i> cv. Altındane) bitkilerinin yapraklarında % donma hasarı	71
Şekil 4.17. Soğuk stresine maruz buğday (<i>Triticum aestivum</i> cv. Bezostaya) bitkilerinin yapraklarında % donma hasarı	72
Şekil 4.18. SOD aktivitesi üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	75
Şekil 4.19. Altındane çeşidinde TTH uygulamasının SOD izoenzimleri üzerine etkisi.	75
Şekil 4.20. Bezostaya çeşidinde TTH uygulamasının SOD izoenzimleri üzerine etkisi .	76
Şekil 4.21. POX aktivitesi üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	78
Şekil 4.22. Altındane çeşidinde TTH uygulamasının POX izoenzimleri üzerine etkisi.	78
Şekil 4.23. Bezostaya çeşidinde TTH uygulamasının POX izoenzimleri üzerine etkisi	79
Şekil 4.24. CAT aktivitesi üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	81
Şekil 4.25. Altındane çeşidinde TTH uygulamasının CAT izoenzimleri üzerine etkisi.	81
Şekil 4.26. Bezostaya çeşidinde TTH uygulamasının CAT izoenzimleri üzerine etkisi .	81
Şekil 4.27. APX aktivitesi üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	83
Şekil 4.28. Altındane bitkisine TTH uygulamasının APX izoenzimleri üzerine etkisi ..	84
Şekil 4.29. Bezostaya bitkisine TTH uygulamasının APX izoenzimleri üzerine etkisi .	84
Şekil 4.31. Altındane çeşidinde TTH uygulamasının GR izoenzimleri üzerine etkisi ...	87
Şekil 4.32. Bezostaya çeşidinde TTH uygulamasının GR izoenzimleri üzerine etkisi ..	87
Şekil 4.33. AsA içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	90
Şekil 4.34. DHA içerikleri üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	90
Şekil 4.35. Total AsA seviyeleri üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	92
Şekil 4.36. AsA/ DHA seviyeleri üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	93
Şekil 4.37. GSH içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	95

Şekil 4.38. GSSG içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	95
Şekil 4.39. Total GSH içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	97
Şekil 4.40. GSH/GSSG oranı üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	98
Şekil 4.41. Fenolik madde içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	99



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan TTH'nin aminoasit içeriği	49
Çizelge 4.2. Kök ve gövde uzunlukları (cm/bitki) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	50
Çizelge 4.3. Yaş ve kuru ağırlıklar (mg/bitki) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	52
Çizelge 4.4. Total klorofil ve karotenoid (mg/gr doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	56
Çizelge 4.5. Total şeker içeriği (mg/gr doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	59
Çizelge 4.6. Çözünebilir protein içeriği (mg/gr doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	61
Çizelge 4.7. Prolin içeriği ($\mu\text{g}/\text{gr}$ doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	64
Çizelge 4.8. Süperoksit anyonu (O_2^-) ($\mu\text{g}\cdot\text{gr}^{-1}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) içerikleri ($\mu\text{g}/\text{gr}$ doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	66
Çizelge 4.9. MDA içerikleri (nmol/gr doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	69
Çizelge 4.10. Altındane çeşidinde %Donma Hasarı ($\mu\text{S}/\text{cm}$) üzerine TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	71
Çizelge 4.11. Bezostaya çeşidinde %Donma Hasarı ($\mu\text{S}/\text{cm}$) üzerine TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	72
Çizelge 4.12. SOD aktivitesi ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	74
Çizelge 4.13. POX aktivitesi ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	77
Çizelge 4.14. CAT aktivitesi ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	80
Çizelge 4.15. APX aktivitesi ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	83

Çizelge 4.16. GR aktivitesi ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	86
Çizelge 4.17. AsA ve DHA içerikleri ($\text{ng}\cdot\text{gr}^{-1}$ doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	89
Çizelge 4.18. Total AsA ve AsA/DHA seviyeleri ($\text{ng}\cdot\text{gr}^{-1}$ doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	92
Çizelge 4.19. GSH ve GSSG seviyeleri ($\text{ng}\cdot\text{gr}^{-1}$ doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	94
Çizelge 4.20. Total GSH içeriği ($\text{ng}\cdot\text{gr}^{-1}$ doku) ve GSH/GSSG seviyeleri üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri.....	97
Çizelge 4.21. Fenolik madde içeriği ($\mu\text{g}/\text{gr}^{-1}$) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri	99

1. GİRİŞ

Günümüzde dünya nüfusu hızlı bir şekilde artmakta ve 2045 yılına kadar yaklaşık 7 milyar olan nüfusun 10 milyara dayanacağı tahmin edilmektedir (Ezeh 2012). Bu nedenle gelecek nesillerin gıda ihtiyaçlarını karşılamak, dünyanın ekolojik ve enerji ile ilgili kaynaklarını korumak amacıyla ürün verimliliğinin yüksek oranda artırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak ürünlerin kalitesini ve verimliliğini etkileyen çeşitli biyotik (patojenler, böcekler, yabancı otlar vb.), abiyotik (sıcaklık stresi, kuraklık, tuzluluk stresi vb.) faktörler, küresel ısınma ve yok edilen tarım alanları tarımsal üretimi sınırlandırmaya devam etmektedir (Kaur and Asthir 2017).

Bitkiler yukarıda ifade edilen olumsuz koşullara direnç kazanmak, nesillerini sürdürebilmek için evrim süresince çok sayıda adaptasyon ve korunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Fakat bu mekanizmalar stresin çeşidi, süresi ve şiddetine bağlı olarak çoğu zaman yetersiz kalabilmekte, bitkiyi ölüme kadar götürebilecek ciddi hasarlar meydana getirebilmektedir (Shinozaki *et al.* 2003). Stres kaynaklarının en önemlilerinden birisi sıcaklık stresi olup, bitkiye en çok zararı veren faktörlerdendir.

Bitkiler, normal büyüme ve gelişim için belirli sıcaklık aralıklarına ihtiyaç duyarlar. Bu aralıkların dışındaki değerler bitkilerde sıcaklık stresine neden olmaktadır (Nandhitha *et al.* 2016). Bu stres, çimlenme aşamasından meyve aşamasına kadar bitkinin bütün gelişim aşamalarında bitki yaşamını olumsuz etkiler (Zinn *et al.* 2010). Sıcaklık stresi içinde de en önemli olanı ve üzerinde en çok çalışma yapılanı düşük sıcaklık stresidir. Düşük sıcaklığın özellikle ekonomik değeri yüksek olan bitkiler üzerindeki zararlarını azaltmak için her yıl büyük bütçeler harcanmaktadır (Chinnusamy *et al.* 2007; Kotak *et al.* 2007; Wahid *et al.* 2007). Bitkilerin soğuğa karşı direncini 1°C artırmak bile meydana gelebilecek ekonomik zararları ve ürün kayıplarını düşürülecektir. Bu amaç için uzun yıllardan beri soğuk stresine karşı bitki direncini artırmaya yönelik çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Çevre sıcaklığının suyun donma noktasına yakın veya altına düştüğü durumlarda birçok bitkide üşüme veya donma hasarı ortaya çıkar. Bu hasarın ortaya çıkış derecesi soğuğun şiddetine, bitkinin soğukta kalma süresine, soğukta

kaldığı olgunluk safhasına, bitki yapısındaki çözülebilir şeker ile prolin içeriğine, bitki bünyesindeki büyümeyi düzenleyicilerin dengesine bağlıdır (Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Esim 2011). Bitkiler soğuk stresi ile yüzleştiklerinde, hücresele seviyede stresin olumsuz etkilerini minimize edecek birçok koruma mekanizması devreye girer. Bunlar stresin tipine ve bitkinin tolerans seviyesine göre değişebilse de genel bir cevap olarak hücrelerde çeşitli stres proteinleri ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) içsel miktarları artmaktadır (Apel and Hirt 2004; Zinn *et al.* 2010). ROT'ların oluşturduğu olumsuzlukları tolere etmek için farklı türlerde ve miktarlarda enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan bileşikler kullanılır. Aşağıda ROT bileşikleri ve bu bileşikleri hücresele ortamlarda temizleyen antioksidan mekanizmalar daha detaylı sunulmuştur.

Klorofil, mitokondri ve peroksizomlar yüksek derecede oksitleyici ve indirgeyici metabolik aktivite gösteren veya yoğun elektron akışının olduğu hücresele kompartmanlardır. Bu özellikleriyle hücrelerde ROT'un olduğu ana yerlerdir. Bu merkezlerde üretilen ROT'lar içerisinde singlet oksijen (1O_2), süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\bullet OH$) en yaygınlarıdır (Gill and Tuteja 2010). ROT'lar kimyasal olarak bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok reaktif moleküller olarak tanımlanabilir. Hücrelerde biyomoleküllerle kolayca elektron alış-verişine girerek onların yapısını bozan bu moleküllere "Serbest Radikaller veya Reaktif Oksidan Moleküller" de denilmektedir. ROT'lar lipid, protein, karbohidrat ve nükleik asitler gibi hücrelerin temel bileşenleri üzerinde oksidatif etkiler oluştururlar. Özellikle çift bağların bulunduğu doymamış yağ asitlerini içeren lipidler, ROT'lar ile kolayca okside olabilmektedirler (Blokhina *et al.* 2003). Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış karbonları, ROT'larla kolayca reaksiyon vererek toksik peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Bu şekilde gerçekleşen çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu (LPO) olarak bilinir ve hücre için oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren bir zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. LPO ile oluşan membran hasarı ise geri dönüşümsüzdür (Heath and Packer 1968; Halliwell and Gutteridge 1999). Biyolojik sistemlerde LPO'yu tetikleyen serbest

radikallerin, süperoksit anyonu ile özellikle hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir.

Moleküler oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen (1O_2) oluşur (Kuzu 2015). Eşleşmemiş elektronu bulunmadığı için radikal özelliği olmamasına rağmen, yüksek oksidan özelliği oldukça yüksektir. Singlet oksijen çok çeşitli yollarla kimyasal veya fotokimyasal olarak üretilebilir, bitkilerde üretim şekli fotosentez esnasında klorofilden ışık enerjisinin oksijene geçmesi ile olmaktadır (Güler 2008). 1O_2 birçok organik molekülle reaksiyona girdiğinden yıkıcıdır ve canlı organizmalarda hasara neden olan başlıca oksijen türlerinden biridir (Durmuş 2003). Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksit radikalini oluşturur ve $\cdot OH$ kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonu başlatabilir. Hücre zarlarının glikolipid, fosfolipid, sterol ve gliserid yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitleri oluştururlar (Minibaeva and Gordon 2003).

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda hızlı bir şekilde oluşan ve tüm aerobik canlılarda bulunan bir oksidatif anyondur. Mitokondrilerdeki enerji üretimi sırasında kullanılan oksijenin yaklaşık %5'i süperoksite dönüştürülür. Çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında da süperoksit radikali bir yan ürün olarak oluşabilir (Corpas *et al.* 2001). Flavinler, tiyoller gibi indirgenmiş nükleotitler aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olabilirler (Choi *et al.* 2002). Süperoksit radikalinin önemi H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Ayrıca hücresel koşullarda üretilen süperoksit hem oksitleyici hem de indirgeyici olarak davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonunu, sitokrom-C'ye veya bir radikale verirse tekrardan oksitlenebilmektedir (Kuzu 2015).

Oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan tepkimeler sonucunda meydana gelen hidrojen peroksit (H_2O_2), DNA kırılmalarına, protein denatürasyonlarına neden olur (Hagar *et al.*

1996). Süperoksitin enzimatik olmayan yıkımı, nötral ve hafifçe asidik pH'da kendiliğinden olurken süperoksitin enzimatik yıkımı SOD katalizli dismutasyon reaksiyonu ile H_2O_2 'ye dönüşmesiyle olur (Slesak *et al.* 2011). H_2O_2 yapısında eşleşmemiş elektron içermediği için radikal değildir, ancak biyolojik membranları geçerek hücreler arasına veya içine kolayca difüze olabilir ve uzun ömürlü bir oksidandır (Güler 2008). H_2O_2 'nin ortamdaki temizlenmesini CAT, APX, POX gibi enzimlerle toksik olmayan H_2O ve O_2 'ye dönüştürülür.

Hidroksil radikali ($\cdot OH$), genel olarak reaktif oksijen türlerinin (ROT) en güçlüsüdür. Bu radikal, geçiş metalleri varlığında H_2O_2 'nin indirgenmesiyle oluşabileceği gibi, suyun yüksek enerjili iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalması ile de oluşabilir (Stahl and Sies 2002). Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri ($RS\cdot$), karbon merkezli organik radikaller ($R\cdot$), organik peroksitler ($RCOO\cdot$) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur. Biyolojik sistemlerde $\cdot OH$, biyolojik açıdan en önemli makro moleküllerin tüm çeşitlerinde, özellikle de nükleik asitlerde hasara neden olur. Bütün bu tepkimeler $\cdot OH$ 'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell 1984). Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli diğer bir hasar lipid peroksidasyonudur. $\cdot OH$ 'ın başlıca hedefi yağ asitleri olup zar lipidlerinin peroksidasyonu ile zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama *et al.* 1998; Güler 2008).

ROT'lar normal şartlar altında büyüme ve gelişme gösteren hücrelerde belirli bir seviyede üretilir, ancak hücrelerin antioksidatif mekanizmaları bu bileşikleri ortamlardan etkili bir şekilde temizleyerek hücreleri korurlar. Stres şartlarında ise üretilen ROT seviyesi, hücrelerdeki antioksidatif sistemin temizleyeceği eşik değerin çok yukarısına çıkar. Eğer hücreler buna cevap olarak antioksidan sistem kapasitelerini yükseltmezse, ROT'ların gerçek zararları ortaya çıkar. Bu nedenle, ROT'ların neden olduğu oksidatif strese tolerans sağlamada enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların hücresel seviyelerinin düzenlenmesi oldukça önem arz eder (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003).

Lipid peroksidasyonu (LPO), hücre zarındaki fosfolipitlerdeki doymamış yağ asitlerinde meydana gelen yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olarak zar lipid yapısını değiştiren, hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır (Thomas 1999). Canlılar için çok tehlikeli membran yıkımı, lipid peroksidasyonu ile geri dönüşümsüz zarara sebep olur (Akkuş 1995). LPO lipid peroksidlerinin çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitlere dönüşmesiyle son bulur. Hücre için toksik olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize edilir ya da ilk oluştukları bölgede hücre içine girerek hücreye ve hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Lipid peroksidasyonu esnasında, üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu lipid peroksidasyon seviyesinin bir göstergesi olarak kabul edilen malondialdehit (MDA) oluşur. Hücrelerde MDA'nın içsel seviyesi ile LPO seviyesi iyi bir korelasyon gösterdiğinden, LPO seviyesinin ölçülmesinde MDA içeriğinin belirlenmesi yaygın kullanılan bir yöntemdir (Kuru 2007).

Bitki hücreleri ROT artışını kontrol etmek ve stres koşullarında hücreleri artan LPO'den korumak için birçok antiokasidanlar içermektedirler. Antiokasidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan (nonenzimatik) olarak iki gruptur. Antiokasidan enzimler olarak adlandırılan enzimatik grup, ROT'ları kademeli bir şekilde daha az toksik olan bileşiklere parçalayarak etkilerini azaltırlar veya ortadan kaldırırlar. Bu enzimlerin başlıcaları süperoksid dismutaz, katalaz, peroksidazlar, askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktazdır (Halliwell 2006; Ahmad *et al.* 2008).

Süperoksid dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1), serbest radikallere karşı organizmadaki ilk savunmayı gerçekleştiren enzimdir. Enzimin görevi, süperoksid serbest radikalının zararlı etkilerine karşı bitkiyi korumaktır. Süperoksidin daha az toksik hali olan H₂O₂'ye dönüşümünü katalizleyen metal içeren bir enzimdir (Sairam and Srivastava 2000; Eyidogan *et al.* 2003; Minibaeva and Gordon 2003).



SOD'un üç farklı izoenzimi, bakır/çinko (Cu/ZnSOD, sitoplazma ve kloroplastlarda), mangan (MnSOD, mitokondrilerde) ve demir (FeSOD, kloroplast stromasında) olarak

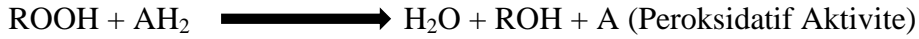
farklı hücre kompartımanlarında bulunabilir. SOD farklı streslere cevapta farklı tepkiler verebilmektedir. Örneğin soğuğa maruz bırakılan buğday bitkilerinde tüm SOD izoenzimlerinde artış gözlenmiştir (Scebba *et al.* 1998). Ancak soğuğa dirençli buğday bitkisinde SOD aktivitesi, soğuğa duyarlı buğday bitkilesinden daha yüksek olduğu bulunmuştur (Li *et al.* 2014).

Peroksidaz (POX) (EC 1.11.1.7), bitkilerde savunma mekanizmasında görev alan ve hücrenin çok farklı kompartmanlarında oksidatif hasara karşı bitkiyi koruyan diğer bir enzimdir (Türküsay *et al.* 2005). POX HEM prostetik grubuna sahip bir enzimdir ve çoğunlukla kloroplastlarda bulunur (Banci 1997; Kim *et al.* 2000). Fizyolojik olaylarla ilişkisi olduğu ve metabolizmada aktif bir rol oynadığı belirlenen peroksidazların çok farklı stres altındaki bitkilerde aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Durmuş 2003). POX, uygun olmayan çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve bitki hücrenin en önemli koruyucu enzimlerinden birisidir (Dehon *et al.* 2002). POX'lar hidrojen vericisi olarak birçok organik (AH₂) ve inorganik substratı kullanarak hidrojen peroksiti ortadan kaldırır (Aşağıda reaksiyon şeması verilmiştir). Mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, çeşitli stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenen POX aktivitesi, bu enzimin stres enzimi olarak anılmasına sebep olmuştur (Whetten *et al.* 1998; Rout *et al.* 2000; Jaleel *et al.* 2008).



Antioksidan enzimlerden diğer biri Katalazdır (CAT) (EC 1. 11. 1. 6). Doğadaki tüm canlılarda bulunan katalaz enzimi H₂O₂'i parçalayan bir enzimdir (Higashi *et al.* 1974). CAT, hidrojen peroksiti substrat olarak, hem elektron alıcısı hem de elektron vericisi olarak kullanılmaktadır (Robertson 2004). Aynı zamanda CAT, düşük H₂O₂ konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite gösterebilir (Chaudiere and Ferrari 1999; Gechev *et al.* 2003). CAT'ın görev aldığı bazı reaksiyonlar aşağıdaki verilmiştir. CAT, turnover

sayısı çok yüksek olan enzimlerden biridir. Bir mol katalaz, bir saniyede milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü su ve oksijene dönüştürür (Scandalios 1994).

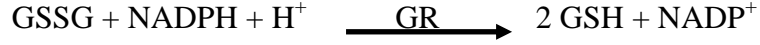


CAT, moleküler oksijenin kullanıldığı bazı metabolik reaksiyonlar esnasında üretilen H_2O_2 ve ROOH gibi peroksit radikallerini süpürür ve membranlarda geri dönüşümsüz hasarları engeller. CAT kararlı bir enzim olmadığı için yüksek ışık yoğunluğu ve strese maruz kalan bitki hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda H_2O_2 'den dolayı inhibe edilebildiği belirlenmiştir (Streb *et al.* 1993). CAT aktivitesi streslerde büyük oranda etkilenir. Örneğin buğdaygiller familyasına ait arpa, buğday, yulaf, çavdar bitkileri soğuk stresine maruz kaldıklarında CAT aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir (Janda *et al.* 2002, 2003). Ancak örneğin tropik bitki olan soya tedrici olarak düşen sıcaklığa maruz bırakıldığında CAT aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Yadeghari *et al.* 2008).

Askorbat peroksidaz (APX) (EC 1.11.1.11), yüksek bitkiler, algler, kamçılılar gibi birçok organizmada ROT'a karşı gerçekleştirilen savunmada önemli role sahip olduğu düşünülen enzimatik antioksidanlardandır. tAPX, gmAPX, sAPX, cAPX gibi en az beş farklı izoformdan oluşan APX ailesi H_2O_2 'ye karşı CAT'a kıyasla daha yüksek bir affiniteye sahiptir. Bu reaksiyon sonucunda askorbat iki molekül monodehidroaskorbata (MDHA) dönüşür. MDHA monodehidroaskorbat redüktaz tarafından tekrar askorbata dönüştürülür (Kumar *et al.* 2011). APX, hücreleri H_2O_2 'ye karşı yalnızca normal koşullarda değil, stresli koşullar altında da korumaktadır. Örneğin düşük sıcaklık koşullarında patates fidelerinde APX aktivitesinde önemli bir değişim görülmezken, salatalık fidelerinde APX aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Lukatkin *et al.* 2001).

Glutasyon redüktaz (GR) (EC 1.6.4.2) okside glutasyonu (GSSG), NADPH'ı kullanarak redükte glutatyonu (GSH) indirgeyen bir flavoenzimdir. Kısaca elektron vericisi olarak NADPH'ı kullanarak GSH oluşturan enzimdir. Enzim etkinliğinin azalması, hücrelerin

oksidatif hasardan korunmasını azaltır (Ranieri *et al.* 2005; Yannarelli *et al.* 2007). GR'nin genel bir reaksiyonu aşağıda verilmiştir.

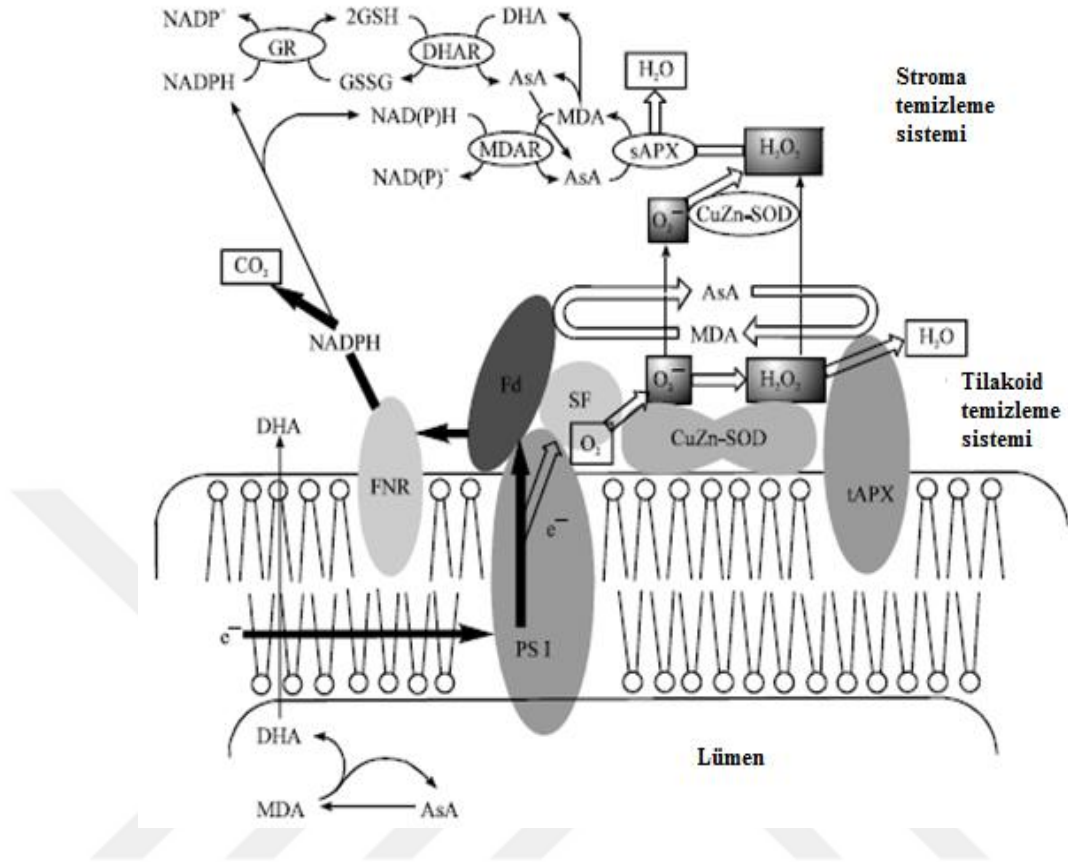


Önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidan olan GSH, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sağlayıp hücreleri oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır (Foyer and Noctor 2005). GR diğer enzimlerle birlikte H₂O₂'nin radikal özelliğinin ortadan kaldırılmasında görev alır. Aynı zamanda bu enzim H₂O₂'i ve diğer peroksitleri parçalar. H₂O₂'nin redüksiyonu; GSSG, redüktaz aktivitesi için gerekli olan NADPH'ları sağlayan pentoz fosfat yoluyla ilişkilidir. Bu önemli reaksiyonlar membran lipidlerini oksidasyona karşı korumaktadır. Bu nedenle GSSG'nin GSH'a indirgenmesi, oksidan temizlenmesinde önemli bir basamaktır. Bu nedenle oksidatif strese karşı savunmada GR'nin büyük bir önemi vardır (Aono *et al.* 1995; Creissen *et al.* 1996; Güler 2008). Örneğin, düşük sıcaklık stresi esnasında soğuğa dirençli mısır ve margrit papatyası bitkisinde GR enzim aktivitesinin arttığı ve bu artışın soğuğa toleransda önemli olduğu vurgulanmıştır (Janda *et al.* 1999).

Tüm canlılarda bulunan, glutamik asit, glisin ve sistein den oluşan bir tripeptit olan redükte glutatyon (GSH) organizmada serbest radikallerin ve çeşitli toksik maddelerin zararsız hale dönüştürülmesinde görev alan ve çeşitli fizyolojik görevler üstlenen güçlü bir antioksidandır (Wu *et al.* 2004; Yoshida *et al.* 2011). Bu bileşik ayrıca H₂O₂'nin detoksifikasyonunda rol oynayan askorbat-glutatyon çemberinin başlıca bileşenidir. Hücre içi ortamın en önemli antioksidan molekülü olan GSH, antioksidan savunma sisteminde görev almakta ve bitkiyi biyotik ve abiyotik streslere karşı korumakta ve bundan başka ksenobiyotiklerin zehirsizleştirilmesi, aminoasitlerin transportu, proteinlerdeki sülfidril gruplarının redükte halde tutulması, bazı enzimatik reaksiyonlarda koenzim görevi gibi bir çok fizyolojik olayda rol almaktadır (Aktaş *et al.* 2005; Cheng *et al.* 2015). GSH, ROT'lara karşı geliştirilen koruma mekanizması içerisinde önemli bir moleküldür. Çözünür glutatyon S-konjugeleri pek çok metabolik detoksifikasyon işlemlerine ve oksidatif baskıya karşı devreye giren mekanizmalara

katılan ve bitkilerin ikincil metabolizmaları dâhilinde sayılan Faz-II enzimlerini içeren kofullarda bulunurlar. Bu sızozolik savunma sistemi, normal metabolizma sürecinde açığa çıkan elektrofilleri, GSH molekülünü ya kosubstrat ya da koenzim olarak kullanmak yoluyla bağlar (Frova 2006; Dixon 2010; Yılmaz 2017). Bitkilerde düşük sıcaklığın oksidatif etkilerinden korunmak için GSH/GSSG döngüsü sürekli aktif tutulmalı ve GSH seviyesi yüksek tutulmalıdır (Kocsy *et al.* 2001).

Askorbat (L-askorbik Asit, C vitamini); sadece bitkilerde değil aynı zamanda hayvanlarda da savunma sisteminde görev alan diğer güçlü bir antioksidandır. Genellikle plazmalarında bulunan askorbik asit bitki için hem bir karbon kaynağı hem de bitkinin büyümesinde görev alan bazı enzimlerin ko-enzimi olarak görev alır (Davey 2000). Hemen hemen bütün bitki hücrelerinde organel ya da apoplastik alanlarda bulunan askorbat, mitokondrilerde sentezlenir ve kolaylaştırılmış difüzyonla hücrelere dağılır (Hong *et al.* 2007). Yalnızca H₂O₂ değil bununla beraber O₂^{•-}, [•]OH ve lipid hidro peroksidazları detoksifikasyonunda görev alır (Shao *et al.* 2006). Ayrıca kloroplast ya da hücre membranlarındaki elektron taşıma sistemlerinde elektron verici-alıcı olarak ta görev yapar. Aşağıda genel bir bitki hücresi kloroplastında enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar arasındaki ilişkiler ve yolaklar verilmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Askorbat-glutasyon çemberi (Asada 1999)

İnsan nüfusunun sürekli olarak artması buna karşılık yetiştirilebilir verimli toprakların giderek azalması, bitki yetiştiriciliğinde verim ve kaliteyi artırmak için, araştırmacıları daha düşük maliyetli, sürdürülebilir ve çevreyle uyumlu olan farklı arayışlara yönlendirmiştir. Bitkiler çeşitli biyotik ve abiyotik streslere maruz kaldıklarında ürün verimi azalmaktadır. Bu nedenle; bitkilerin genetiğine müdahale etmek yoluyla onların verimliliğinin artırılması ve olumsuz koşullara karşı daha dirençli hale getirilmesi son yıllarda yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Ancak genotipte değişiklik oluşturulması nedeniyle bu bitkilerle beslenen insanların ve hayvanların sağlığının olumsuz yönde etkilenebileceği kanısıyla bu yöneme her zaman şüphe ile yaklaşılmaktadır.

Günümüzde verimi artırmak için sıkça uygulanan diğer bir yöntem ise çeşitli büyüme düzenleyicilerini ve kimyasal maddeleri dışarıdan bitkilere uygulanmasıdır. Bu yöntemle, istenilen büyüme ve gelişmede artış, hastalıklara karşı direnç yeterince

sağlanamamakta ve kullanılan maddelerin kimyasal olması nedeniyle insan sağlığına zarar verebilmesi yönünden kullanımı tartışılmaktadır. Çünkü bu maddeler bitkilerin çeşitli doku ve organlarında birikmesiyle onları yiyerek beslenen hayvan ve insanların bu kimyasal maddeleri vücutlarına almasıyla sağlıkları olumsuz şekilde etkilenmektedir. Bu maddelerin uzunca bir süre ile toprağa verilmesi çevre kirliliğine ve sera gazı etkisini artırabilmektedir. Bu sebeple insan ve çevre sağlığı açısından negatif etkisi olmayan sürdürülebilir tarım uygulamalarına yönelik çalışmalar günümüzde giderek artmaktadır (Lisiecka *et al.* 2011).

Organik maddelerin kullanımı çevreye dost, sürdürülebilir tarım uygulamalarının en gözde yaklaşımlarından biridir. Organik maddelerin gübre olarak kullanılması bitki verimliliğini artırmanın yanı sıra, toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik yapısını da önemli derecede geliştirmektedir (Colla *et al.* 2015a). Bitkisel ve hayvansal kaynaklı olan organik gübreler mikroorganizmalar tarafından hızlı bir şekilde parçalanmak suretiyle toprağın yapısına katılır ve toprağı organik ve inorganik madde yönünden zenginleştirir. Tüm bu avantajları göz önüne alınarak organik maddelerin tarımsal uygulamalarda kullanılması büyük önem taşımaktadır. Bu yüzden yeni, ucuz ve sürdürülebilir organik maddelerin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Özellikle zengin organik ve inorganik içeriğe sahip olan ve gıda endüstrisi gibi çeşitli süreçlerin bir yan ürünü olarak ortaya çıkan atık maddelerin kullanılması alternatif bir atık yönetim uygulaması olarak hem ekolojik hem de ekonomiktir (Colla *et al.* 2015a). Düşük molekül ağırlıklı peptidler ve serbest aminoasitlerden oluşan protein hidrolizatları (PH) da hemen hemen tüm bitki dokuları tarafından kolayca emildikleri için bitki büyüme ve gelişmesinde kullanılabilir. PH'lar bitki yapraklarına uygulandığında, mineral besinlerin ve toprak suyunun alım etkinliğini uyarabilir ve protein sentezi, fotosentez, lignifikasyon ve abiyotik stres toleransı ile ilişkili bazı biyokimyasal mekanizmaları iyileştirerek tarımsal ürünlerin büyüme, gelişme ve verimliliğini artırabilirler (Kunicki *et al.* 2010; Ertani *et al.* 2014). Örneğin, balık protein hidrolizatının yapraklara uygulanması, tohum performansını, bitki büyümesini, guaiacol peroksidaz ve glikoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi enzim aktivitelerini ve bezelye fidelerinde serbest prolin ve fenoliklerin içeriğini artırmıştır (Horii *et al.* 2006). PH'lar

aynı zamanda stres toleransını da (örneğin soğuk ve kuraklık gibi) uyarabilir ve farklı kationların şelatlanmasında (Fe^{2+} , Mg^{2+} ve Ca^{2+} gibi) rol oynar. Bazı çalışmalar, PH uygulamalarının iyileştirici etkilerinin konsantrasyon, bitki türü farklılığı, çevresel koşullar, fenolojik evreler, uygulama zamanı ve yaprak geçirgenliğine bağlı olduğunu belirtmiştir (Kurbanoglu *et al.* 2004; Kunicki *et al.* 2010; Ertani *et al.* 2014). Bu çalışmalardan elde edilen bulgular bitki büyüme ve gelişimini ve verimliliğini artırmak, aynı zamanda çevresel streslerin etkisini hafifletmek için organik atıkların biyoaktivatör olarak kullanılabilirliğini teşvik etmektedir (Xiangyang *et al.* 2011; Joshia *et al.* 2014).

Tavuk tüyü, protein oranı yüksek olmakla birlikte tavukçuluk endüstrisinde büyük miktarda atık bir üründür ve aşırı birikimi çevre kirliliğine neden olabilir. Günümüzde kanatlı hayvan üretiminin ciddi artışı, atık madde olarak tavuk tüyünün önemli miktarlarda oluşumunu beraberinde getirmektedir. Her gün on binlerce, bazen yüz binlerce tavuk kesilen kesimhanelerde tonlarca atık oluşturmaktadır. Olgun bir tavuğun toplam ağırlığının yaklaşık olarak %10'u tüylerden oluşmaktadır. Bu oran göz önüne alındığında dünya genelinde atık olarak üretilen tüy miktarı da yıllık olarak 7.7×10^8 kg ulaşmaktadır. Atık madde olarak tavuk tüylerinin bu kadar fazla birikmesi ve içeriğinde yer alan keratin maddesinin sadece keratinaz enzimine sahip sınırlı sayıda bakteri ve mantarlar tarafından parçalanabilmesi onun sanayide kullanımını oldukça sınırlandırmaktadır. Dolayısıyla, tavuk tüyü keratininin, bir işleme tabi tutulmaksızın canlılar tarafından doğrudan protein kaynağı olarak kullanımı da mümkün görülmemektedir (Taskin and Kurbanoglu 2011; Taskin 2012c). Son yıllarda bazı araştırmacılar tavuk tüylerinin önemli bir PH kaynağı olarak değerlendirilebileceğini ileri sürmüşlerdir (Colla *et al.* 2015a). Tavuk tüyündeki yüksek keratin içeriğini dikkate alan bazı araştırmacılar, tüy keratinini canlıların kullanabileceği besinsel forma dönüştürmek için çalışmalar yürütmektedir. Bu doğrultuda araştırmacılar, buhar basıncında hidroliz, kimyasal maddelerle hidroliz ve enzimatik hidroliz gibi değişik hidroliz yöntemleri kullanmaktadırlar. Uygulanan hidroliz işlemlerinin tavuk tüyündeki aminoasitlerin sindirilebilme özelliğini kısmen artırdığı ve bu işlemlerin sonunda elde edilen son ürünlerin ise başta tavuk ve balık yemi olmak üzere hayvanlar için besin maddesi olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Onifade *et al.* 1998).

Tavuk tüyü içerisinde çok zengin çeşit ve miktarda aminoasit ve proteinlerin olması, onun protein hidrolizatının organik tarımda biyogübre olarak kullanılabilirliğini mümkün kılmaktadır. Örneğin, TTH'ın, tohum çimlenmesi ve toprağa uygulandığı haliyle çim tohumunun fide büyümesi üzerinde olumlu etki yaptığı belirlenmiştir. Yapraktan uygulanması, muz bitkilerinde (Gurav and Jadhav 2013) el başına parmak sayısını, demet ağırlığını artırdığı ve kolzada bitki biyokütlesinde artış üzerinde önemli bir etkisi olduğu bildirilmiştir. Benzer çalışmaların ayrıntılı olarak değerlendirilmesi, potansiyel bir organik gübre olan TTH'ın kültür bitkileri üzerindeki etkisi hakkında daha değerli veriler sağlayacaktır. Ayrıca hidroliz metoduna göre değişen inorganik madde içeriğiyle de yine önemli bir inorganik madde kaynağı olarakta kullanılma potansiyeli bulunmaktadır. Tavuk Tüyü Protein Hidrolizatında (TTPH) prolin ve diğer aminoasitlerin yanı sıra sistein, glutamik asit ve glisin gibi aminoasitlerin de bol miktarlarda bulunması bitki büyüme ve gelişmesine ilaveten bitkilerin stres faktörlerine karşı savunma direncinin de artırılabilmesi adına ümit verici çalışmaların yolunu açmaktadır. Çünkü bu aminoasitler bitki antioksidan sisteminde yer alan ve bu sistemin dengeli yürütmesinde son derece öneme sahip olan GSH'nin (sistein, glisin ve glutamattan oluşan bir tripeptit) öncül bileşenleridir (Kurbanoglu 2004; Vasileva-Tonkova *et al.* 2007; Taskin 2012c).

Yukarıda da ifade edildiği gibi bitkilerde fitoşelatinlerin üretiminden sülfür metabolizmasına kadar çok çeşitli metabolik süreçlerde rol oynayan GSH, stres şartlarında oluşumu artan ROT'ların radikal etkilerini direkt olarak azaltabilecek veya ortadan kaldıracak potansiyele sahip olan önemli bir antioksidandır (Taskin 2012c). GSH'ı oluşturan aminoasitler tavuk tüyünde bol miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle, tavuk tüyünden hazırlanacak olan protein hidrolizatının soğuk stresine maruz kalan bitkilerde askorbat-glutasyon çemberini de içerisine alan farklı metabolik yolları aktive ederek bitki direncini artırması kuvvetle muhtemeldir. Yapılan çalışmalarda, öncü aminoasitler (sistein, glisin ve glutamat) bakımından zengin protein hidrolizatlarının insanlarda glutasyon sentezini artırarak birçok hastalığa karşı direnç sağladığı bildirilmesine rağmen (Wu *et al.* 2004), bu maddelerin bitkilerin dirençleri üzerine etkilerini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu araştırmada, uygun

dozlarda TTH uygulamasının, soğuk stresine maruz bitkilerde antioksidan savunma parametrelerini iyileştirerek bitkinin soğuk toleransını artırabileceği hipotezi ileri sürülmüştür. Bu hipotezi test etmek için öncelikle laboratuvarında tavuk tüylerinden en uygun yöntemlerle TTH elde edilmiş ve TTH'nin aminoasit içeriği belirlenmiştir. Bitki materyali olarak ise fizyolojik çalışmalarda çok yoğun kullanılan ve monokotil bitkiler için model bir bitki olan buğdayın (*Triticum aestivum* L.) soğuğa duyarlı ve dirençli iki çeşidi kullanılmıştır. Daha sonra, bu iki buğday çeşidine ait fidelere farklı dozlarda TTH uygulaması yapılmış ve soğuğa maruz bırakılan fidelerde fizyolojik parametrelerin yanında biyokimyasal parametreler olarak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan parametreler analiz edilmiştir. Elde edilen bütün veriler karşılaştırmalı olarak tartışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Giriş bölümünde de belirtildiği gibi soğuk ve diğer stres şartlarında reaktif oksijen türleri artmaktadır. Soğuk stresinin olumsuz etkisini azaltmak için birçok araştırma yapılmaktadır. Bu yapılan araştırmaların bazılarının sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Düşük sıcaklık, tuzluluk, ağır metal ve kuraklık gibi çevresel stresler, bitki büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyerek onların yapılarında bir dizi morfolojik, fizyolojik ve moleküler değişikliklere yol açmaktadırlar (Javadian *et al.* 2010).

Bitkilerde soğuk hasarının ilk etkilerinden biri, kök bölgesinden su alınımı ve transpirasyon arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanan gövde dehidrasyonudur (Vernieri *et al.* 2001). Bunun sonucunda, kökte olduğu gibi gövdede de büyüme hızı ve yaprak genişlikleri azalır. Daha şiddetli soğuk stresi ise hücrel otolizi ve senesensi artırır. Otoliz ve senesens tüm dokuda ya da dokuların yüzeyinde lezyonlara sebep olabilir. Fakat bu lezyonlar genellikle hücre hasarına bağlı olarak yaprak epidermisinde çukur ya da batık alanlar olarak görülmektedir. Soğuk stresi sırasında, ışıktaki fotooksidasyon sonucu klorofilin bozulması nedeniyle yapraklarda klorozis ve nekrozis görülür (Saltveit and Morris 1990; Pearce 1999).

Soğuk stresi bitkilerin hücre zarlarında dehidrasyon ve peroksidasyondan kaynaklanan ciddi hasarlara yol açar (Mahajan and Tuteja 2005). Özellikle lipid peroksidasyonu (Bailly *et al.* 1996; Kuk *et al.* 2003; Hu *et al.* 2006; Posmyk *et al.* 2009) ve dehidrasyon (Mahajan and Tuteja 2005) sonucu oluşan zar bütünlüğünün bozulması, soğuk stresinin bitkiler üzerindeki en önemli etkilerinden biridir. Soğukla muamele sırasında hücre zarının lipid içeriğinde bir dizi değişiklik meydana gelir. Düşük sıcaklıklar bitkide fotosentetik kapasitede de bir azalmaya sebep olmaktadır. Fotosentetik kapasitedeki bu azalmanın PSI'in aktivitesinde, PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliğinde, ATP sentezinde ve stroma enzim aktivitelerinde inhibisyonlar ile ve fotosentetik pigmentlerdeki degradasyonlar ile bağlantısının olduğu çeşitli çalışmalar sonucunda

ortaya konulmuştur (Venema *et al.* 2000; Allen and Ort 2001; Tambussi *et al.* 2004; Bertamini *et al.* 2006). Işıktaki düşük sıcaklığa maruz kalma sonucunda, PSI'nin verici bölgesinde oksijenin indirgenmesi ile süperoksit radikali veya uyarılmış klorofil molekülünün enerjisini oksijene transfer ederek singlet oksijen üretiminin artmasının, hücresel bileşenlerde oksidatif reaksiyonlara ve fotosentetik aparatlarda fotoinhibisyona neden olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (Wise 1995; Foyer *et al.* 2005; Hogewoning *et al.* 2010). Benzer şekilde düşük sıcaklığın proteinlerin denatürasyonuna ve yığılmalarına, DNA zincirlerinin kırılmasına ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olan ROT'ların (O_2^- , 1O_2 , H_2O_2 ve $\cdot OH$) oluşumuna neden olarak oksidatif hasarlara yol açtığı da bildirilmiştir (Bowler *et al.* 1992). Hücre zarı yapısındaki doymamış yağ asitlerinin yıkımı olarak bilinen LPO'nun soğuğa maruz kalmış bitkilerde miktarı artmaktadır (Cheng and Song 2006). Campos *et al.* (2003)'te yaptıkları çalışmada soğuğa maruz kalmış kahve bitkisinde LPO miktarının arttığını bulmuşlardır.

Abiyotik ve biyotik stresle karşılaşan tüm bitkilerde ROT miktarlarında artış görülmektedir. H_2O_2 , $\cdot OH$ ve O_2^- düşük sıcaklıkta ve çeşitli abiyotik stres şartlarına tepki olarak bitki tarafından üretilmektedir. Bitki hücreleri özellikle mitokondri, kloroplast ve peroksizomlarda antioksidan savunma sistemi elemanı olan SOD, CAT ve POX gibi enzimleri üretirler. Öncelikle bitkide üretilen SOD, O_2^- 'yi ortadan kaldırır. Yapılan çalışmada kışlık buğday ve yazlık buğdayda dondurucu olmayan soğukta antioksidan enzim aktivitesi artmaktadır (Sun *et al.* 2006). Soğuk stresine karşı toleransın artırılması amacıyla bitkiler antioksidan enzimler sentezlerler, bunlardan biri de POX'dur. Buğday bitkisinde soğuk artışında POX miktarı artmakta aynı zamanda soğuk şartlarında buğdayda SOD miktarı da artmaktadır. Bu artış ROT düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Apel and Hirt 2004; Nejadsadeghi *et al.* 2014).

CAT tetramerik yapıda olup, hem grubu içeren potansiyel olarak H_2O_2 'yi 1dk da 6 milyon molekül H_2O 'ya ve O_2 'ye dönüştürebilen enzimdir. Soğuk şartlarında buğday bitkisinde CAT enzim miktarı artış göstermiştir. Bununla beraber SOD enzim miktarı da aynı oranda artış göstermiştir (Scabba *et al.* 1998; Nejadsadeghi *et al.* 2014). APX

H₂O₂'nin enzimatik yıkımında görev alan bir enzimdir. Buğday, salatalık ve karpuz bitkilerinde soğuk stresinde POX ve APX enzim miktarlarında artış görülmüştür (Scebba *et al.* 1998).

Kışlık buğdayda soğuğa dayanıklılığa olan direnci artıran ve azaltan bileşiklerden biri de askorbik asittir. Yapılan bir çalışmada kışlık buğdayda askorbik asit miktarı fazla bulunmuştur (Andrews and Roberts 1961). Yapılan diğer bir çalışmada soğuğa hassas makarnalık buğday ve soğuk stresine toleranslı iki çeşit makarnalık ve ekmeklik buğday kullanılmıştır. Soğuk şartlarında toleranslı bitkilerde donma hasarını gösteren elektrolit sızıntı soğuğa hassas buğday bitkisine göre daha düşük bulunmuştur (Shahryar and Maali-Amiri 2016).

Heidarvand vd (2013)'in yaptıkları bir çalışmada ekonomik açıdan önemli olan bitki nohutta (*Cicer arietinum* L.) soğuk toleransı için fenotipik ve fizyolojik yöntemler kullanarak araştırma yapmak için, on nohut genotipinin tarla ve büyüme odası koşullarında soğuk uygulaması sonucu tepkileri analiz edilmiştir. Yüzde canlılık ve soğuk tolerans verileri, tarla koşullarında düşük sıcaklığa genotip toleransını tanımlayan en önemli indeks olduğu belirlenmiştir. Nejadsadeghi vd (2014)'nin yaptıkları bir çalışmada soğuk stresine toleranslı makarnalık ve ekmeklik buğday ile soğuk stresine hassas olan makarnalık buğday çeşitlerinde soğuk stresine karşı gösterdikleri fizyobiyokimyasal sonuçlar incelenmiştir. Soğuk stresine maruz kalan hassas buğday çeşitlerinde EL indeksi, H₂O₂ ve MDA seviyeleri soğuğa toleranslı olan buğday çeşidinde göre yüksek olduğu bulunmuştur. Reaktif oksijen türü (ROT) temizleme sistemleri, SOD, CAT, APX, POX ve prolin özellikle soğuk stresine uyum evresinden sonra soğuk stresinde toksik ROT düzeylerini azaltmada kritik öneme sahiptir. Bununla birlikte, bu sistemin farklı seviyeleri, soğuk stresine toleranslı ve duyarlı bitkilerde farklı oksidatif stres yoğunluklarına neden olmuştur. Bu yanıtlar makarnalık buğdayda soğuk toleransını artırmak için yapılan genetik çalışmalarla desteklenmiş ve hassas bitkilerin soğuğa duyarlılığı antioksidan sistemlerin azalması ile doğru orantılı olduğu bildirilmiştir (Nejadsadeghi *et al.* 2014). Hannah vd (2005)'in yaptıkları bir çalışmada, *Arabidopsis thaliana* gibi pek çok ılıman bitki türü soğuk aklimasyon denilen bir

süreçte düşük, dondurulmayan sıcaklığa maruz kaldıklarında donma toleransını artırabilmektedir. Bu işleme, gen ifadesinde karmaşık değişiklikler eşlik eder.

Taşkın (2012c)'in yaptığı bir çalışmaya göre, *Saccharomyces cerevisiae*'den GSH üretimi için bir substrat olarak tavuk tüyü protein hidrolizatının (tavuk tüyü pepton) kullanılabilirliğini araştırmıştır. Sonuçta, tavuk tüyü protein hidrolizatının GSH üretiminde substratı olarak kullanılabilmesi ileri sürülmüştür.

Gousterova vd (2012)'nin yaptıkları çalışmada, iki tür kentsel topraklardan yerli park toprak ve antropojenik toprak üzerine tüylü atıklardan elde edilen protein açısından zengin hidrolizatın toprak parametreleri (pH, bazı enzim aktiviteleri ve mikrobik aktivite), tohum çimlenmesi ve çimlendirilmiş bitki büyümesi ve bazı bitki patojen mantarlara karşı aktivitesi araştırılmıştır. Sonuçlarda, düşük konsantrasyonlarda organik çözeltiliyle yapılan zemin zenginleştirmesinin, toprak üreazı ve mikrobik aktivite üzerinde olumlu bir etki yaptığını, tohum çimlenmesi ve çim tohumlarının büyümesi ve bu eğilim antropojenik topraklarda daha iyi ifade edilmiştir. Tüyden elde edilen hidrolizat, bitki patojenik mantarlara karşı da iyi bir etki göstermiştir. Bu nedenle, *Thermoactinomyces* suşlarının hidrolitik yoluyla elde edilen tüy hidrolizatı, kirlenmiş toprakların restorasyonu ve çimlendirmenin hızlandırılması için alternatif organik bir madde olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu ileri sürülmüştür (Gousterova *et al.* 2012).

Popko vd (2015)'nin yaptıkları çalışmada kolza tohumunun (*Brassica napus*) çimlenmesinde kanatlı tüylerinin işlenmesinden elde edilen protein hidrolizat gübresinin etkisi incelenmiştir. Saksı deneyleri, keratin protein hidrolizatına dayalı gübrenin, bitki biyokütlesinin artışı üzerinde önemli bir etkisinin olduğunu göstermiştir. Bitkilerdeki azot, fosfor, potasyum ve magnezyum içeriği, hidrolizat uygulanmamış bitkilerle karşılaştırıldığında artmıştır. Bu hidrolizatla kullanıldığında, test edilen bitkilerde manganez ve çinko içeriği önemli ölçüde değiştirdiği gözlemlenmiştir.

Visconti vd (2015)'nin çalışmasında *Diospyros kaki* (Trabzon hurması) sulama suyunda ticari bir kalsiyum protein hidrolizatının toprak ve bitki üzerindeki etkisi ile *D. Lotus* (küçük meyveli Trabzon hurması) üzerinde aşılana hurma bitkileri ardışık iki mevsim boyunca incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda yaprak klorür içeriği azalırken, diğer faydalı elementlerin içerikleri kalsiyum protein hidrolizati uygulamalarında belirgin şekilde artmıştır. Bu etkiler, kalsiyum protein hidrolizati uygulanan bitkilerde daha düşük klorür, daha az yaprak nekrozu ve aynı zamanda yaprak su potansiyelinin de olduğu gözlemlenmiştir.

Schiavon vd (2008) mısırdaki trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ve azot metabolizması enzimlerinin gen ekspresyonu ve etkinliği üzerine yonca protein hidrolizatının etkileri incelediklerinde, bitki büyümesi ile yaprakta şeker birikimi artmıştır. Buna paralel olarak, nitrat seviyesi azalırken toplam N yüzdesi değişmemiştir. Yonca protein hidrolizatının, C ve N metabolik yollarının koordinat regülasyonu yoluyla bitkilerde azot asimilasyonunu teşvik edebileceğini ve protein hidrolizatları üzerinde N'nin kullanım verimliliğini artırmak için geçerli bir araç olarak daha fazla araştırma yapılmasının yolunu açtığını ortaya koymaktadır. Azevedo vd (2015)'nin yaptıkları bir çalışmada, sığır gübresi veya biyolojik gübrenin, malç varlığı veya yokluğundaki etkisini araştırmak için yapılmıştır. Sonuçta, gübre ve malç arasındaki etkileşim altında yetiştirilen börülce bitkilerinde daha yüksek fitokütle ve tane üretimi olduğu bulunmuştur. Cavani vd (2006)'nin yaptıkları bir çalışmada protein hidrolizat esaslı gübrelerin fotoensitivize edici özelliklerine bakılmıştır. Pestisitler veya herbisitler için protein hidrolizatlđ gübreleri kullanımı önerilmiştir.

Colla vd (2015b)'e göre; son yıllarda, bahçe bitkileri üretim sistemlerinin sürdürülebilirliğini iyileştirmek için yeni stratejiler önerilmiştir. Geleceđi umut verici bir araç olarak, bitki kalite parametrelerini, besin verimliliğini ve abiyotik stres toleransını artırabilen "biyostimulatörler" olarak tanımlanan doğal bileşiklerin ve/veya mikroorganizmaların kullanılması tavsiye edilmiştir. Biyostimulatörlerden protein hidrolizatları (PH), bitki biyolojik uyarıcıların önemli bir grubudur. Son yıllarda tarımsal bitkilerin performanslarına olan olumlu etkileri nedeniyle artan oranda dikkat

çeken bu çeşit peptidlerin ve amino asitlerin karışımı bitki verimliliğini artırabileceği gösterilmiştir. PH'lar ağırlıklı olarak hayvansal veya bitki kökenli hammaddelerdeki proteinlerin enzimatik veya kimyasal hidroliziyle üretilir.

Mukesh-Kumar vd (2012)'nin çalışmalarında *Bacillus sp.* kullanılarak elde edilen tüy protein hidrolizatının üretimi, optimizasyonu ve antioksidan potansiyeline bakılmıştır. Sonuçta *Bacillus sp.* ile muamele edilen tüyün sindirilebilirliği, antioksidan kapasitesi işlem görmemiş halinden yüksek olduğu bulunmuştur.

Taşkın vd (2012a)'nin çalışmalarında yeni izole edilmiş *Rhizopus oryzae* ile melas ve tavuk tüyü protein hidrolizatından oluşan L-laktik asit üretimini incelenmiştir. Mayaların özü ve amonyum sülfatın aksine, tavuk tüyü protein hidrolizatı, aşırı pH değişimlerini ve köpürmeyi önleme potansiyelinin yanı sıra fermantasyon sırasında daha küçük düzgün pelet oluşumu sağlamak için de potansiyele sahip olduğu ve bu özellikler sayesinde, hidrolizatın diğer iki azot kaynağından (maya özütü ve amonyum sülfattan) daha yüksek L-laktik asit üretimine neden olabileceği sonucuna varılmıştır. Taşkın vd (2012b)'nin bir çalışmasında da yenilebilir mantar *Morchella esculenta*'dan misel biyokütle ve ekstraselüler polisakaritler üretimi için alt tabaka olarak tavuk tüylü hidrolizatın kullanılabilirliğini araştırmak için yapılmıştır. Tavuk tüyü protein hidrolizatının yenilebilir mantar *M. esculenta*'da biyokütle ve ekstraselüler polisakarit üretim kabiliyeti, iki ticari pepton, tripton peptonu ve balık peptonu karşılaştırılmış ve tavuk tüyü hidrolizatından elde edilen ekstraselüler polisakarit konsantrasyonları daha yüksek bulunmuştur. Böylece tavuk tüyü hidrolizatının ekstraselüler polisakarit üretimi substratı olarak etkili bir şekilde kullanılabileceği gözlemlenmiştir.

Fakhfakh vd (2011)'in çalışmasında tavuk tüylerinin, bir keratinolitik bakteri, *Bacillus pumilus* ile fermantasyon ile ve yüksek antioksidatif aktiviteye sahip protein hidrolizat üretimiyle toplam çözünürlüğüne bakılmıştır. Sonuçta tavuk tüylerinin hayvan yemi formülasyonlarında yardımcı protein ve antioksidanlar olarak yararlı olabileceğini bulunmuştur.

Horii vd (2006)'nin yaptıkları çalışmada; balık protein hidrolizatlarının mısır, soya fasulyesi ve domates de tohum canlılığı ve fenolik bağlı tepkiler üzerine araştırma sonuçlarına bakılmıştır. Fenolik ve klorofil metabolizmalarının modülasyonu yoluyla fenolik bakımından zengin bitki türlerinde bitki büyümesi ve gelişimini (örn, tohum canlılığı) prolince zengin balık protein hidrolizatının etkisiyle arttığı bulunmuştur.

Memarpoor-Yazdi vd (2013)'nin çalışmasında hünnap meyvelerinden elde edilen protein hidrolizatların ve saflaştırılmış peptidlerin antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Bu çalışma, *Zizyphus jujuba* proteinlerinden türetilen hidrolizatların ve saflaştırılmış peptidlerin oksidatif reaksiyonları önleyebileceğini ve gıda muhafaza ve tıbbi amaçlar için yetersiz kalabileceğini ileri sürmüştür.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-20°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	: NUAIRE
Elektroforez	: BIORAD
Hassas terazi	: Shimadzu AY220
Karıştırıcı	: Fisons Whirlimixer
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Otomatik pipetler	: Ependhof, Axigen
pH metre	: Seven Compact
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1
Kuru blok inkübatör	: Allsheng
Sıcak su banyosu	: WiseBath Fuzzy Control System
EL cihazı	: Water Quality Tester
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini-1240
Western blot cihazı	: Bio-Rad Semi Dry Blotting
Western blot görüntileme cihazı	: Fusion Fx Vilber Lourmat

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Çalışmada kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Sigma-Aldrich şirketlerinden temin edilmiştir.

1. 0.1 M KH_2PO_4 (pH: 6.75) (Protein tayini için) : 3.4 gr KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH 6.5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
2. BCA reaktifi (protein tayini için) : 15 ml Bicionchonic asit 0.3 ml CuSO_4 ile karıştırılır.
3. 0.1 M KH_2PO_4 (pH: 6.75), %1 PVP, 1 mM EDTA (antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu): 3.4 gr KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH: 6.75'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmış ve üzerine 2.5 gr PVP ve 0.073 gr EDTA ilave edilmiştir.
4. 103.5 mM KH_2PO_4 , pH: 7.5 (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 1.41 gr KH_2PO_4 , 70 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e ayarlanmış ve hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
5. 40 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 346 μl %35'lik H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
6. 5 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan): 43 μl %35'luk H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
7. 0,1 M Na_2HPO_4 , pH: 5.5 (Peroksidazın aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3.55 gr Na_2HPO_4 alınarak 200 ml saf suda çözülmüş ve pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
8. Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi (5 mM guaikol + 5 mM H_2O_2): 54 μl quaikol ve 15 μl H_2O_2 'dan (d: 1.13 g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 ml 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.
9. 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8) (SOD için tampon çözelti): 1.7 gr KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra ve hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
10. 13 mM metionin çözeltisi (SOD reaksiyon karışımı için): 0.586 gr metionin alınır, 10. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
11. 63 μM NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür (SOD reaksiyon karışımı için): 0.0128 gr NBT alınır, 10. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.

- 12.** 0.1 mM EDTA-Etilen Diamin Tetra Asetik asit (SOD reaksiyon karışımı için): 0.073 gr EDTA alınır, 10. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 13.** 13 μM riboflavin (SOD aktivitesi için 2. çözelti): 0.019 gr riboflavin, 500 ml saf suda çözülmüş, 3 ml'lik reaksiyon karışımının 13 μM riboflavin içermesi için 390 μL riboflavin alınmıştır.
- 14.** %0.1 lik TCA-trikloroasetik asit (Lipid peroksidasyon için homojenizasyon çözeltisi) : 100 ml saf su içerisine 0.1 gr TCA ilave edilerek çözülür.
- 15.** %0.5'lik TBA-tiobarbutirik asit (Lipid peroksidasyon için reaksiyon çözeltisi): 100 ml saf su içine 20 gr TCA çözülür ve daha sonra içerisine %0.5 TBA ilave edilerek iyice çözünmesi sağlanır.
- 16.** Monomer (akrilamid/bis) çözeltisi (%30 akrilamid, %2.7 bis): 29.2 gr akrilamid 75 ml saf suda çözülür, çözeltiye 0.8 gr bis katılıp çözülür. Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
- 17.** Ayırma jeli tamponu (1.5 M Tris, pH: 8.8) : 18.15 gr tris 50 ml saf suda çözülür. HCl ile pH: 8.8'e ayarlanır. Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.
- 18.** Yükleme jeli tamponu (0.5 M Tris, pH: 6.8) : 3 gr tris 40 ml saf suda çözülür. HCl ile pH 6.8'e ayarlanır. Saf su ile 50 ml'ye tamamlanır.
- 19.** %10 SDS: 1gr SDS son hacim 10 ml olacak şekilde saf suda çözülür.
- 20.** %10 Amonyum persülfat (polimerizasyon başlatıcı) : 0.05 gr amonyum persülfat son hacim 500 μl olacak şekilde saf suda çözülür.
- 21.** Örnek uygulama tamponu (0.125 M Tris, %4 SDS, %20 gliserol, %10 2-merkaptotanol, %0.2 bromfenol mavisi pH: 6.8): 2.5 ml yükleme jeli tamponu, 4 ml %10 SDS, 2 ml gliserol, 1 ml 2-merkaptotanol alınıp son hacim 10 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır, pH: 6.8'e ayarlanır. Karışıma 0.02 gr bromfenol mavisi katılarak karıştırılır. Kullanılacak hacimlere bölünüp -20°C 'de saklanır.
- 22.** Tank tamponu (0.025 M Tris, 0.192 M glisin, %0.1 SDS, pH: 6.8) : 3 gr Tris, 14.4 gr Glisin, 1 gr SDS alınır. 900 ml saf suda çözülerek pH 6.8'e ayarlanır. Son hacim 1000 ml'ye saf su ile tamamlanır.
- 23.** Boyama substrat çözeltisi (SOD izoenzimleri için) (0.24 mM NBT, 33.2 μM riboflavin, %0.2 TEMED, 1 mM EDTA, 0.05 M KH_2PO_4 pH 7.8): 0.0098 gr NBT, 100 μl TEMED, 0.147 gr EDTA, 0.345 gr KH_2PO_4 40 ml saf suda çözülüp pH: 7.8'e

ayarlanır. 1 ml saf su içerisinde 0.0062 gr riboflavin çözülür ve 100 µl'si boyama substrat çözeltisine katılır. Çözeltinin son hacmi 50 ml'ye saf su ile katılır.

24. 1 mM EDTA, 0.05 M KH_2PO_4 pH 7.8 (SOD izoenzimleri için): 0.147 gr EDTA, 0.345 gr KH_2PO_4 40 ml saf suda çözülüp pH 7.8'e ayarlandıktan sonra son hacim 50 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır.

25. 2 mM askorbik asit, 50 mM Na_2HPO_4 (APX izoenzimleri için): 0.0352 gr askorbik asit, 1.34 gr Na_2HPO_4 80 ml saf suda çözülür ve pH 7'ye ayarlanır. Son hacim 100 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır.

26. 4 mM askorbik asit, 2 mM H_2O_2 , 50 mM Na_2HPO_4 (APX izoenzimleri için): 2mM askorbik asit çözeltisinden 50 ml alınır üzerine 0.0176 gr askorbik asit ve 10 µl %35 H_2O_2 katılıp iyice karıştırılır.

27. 28 mM TEMED, 2.4 mM NBT, içeren 50 mM Na_2HPO_4 (pH 7.8) tamponu (APX izoenzimleri için): 105 µl TEMED, 0.0491 gr NBT, 0.335 gr Na_2HPO_4 20 ml saf suda çözülerek pH 7.8'e ayarlandıktan sonra son hacim 25 ml'ye saf su ile tamamlanır.

28. 0.25 mM NADPH çözeltisi hazırlamak için (GR aktivitesi için) : 0.0022 gr NADPH 10 ml saf su içerisinde çözülür.

29. 1 mM oksitlenmiş glutatyon (GSSG) (GR aktivitesi için) 0.0061 gr GSSG, 10 ml saf su içerisinde çözülür.

30. 0,5 mM EDTA (GR aktivitesi için) 0.0014 gr EDTA 10 ml saf su içerisinde çözülür.

31. 50 mM Tris-HCl (GR aktivitesi için) 0.06 gr Tris bir miktar saf su içerisinde çözülür, sonra pH:7.8'e ayarlanır ve son hacim 10ml'ye tamamlanır.

32. %5'lik TCA (homojenizasyon için) 1 gr TCA 10 ml saf su içerisinde çözülür.

33. 200 mM Na_2HPO_4 (GSH içeriği belirlemek için) 0.238 gr Na_2HPO_4 bir miktar saf su içerisinde çözülür ve pH:7.5'e ayarlanır. Son hacim 10 ml ye tamamlanır.

34. 50 mM Na_2 -EDTA (GSH içeriği belirlemek için) 0.186 gr Na_2 -EDTA 10ml saf su içerisinde çözülür.

35. 2 mM β -NADPH (GSH içeriği belirlemek için) 0.016 gr 10 ml saf su içerisinde çözülür.

36. 6 mM DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) (GSH içeriği belirlemek için) 0.023 gr saf su içerisinde çözülür.

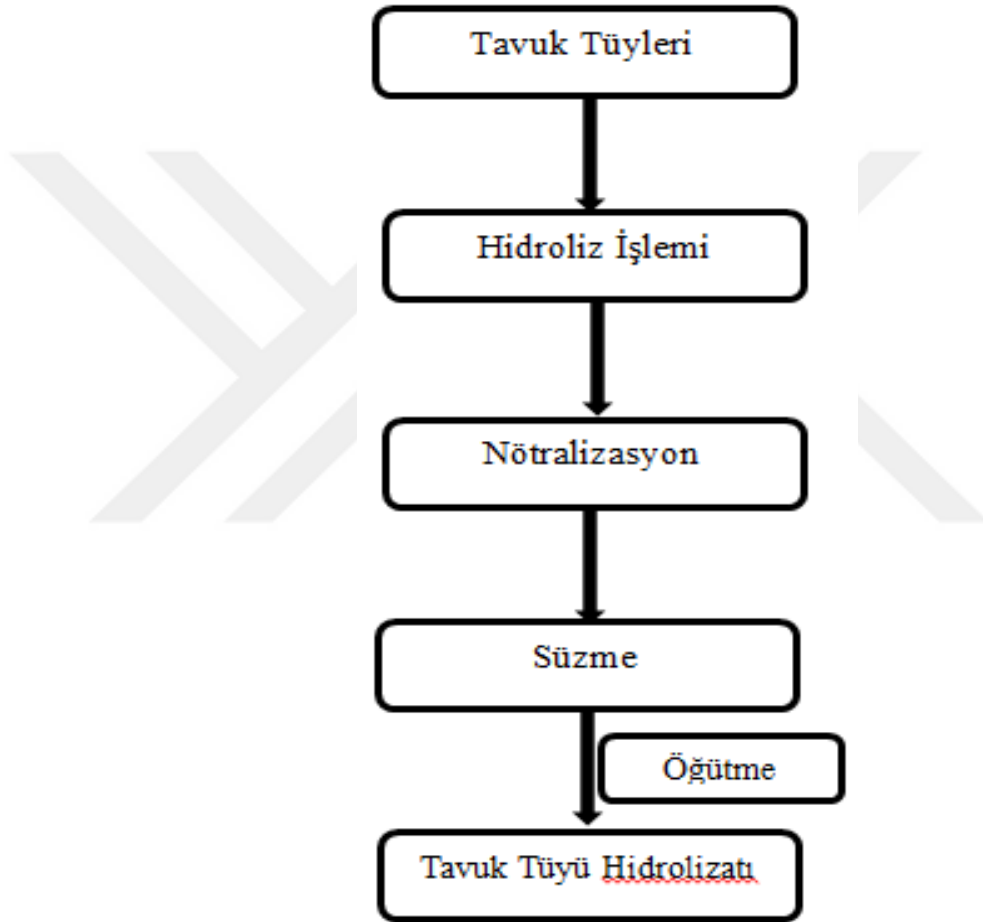
37. 60 mM KH_2PO_4 (süperoksit metodu için homojenizasyon çözeltisi) 0.081 gr KH_2PO_4 bir miktar suda çözülür. pH 7.8'e ayarlanır ve son hacim 10 ml'ye tamamlanır.
38. 10 mM hidroksilamin (süperoksit içeriği için) 0.0069 gr hidroksilamin 10 ml saf su içerisinde çözülür.
39. 17 mM sülfamid (süperoksit içeriği için) 0.029 gr sülfamid 10 ml saf suda çözülür.
40. 7 mM naftilamin (süperoksit içeriği için) 0.01 gr naftilamin 10 ml saf su içerisinde çözülür.
41. %3'lük sülfosalisilik asit (prolin metodu için homojenizasyon çözeltisi) 0.3 gr sülfosalisilik asit 10 ml saf su içerisinde çözülür.
42. Asit ninhidrin hazırlanışı (prolin içeriği için) 1.25 gr ninhidrin 30 ml asetik asit ve 20 ml fosforik asit içerisinde çözülür.
43. 2.5 N HCl (total karbohidrat içeriği için homojenizasyon çözeltisi) 35 ml için 7.25 ml HCl alınır üzeri 35 ml'ye tamamlanır.
44. Antron çözeltisi için: 200 mg antron 100 ml soğuk %95'lik sülfirik asit içerisinde çözülür.
45. Transfer tamponu (Western blotlama için): 25mM tris (pH: 8.3), %20 metanol, 192 mM glisin ve 5 ml %10'luk SDS saf suya katılarak iyice çözülür.
46. PBST tamponu: 137 mM NaCl, 2.37 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 (pH: 7.4) hazırlanmış olan 1×PBS'ye %2 süt tozu ve %0.1 Tween-20 eklenir ve iyice çözülür.

3.3. Yöntemler

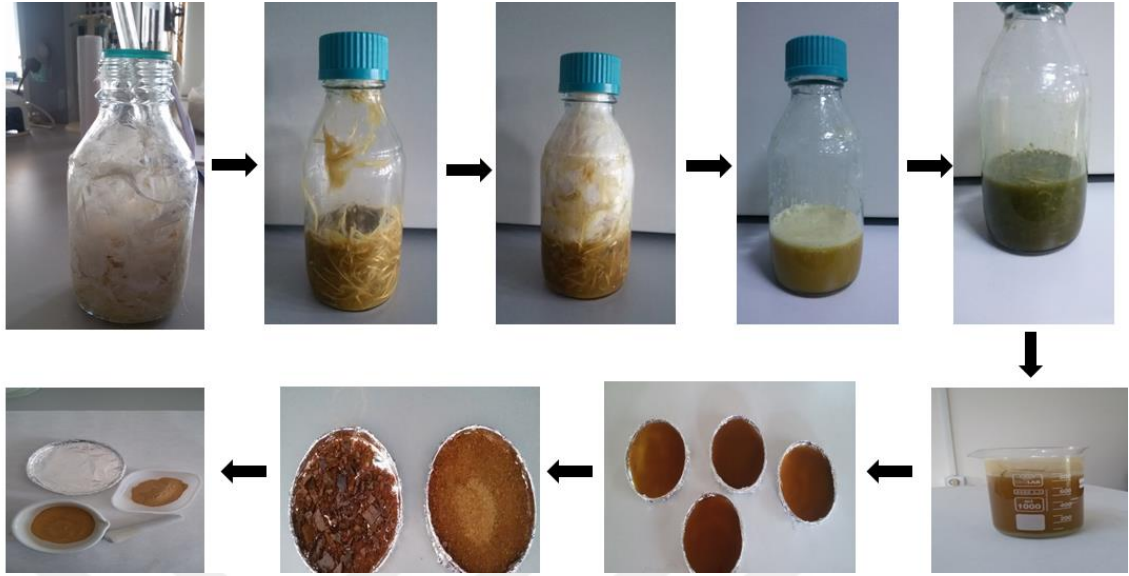
3.3.1. Tavuk tüyü protein hidrolizatının hazırlanması

Tavuk tüyü protein hidrolizatı Taşkın ve Kurbanoglu (2011) metodu revize edilerek yapılmıştır. Bunun için ilk olarak tavuk tüyleri sabit ağırlığa gelinceye kadar 100°C'de kurutuldu. Kurutulan tavuk tüylerinin 80 gramı hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Tavuk tüylerinin 80 gramı yüksek sıcaklığa dayanıklı ağzı kapatılabilir bir cam kap içerisine konulup üzerine 150 ml 2 N KOH eklendi. Hidroliz işlemi 2 basamakta gerçekleştirildi. İlk basamak 24 saat süreyle 80°C'de, ikinci basamak ise 110°C' gibi

daha yüksek bir sıcaklıkta 4 saat süreyle gerçekleştirildi. Elde edilen bazik karışım daha sonra yaklaşık 4 ml derişik H_3PO_4 çözeltisiyle nötrale edildi ve ardından süzme işlemine tabi tutuldu. Sonra hidroliz olmayan kısımların uzaklaştırılması sağlandı ve hidrolizat çözeltisi un haline gelinceye kadar kurutuldu ve saklandı. Elde edilen bu final karışım tavuk tüyü hidrolizatı (TTH) olarak adlandırıldı. (Şekil 3.1 ve 3.2).



Şekil 3.1. Tavuk tüyü hidrolizatı hazırlanmasının şematik gösterimi



Şekil 3.2. Tavuk tüyü hidrolizatının hazırlanması aşamaları

3.3.2. Aminoasit içeriğinin belirlenmesi

Hidrolizat işleminde un haline getirilen ekstraktan 10 gr aminoasit içeriğinin belirlenmesi için kullanıldı. Aminoasit içeriğinin belirlenme çalışması için Düzen Norwest (Çevre, Gıda, ve veteriner sağlık Hizmetleri Eğitim ve danışmanlık Tic. A.Ş., Ankara) laborauvardan hizmet alımı yapılmıştır. Bunun için EZ:hızlı aminoasit analiz kiti kullanılmıştır (Phenomenex Inc., Torrance, California, USA) on a Varian CP-3800 gas chromatograph (Varian Inc., PaloAlto, California, USA).

3.3.3. Bitkilerin büyütülmesi

Bu araştırmada buğday (*Triticum aestivum*) bitkisinin Altındane ve Bezostaya olarak iki çeşidi kullanıldı. Bunlardan Bezostaya çeşidi soğuğa dirençli olup, Altındane ise nisbeten soğuğa duyarlı bir çeşittir. Çeşitlere ait tohumlar Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü ve Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Tohumlar ekilmeden önce %96'lık alkol ile kısa süreli hızlıca yıkanmış ve %5'lik ticari sodyum hipoklorit içerisinde 5 dk yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Tohumlar, 3 kez saf su ile yıkanarak, oda şartlarında saf su içerisinde yaklaşık 5 saat şişmeye

bırakılmıştır. Daha sonra hazırlanan kum+torf karışımı (3:1) olan topraklar saksılara doldurularak her saksıya saf su ile şişirilmiş tohumlar eşit miktarda ekilmiştir. Bitkiler iklim odasında kontrol şartlarında (23/20°C sıcaklık ve 14/10 saat ışık-karanlık periyodunda 20.000 lüks, %70 nem) büyütülmüştür. Her saksıdaki fideler hasat eileceği güne kadar, günlük eşit miktarda saf su ve haftada bir kez de Hoagland besi çözeltisiyle sulanmıştır. Saksılardaki fidelere 11. gün üç değişik konsantrasyonda tavuk tüyü protein hidrolizati (TTH) uygulamaları yapılmıştır. Uygulama TTH çözeltilerinin yapraklara püskürtülmesi suretiyle gerçekleştirilmiştir. Kontrol bitkilerine aynı hacimde saf su uygulanmıştır. Bu maddelerin uygulanmasından 6 saat sonra bitki grupları ayrılmış ve soğuk uygulanacak gruplar, soğuk iklim odasına transfer edilmiştir. Bunun için Kontrol ve sadece TTH uygulanan gruplar 23/20°C'deki iklim odasına, soğuk uygulanacak gruplar ise 5/2°C olarak ayarlanmış iklim odasına transfer edilmiş ve bitkiler, 72 saat sonra hasat edilerek fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerindeki değişimler belirlenmeye çalışılmıştır.

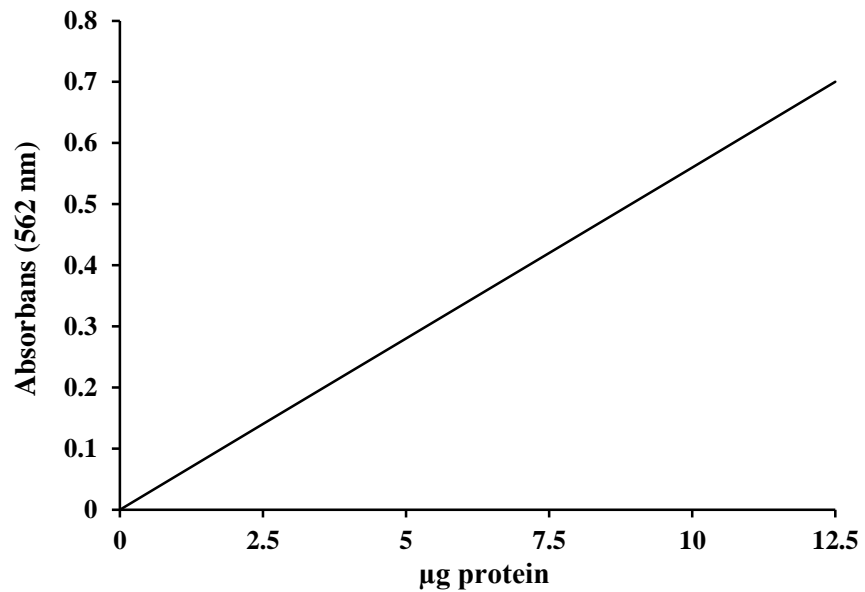
3.3.4. Elektrolit kaçağının belirlenmesi (Donma Hasarı)

Uygulama yapılmış ve kontrol grubu bitki yapraklarında elektrolit sızıntısı ölçülerek, uygulamaların donma hasarını engellemedeki rolü tespit edildi. Bu deneyde: 16 tüpün her birine 0.1 g taze yaprak örneği konuldu ve bu tüpler, -14°C'ye kadar ayarlanabilen bir su banyosuna (donmayı önlemek için su ile karışık alkol içerir) topluca yerleştirildi. Daha sonra bütün tüpler, 0'dan -14°C'ye kadar, her bir derecede 10 dk tutuldu ve her bir dereceden sonra banyodan bir tüp alındı. Banyodan alınan her bir tüpün içine 4 ml saf su konuldu ve bu tüpler 4°C'de 24 saat bekletildi. Daha sonra tüplerin içerisindeki saf suya geçen iyon miktarı, bir elektrik kondüktivimetre ile ölçülerek değerler % olarak donma hasarına çevrildi (Griffith *et al.* 1992; Taşgın *et al.* 2003).

3.3.5. Çözünabilir protein miktarının belirlenmesi

Yapraklar (0.5 gr) önce sıvı azotta iyice ekstrakte edildi ve un haline gelen ekstrakt 4 kat hacimdeki 0.1 M fosfat tamponunda (pH: 6.75) havanda iyice ezilerek

homojenizasyon tamamlandı. Daha sonra homojenat 15.000 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Protein tayini için elde edilen berrak süpernatant kullanıldı. Protein miktarı spektrofotometrik olarak tayin edildi. Bu süpernatantlar önce tamponla seyreltildi ve seyreltilmiş özütten, 20 µl alınıp, 200 µl BCA (Bicinchonic asit+CuSO₄) reaktifıyla karıştırıldı ve karışım bir kuru blok ısıtıcı içinde 60°C'de 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası oda ısısına gelen örneklerin absorbansları bir mikropate spektrofotometrede 562 nm'de köre karşı okundu. Köre örnek yerine 20 µl saf su kullanıldı. Daha sonra, gerekli hesaplamalar standart grafik üzerinden yapılarak protein miktarları µg protein/gr doku olarak tayin edildi. Örneklerdeki protein miktarını hesaplamak için gerekli standart grafik şu şekilde hazırlandı; 1 ml'sinde 1 mg saf protein içeren standart sığır albümin (BSA) çözeltisinden 0, 2.5, 5, 7.5, 10 ve 12.5 µg protein içeren hacimler mikropatadaki kuyucuklarına yüklendi ve bütün tüplerin hacimleri saf su ile 20 µl'ye tamamlandı. Bu tüplerin her birine 200 µl BCA reaktifi ilave edilip karıştırıldı. Kör numune olarak 200 µl BCA reaktifi ve 20 µl saf su kullanıldı. Hazırlanan plate 60°C'de 15 dk inkübe edildi ve sonra platteki örneklerin absorbansları 562 nm'de köre karşı okundu. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, 562 nm'deki absorbans değerlerine karşılık gelen protein miktarları kullanılarak bir standart grafik elde edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Protein tayini için kullanılan standart grafik

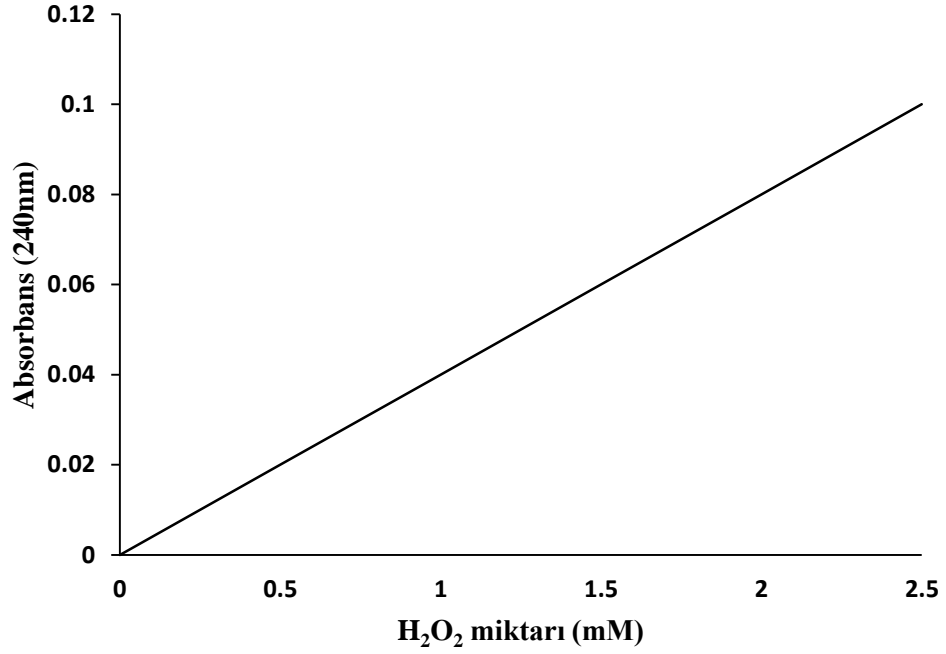
3.3.6. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Yaprak örnekleri (0.5 gr) önce bir porselen havan içinde sıvı azotta iyice ekstrakte edildi ve un haline gelen ekstrakt 5 ml 0.1 M KH_2PO_4 (pH: 6.75), %1 PVP, 1 mM EDTA tamponu içinde homojenize edildi. Daha sonra homojenat 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım dikkatlice alınarak çalışmalarda enzim kaynağı olarak kullanıldı. Bütün işlemler $+4^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirildi.

3.3.6.a. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için Gong vd (2001) tarafından önerilen metot kullanıldı. Bu metot, katalazın ortamdaki H_2O_2 'nin oksijen ve suya dönüşümü esnasında meydana gelen absorbans değişiminin 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır.

Önce reaksiyonda azalan H_2O_2 miktarını belirlemek için standart grafik hazırlandı (Şekil 3.4). Standart grafik hazırlamak için, 5 mM H_2O_2 çözeltisinden 3 ml'lik spektrofotometre tüplerine sırasıyla; 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 ve 1.5 ml ilave edildi ve tüplerin hacimleri saf su ile 1.5 ml'ye tamamlandıktan sonra her tüpe 1.47 ml 103.5 mM KH_2PO_4 ve 30 μl su ilave edildi. Hazırlanan karışımın absorbansı spektrofotometrede 240 nm'de köre karşı okunur ve absorbans değerlerine karşılık gelen μM H_2O_2 değerleri kullanarak standart grafik elde edildi. Aktivite ölçümü için 3 ml'lik spektrofotometre küvetine, 103 mM KH_2PO_4 tamponundan 1.475 ml ve 40 mM'lık H_2O_2 substrat çözeltisinden 1.5 ml konulduktan sonra, 30 μl enzim ekstraktı ilave edildi. Spektrofotometrede 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okundu ve absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik (Şekil 3.4) yardımıyla mM cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürüldü. 25°C 'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 μmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi ve sonuçlar mg protein başına düşen enzim ünitesi ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein) olarak sunuldu.



Şekil 3.4. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik

3.3.6.b. Peroksidaz (POX) aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POX) aktivite tayini, guaikol ve H₂O₂'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır.

Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 5 mM guaikol ve 5 mM H₂O₂ içeren 0.1 M'lık NaH₂PO₄ (pH: 5.5) substrat çözeltisinden 3 ml konulduktan sonra, üzerine 10 µl enzim ekstraktı ilave edildi. 470 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedildi ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlandı. 25°C'de 1 dakikada absorbansı 0.01 artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi ve sonuçlar mg protein başına düşen enzim ünitesi (U.mg⁻¹ protein) olarak sunuldu (Yee *et al.* 2002).

3.3.6.c. Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanır (Agarval and Pandey 2004; Yordanova *et al.* 2004).

Reaksiyon karışımı (3 ml); 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 63 μM NBT, 13 μM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 3 ml spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2.58 ml alınıp üzerine 30 μl enzim ekstraktı pipetlendi. Reaksiyon, tüp üzerine 13 μM 'lık riboflavin çözeltisinden 390 μl pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatıldı. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk tutuldu ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durduruldu. 15 dk içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okundu. Kör; aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi ve değerler $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein olarak sunuldu.

3.3.6.d. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayini

Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de absorbansdaki azalışa bağlı olarak belirlendi (Nakano and Asada 1981). Enzim aktivitesi, 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH: 7.0), 250 μM askorbik asit (ASA), 5 mM H_2O_2 ve 100 μl enzim ekstraktı içeren 3.1 ml'lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlendi. Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de ASA için $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein olarak ifade edildi.

3.3.6.e. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tayini

Glutasyon redüktaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Foyer ve Halliwell (1976)'e göre belirlendi. Substrat olarak 0.25 mM NADPH ve 1 mM oksitlenmiş glutasyon (GSSG) kullanıldı. Yükseltgenmiş glutasyonun enzim tarafından indirgenmesi için indirgeyici faktör olarak NADPH kullanıldı. Aktivite tayini için, 200 µl 0.5 mM EDTA içerisinde hazırlanmış 50 mM Tris-HCl (pH: 7.8), 250 µl GSSG ve 500 µl NADPH ihtiva eden karışıma 50 µl enzim ekstraktı ilave edildi. NADPH'ın oksidasyonu 340 nm'de 5 dakika boyunca azalmanın ölçülmesiyle belirlenir. GR aktivitesi $U \cdot mg^{-1}$ protein olarak ifade edildi.

3.3.7. Enzimatik olmayan antioksidanların içeriklerinin belirlenmesi

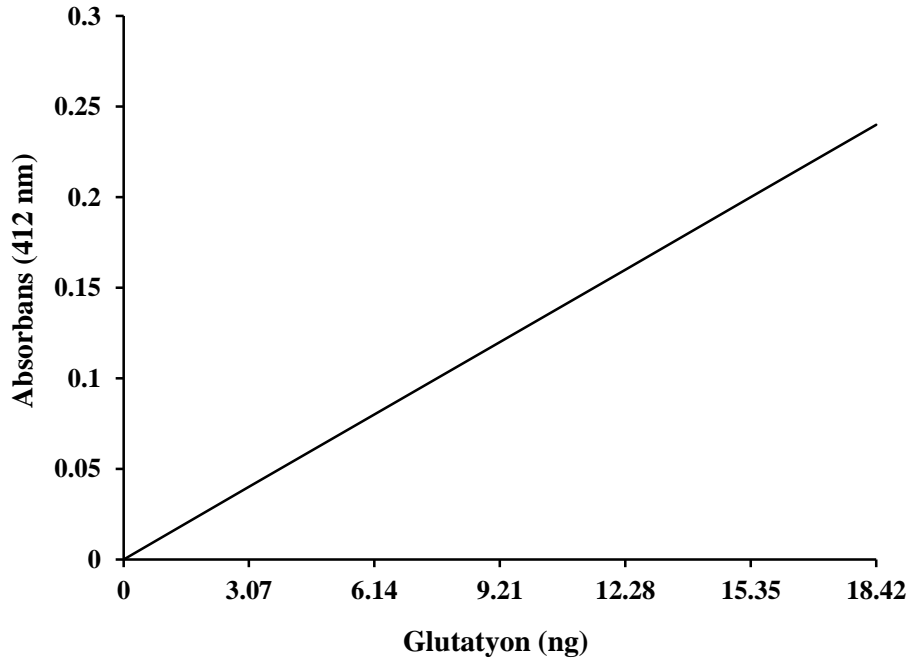
3.3.7.a. Glutasyon ve askorbik asit ekstraksiyonu

Sıvı azot içerisinde un haline getirilmiş yapraktan alınan 0.2 gr doku 2 ml %5'lik TCA içerisinde homojenize edildi. Ekstrakt 4°C'de 12.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant glutasyon ve askorbik asit içeriğinin belirlenmesinde kullanıldı.

3.3.7.b. Glutasyon (GSH) ve GSSG içeriğinin belirlenmesi

Glutasyon içeriği Hodges vd 1996 metodunun Wu vd (2009) tarafından modifiye edilmiş protokolüne göre belirlendi. Glutasyon içeriğini belirlerken 0.1 ml süpernatant tampon (%5'lik) TCA ile 3 kat seyreltildi ve üzerine 38.7 µl K_2CO_3 (1.25 M) ilave edildi. Karışım 12.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Total GSH içeriğini belirlemek için 0.1 ml süpernatant, 0.5 ml sodyum fosfat (200 mM pH:7.5), 0.1 ml Na_2EDTA (50 mM), 0.1 ml β -NADPH (2 mM), 0.1 ml DNTB (6 mM), 0.1 ml GR enzimi 0.2 ml sodyum fosfat tamponunda seyreltildi ve 15 µl alınıp karışıma ilave edip karıştırıldı. Sonra 30°C'de 5 dakika 412 nm'deki absorbans değişimleri kaydedildi. GSSG içeriğini belirlemek için ise 0.1 ml süpernatant alınarak üzerine 2 µl 2-Vinylpyridine eklendi ve 1 saat 25°C'de inkübe edildi. Tam 1 saatin sonunda total GSH içeriği belirlenirken

kullanılan çözeltiler aynen eklendi ve 412 nm'deki absorans değişimleri ölçüldü. GSH içeriği standart grafikten (Şekil 3.5) yararlanılarak gram dokudaki ng cinsinden hesaplandı.

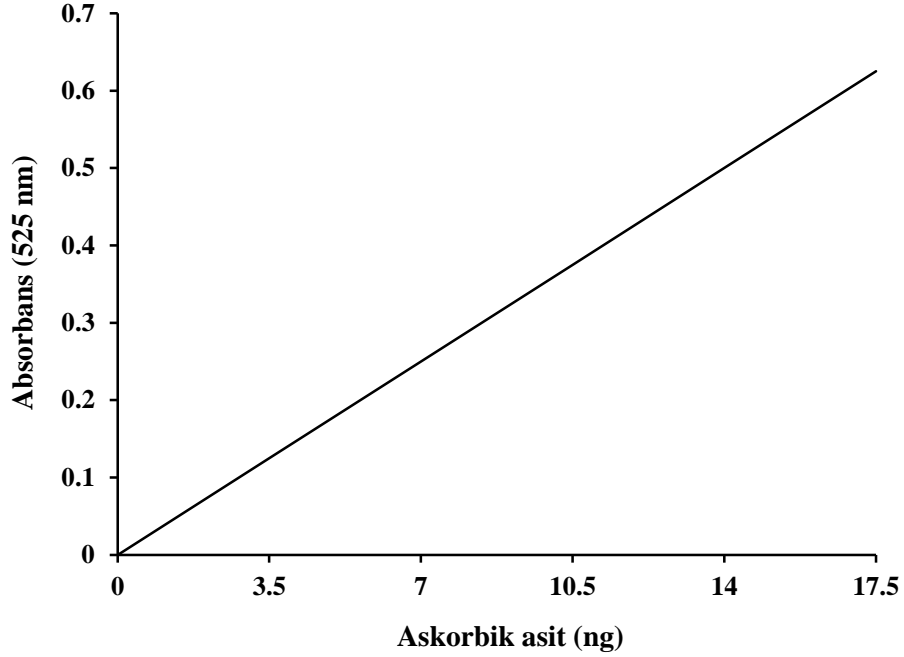


Şekil 3.5. Glutasyon içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.7.c. Askorbik asit (AsA) içeriğinin belirlenmesi

Ascorbik asit içeriği Low vd (1983) ve Costa vd (2005) yöntemine göre belirlendi. Bu metoda göre 0.2 gr yaprak dokusu 2 ml %5'lik TCA içerisinde homojenize edildi. Homojenat 12.000xg de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 400 µl alınarak üzerine 10 µl 5 M NaOH eklendi ve 3.500xg'de 2 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant ikiye ayrıldı. Birinci gruba 200 µl süpernatant, 200 µl 150 mM NaH₂PO₄ (pH: 7.4), 200 µl saf su eklendi. İkinci gruba ise 200 µl süpernatant, 200 µl 150 mM NaH₂PO₄ (pH: 7.4), 100 µl 10mM DTT ve 100 µl %0.5 N-ethylmaleimide eklendi. Her iki tüp iyice karıştırıldıktan sonra 1 dk bekletildi ve üzerlerine sırayla; 400 µl %10'luk TCA, 400 µl %44'lük H₃PO₄, 400 µl %4'lük 2-bipyridyl ve 200 µl %3'lük FeCl₃ eklendi. Karışım vortekslendikten sonra 37°C'de bir saat inkübe edildi. Daha sonra 525

nm' de absorbands değerleri belirlendi. Birinci grup indirgen AsA'yı verirken, 2. grup Total AsA'yı verir. Total AsA'dan indirgen AsA'yı çıkartarak DHA (dehidroaskorbat) hesaplanır. Askorbik asitin konsantrasyonu standart grafikten (Şekil 3.6) gram dokudaki ng cinsinden sunuldu.



Şekil 3.6. Askorbik asit içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.8. Lipid peroksidasyon miktarının belirlenmesi

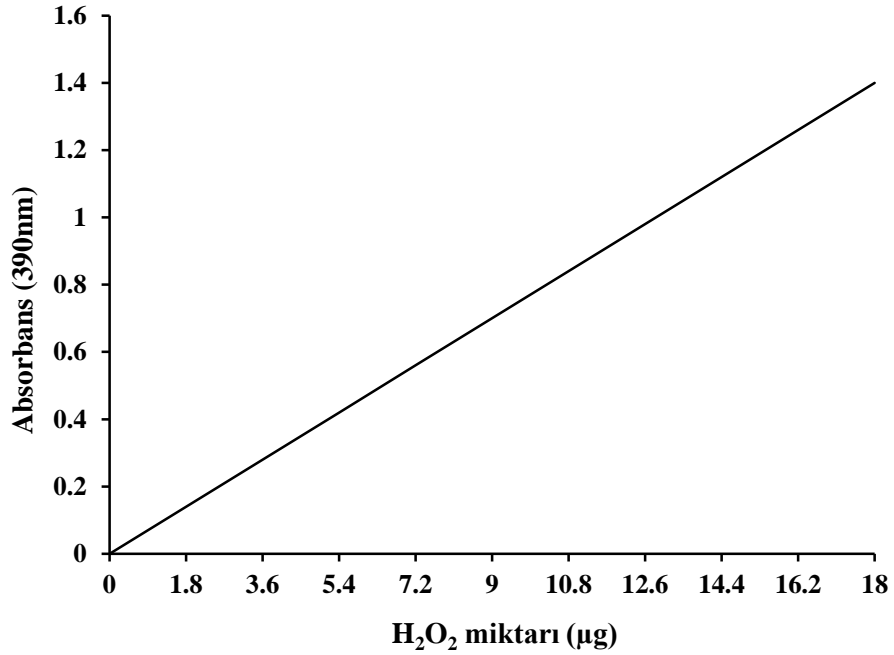
Lipid peroksidasyonu (MDA olarak) belirlenmesi Velikova vd 2000 metoduna göre yapıldı. LPO için 0.4 gr öğütölmüş yaprak alınarak 4 ml %0.1'lik TCA içinde homojenize edildikten sonra homojenat 13.800 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 1 ml alınarak üzerine 1 ml %0.5'lik TBA çözeltisi ilave edildi. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika inkübe edildi ve sonra reaksiyon, tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durduruldu. Örnekler 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı alındı ve 532 nm absorbands değeri ile 600 nm deki non-spesifik absorbsiyon için absorbands değeri okundu.

Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm'de belirlenen değeri çıkarıldı ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/ μ l): $[(A_{532}-A_{600})/155000] \times 10^6$ formülüyle hesaplandı. Sonuçlar MDA (nmol. gr⁻¹ doku) şeklinde verildi (Heath and Packer 1968; Jaleel *et al.* 2007)

3.3.9. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi

Bunun için 0,4 gram bitki dokusu alınarak 4 ml soğuk %0.1 TCA içinde homojenize edildikten sonra homojenat 13.800 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Daha sonra elde edilen süpernatantın 0.5 ml'sine 0.5 ml 10 mM KH₂PO₄ (pH: 7.0) tamponundan ve 1 ml KI çözeltisi eklendi. Absorbans değerleri 390 nm'de ölçülüp kaydedildi. Sonuçlar standart grafiklerle oranlanarak gr doku başına düşen H₂O₂ miktarı (μ g.gr⁻¹ doku) olarak hesaplandı (Velikova *et al.* 2000).

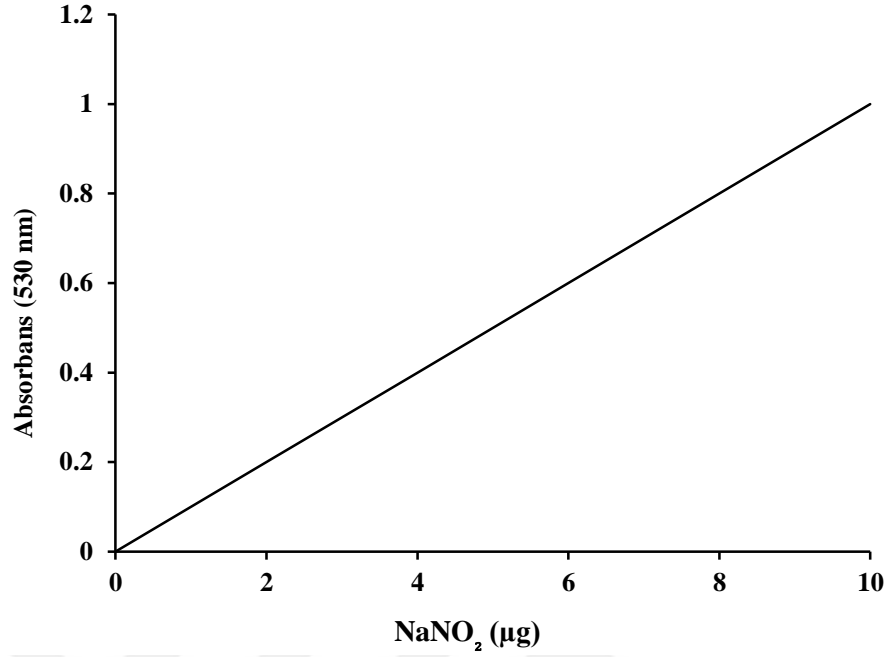
Standart grafiği hazırlamak için, H₂O₂ çözeltisinden ependorf tüplerine sırasıyla; 1.8, 3.6, 5.4, 7.2, 9, 10.8, 12.6, 14.4, 16.2 ve 18 μ g H₂O₂ olacak şekilde hesaplanarak ilave edildi. Tüpün hacmi 1 ml olacak şekilde 10 mM KH₂PO₄ (pH: 7.0) tamponu ile tamamlandı. Daha sonra her tüpe 1 ml KI ilave edildi. Absorbans değerleri 390 nm'de köre karşı okundu. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram H₂O₂ değerleri kullanarak standart grafik elde edildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.10. Süperoksit anyonu (O₂^{·-}) içeriğinin belirlenmesi

Süperoksit anyonu içeriği Elstner ve Heupel (1976) tarafından önerilen metodo göre belirlendi. Bitki yapraklarından 0.4 gr alınarak 2 ml 60 mM potasyum fosfat tamponunda (pH: 7.8) homojenize edildi. Homojenat 12 dakika 12500 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatanttan 0.5 ml alınarak üzerine 0.5 ml 60 mM potasyum fosfat (pH: 7.8) tamponundan eklendi. Daha sonra karışıma 0.1 ml 10 mM hidroksilamin hidroklorid eklenerek karıştırıldı. Karışım 1 saat 25°C'de inkübe edildikten sonra üzerine 1 ml 17 mM sülfonamid ve 1 ml 7 mM α-naftilamin eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra 530 nm'de spesifik absorbans değerleri belirlendi. Süperoksit anyonu içeriğini hesaplamak için NaNO₂ kullanılarak standart grafik hazırlandı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Süperoksit anyon (O₂^{•-}) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.11. Total klorofil içeriğinin belirlenmesi

Buğday bitkisinin yapraklarındaki klorofil a, klorofil b, karotenoid ve toplam pigment miktarlarını belirlemek için Witham vd (1971) tarafından önerilen prosedür uygulandı. Taze yaprak örnekleri (0,2 gr) %80'lik soğuk aseton içerisinde son hacim 10 ml olacak şekilde homojenize edildi. Daha sonra homojenat filtre kağıdından süzülerek elde edilen ekstrakt 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Tüplerden süpernatantlar alınarak 450, 645 ve 663 nm'de absorbans değerleri kaydedildi. Süpernatantların üç farklı dalga boyunda kaydedilen absorbans değerleri aşağıda verilen eşitliklerde yerine konulmasıyla bitki yaprak dokusunun 1 gr'ında bulunan klorofil a, klorofil b, total klorofil ve karotenoid miktarları hesaplandı ve mg/doku olarak sunuldu.

$$\text{mg/klorofil a/gr doku} = ((12,7 * (D663) - 2,69 * (D645)) * (V/1000 * W))$$

$$\text{mg klorofil b/gr doku} = ((22,9 * (D645) - 4,68 * (D663)) * (V/1000 * W))$$

$$\text{mg toplam klorofil/gr doku} = ((20,2 * (D645) + 8,02 * (D663)) * (V/1000 * W))$$

mg toplam karotenoid/gr doku= $(4,07 \cdot D_{450}) - (0,0435 \cdot \text{kl a miktarı} + 0,367 \cdot \text{kl b miktarı})$

Eşitliklerde;

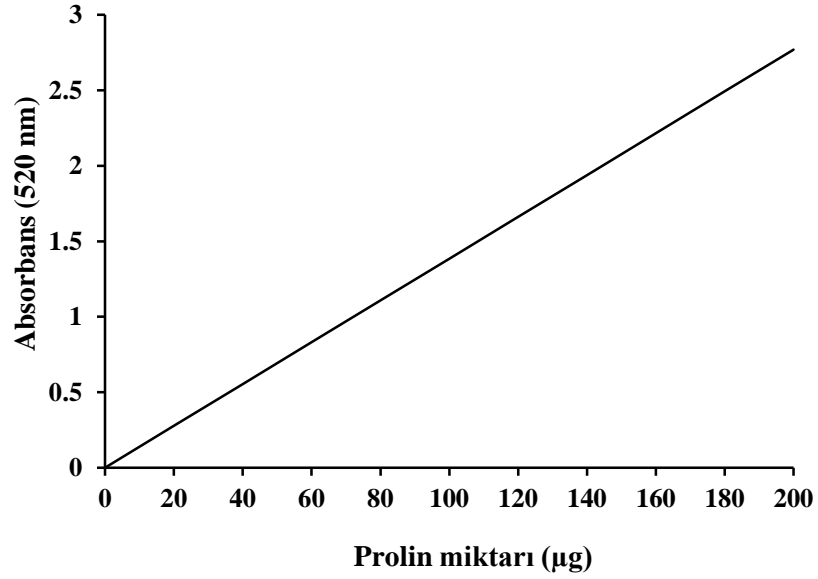
D: Klorofil ekstraktının belirtilen dalga boylarındaki absorbands değerini,

V: %80'lik asetonun son hacmini,

W: Ekstre edilen dokunun gram olarak yaş ağırlığını göstermektedir.

3.3.12. Prolin miktarının belirlenmesi

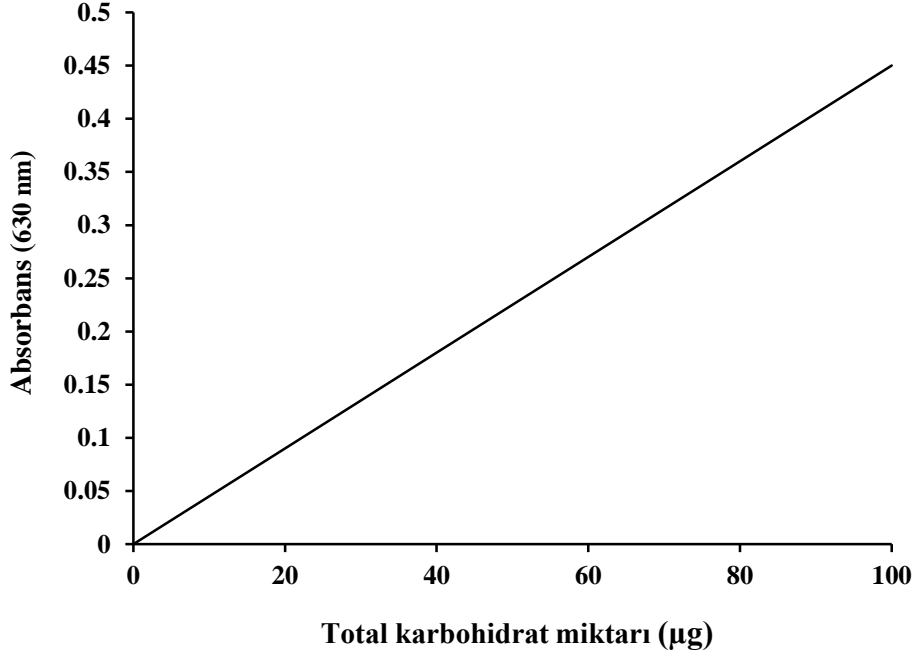
Prolin miktarının belirlenmesi için Bates vd (1973) tarafından önerilen yöntemle göre belirlendi. Taze yapraklarından alınan 0.5 gr doku örnekleri 7.5 ml %3'lük sülfosalisilik asit içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Daha sonra süpernatanttan 2 ml alınarak üzerine 1 ml glasiyel asetik asit ve 1 ml asit ninhidrin ilave edilerek, karışımı ihtiva eden tüpler 100°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler soğuk su banyosuna alınarak reaksiyon durduruldu. Tüplerin üzerine 4 ml toluen eklenerek vorteksle karıştırıldı ve bir müddet beklendikten sonra üst faz alınarak 520 nm'deki absorbandsı belirlendi. Kör numune olarak toluen kullanıldı. Prolin miktarı standart grafikten (Şekil 3.9) gram dokudaki µg cinsinden hesaplandı ve sunuldu.



Şekil 3.9. Prolin içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.13. Total karbohidrat içeriğinin belirlenmesi

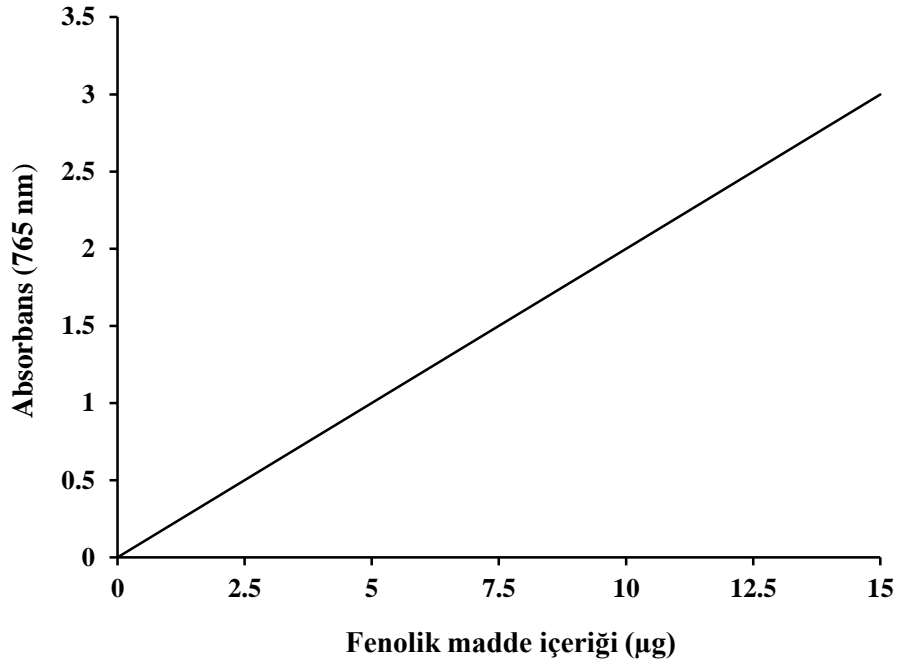
Total karbohidrat içeriği Dische (1962) tarafından sunulan metotta küçük modifikasyonlar yapılarak belirlendi. Öğütülmüş buğday bitkisinin yapraklarından alınan 0.1 gr doku örnekleri 5 ml 2.5 N soğuk HCl içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar 3 saat 100°C sıcak suda bekletildikten sonra soğuk su banyosunda soğutuldu. Üzerlerine reaksiyon duruncaya kadar katı Na₂CO₃ ilave edildi. Reaksiyon durunca üzerleri 45 ml saf su ile 50 ml'ye tamamlandı ve 15.000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Santrifüjden sonra 1 ml süpernatant alınarak üzerine Antron çözeltisi ilave edildi ve tekrar soğuk suya konularak soğutulduktan sonra 630 nm'de absorbans değişimleri kaydedildi. Total karbonhidrat içeriği standart grafikten (Şekil 3.10) gram dokudaki µg cinsinden hesaplandı ve sunuldu.



Şekil 3.10. Total karbohidrat içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik

3.3.14. Fenolik madde içeriğinin belirlenmesi

Fenolik madde içeriğinin belirlenmesi için Dewanto vd (2002) tarafından belirlenen prosedür uygulandı. Sıvı azot içinde un haline getirilmiş yapraklardan alınan 0.5 gr örnekler 2 ml 0.1 M'lık fosfat tamponunda homojenize edildi. Homojenatlar 15.000 rpm'de 15 dk ve 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant 25 µl alınarak üzerine 125 µl folin coicalteu reaktifi ilave edildi. Son olarak tüplere 250 µl %20'lik Na₂CO₃ ilave edilerek vortekslendi. Karışımlar 25°C 30 dk inkübe edildikten sonra 765 nm'de absorbas değerleri alındı. Fenolik madde içeriği standart grafikten (Şekil 3.11) yararlanılarak gram dokudaki µg cinsinden sunuldu.



Şekil 3.11. Fenolik madde içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik

3.3.15. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)

Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için Laemmli (1970) yöntemi ile dokukardan ekstrakte edilen proteinler %4–10 jel sisteminde yürütüldü. Bunun için elektroforez cam plakaları aparata yerleştirildi. Ayırma jeli hazırlanarak camlar arasına aktarıldı. Bu işlemler yapılırken hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için üzerine çok az izopropil alkol eklendi. Polimerleşme oluncaya kadar yaklaşık yarım saat beklendi. Polimerizasyon bittikten sonra jel üzerindeki izopropil alkol dökülüp, saf su ile iyice yıkandı. Daha sonra yığıma jeli için hazırlanan çözelti camın üst sınırına kadar ilave edildi ve tarak yerleştirildi. Yaklaşık 45 dakika sonra, tarak dikkatlice çıkarılarak cam plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu ilave edildi. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 900 µl olacak şekilde 1/1.25 oranında numune tamponu katıldı. Numune tamponunda hazırlanan protein örnekleri 15 dakika boyunca kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulularak, elektroforeze bir mikro pipet yardımıyla yüklendi. Tank kapağı

kapatılarak (+) kablo (Anot) ve (-) kablo (katot) yerleştirildi. Polipeptidler önce 80 voltluk akımda yarım saat yürütüldü. Daha sonra akım 120 volta ayarlanarak 2-4 saat +4°C'de yürütme işlemi tamamlandı. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Sonra jeller önce fixing (45 dk) ve peşine boyama çözeltisine alınarak bir gece hafif çalkalanarak (150 rpm) inkübe edildi. . Son olarak jeller yıkama çözeltisinde boya gidene kadar yıkandı ve fotoğrafları alındı. Yığıma jeli hazırlanması sırasında 1 M'lık Tris-HCl (pH: 6.8)'den 380 µl, %30'luk akrilamid-%0.8'lik bisakrilamid'den 400 µl, %10'luk SDS'den 30 µl, %5'lik TEMED'den 3 µl, ve saf sudan 2.2 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %10'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (APS)'den 30 µl ilave edildi.

Ayrırma jeli şöyle hazırlandı: 2.03 ml 1M Tris-HCl (pH: 8.8), 2.67 ml %30'luk akrilamid, %0.8'lik bisakrilamid, 80 µl %10 SDS, 3.2 µl %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin) ve 3.15 ml su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 80 µl %10'luk APS ilave edildi. Burada kullanılan APS kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

3.3.16. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile izoenzimlerin belirlenmesi

Poliakrilamid jeller, SDS-PAGE'de sunulduğu gibi hazırlandı, ancak jel ortamına, numunelere ve yürütme tamponuna SDS ilave edilmemiştir. İzoenzimler belirlenirken antioksidan enzim aktiviteleri için kullanılan enzim ekstraktlarına %20 gliserol eklendi ve içerisinde 50-300 µg protein olacak şekilde hazırlanıp kuyucuklara yüklendi. Çalışmalarda %4 yığıma jeli ile çalışılan enzime göre %8, 10 ve 11 ayırma jeli kullanıldı. Yürütme tamponu (18.76 glisin ve 3.02 gr Tris, 1 L, pH: 8.3) kullanılarak +4°C'de, 80-120 Volttta 3-4 saat yürütüldü. Yürütme tamponuna askorbat peroksidaz için 2 mM askorbik asit ilave edildi.

3.3.16.a. Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzimlerinin belirlenmesi

SOD izoenzimleri için %4-10 kesikli poliakrilamid jel kullanıldı. SOD izoenzimleri Beuchamp ve Fridovich (1971) tarafından tanımlanan poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlendi. Jel elektroforez sisteminden çıkarıldıktan sonra 0.24 mM NBT, 33.2 µM riboflavin, %0.2 TEMED ve 1 mM EDTA ihtiva eden 0.05 M potasyum fosfat tamponunda (pH: 7.8) 37°C'ye ayarlı çalkalayıcıda karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra jel, 1 mM EDTA ihtiva eden 0.05 M potasyum fosfat tamponuna (pH: 7.8) alındı ve ışıklı ortamda izoenzimlerin görülebilmesi için 10-30 dakika bekletildi. Saf su ile yıkandıktan sonra jeldeki bantların görüntüsü kaydedildi.

3.3.16.b. Peroksidaz (POX) izoenzimlerinin belirlenmesi

POX izoenzimleri Liu (1973) metodu modifiye edilerek belirlendi. Elektroforez sonucunda çıkarılan jel dikkatli bir şekilde 0.1 M, Na₂HPO₄ (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol ve 5 mM H₂O₂ içeren çözeltiliye alınarak bantlar belirginleşinceye kadar oda koşullarında inkübe edildi.

3.3.16.c. Katalaz (CAT) izoenzimlerinin belirlenmesi

Poliakrilamid jel elektroforezi ile katalaz izoenzimleri (Woodbury 1971) tarafından tanımlanan yöntemle belirlenir. Jel 30 mA de yürütüldü. Elektroforezden sonra jel, 3 kez 10'ar dakika saf suda bekletildikten sonra H₂O₂ çözeltisinde (20 µl %35'lik H₂O₂ 100 ml'ye saf su ile seyreltilir) 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi dolar dolmaz jelden H₂O₂ uzaklaştırıldı. Doğal boyama için taze hazırlanmış %2'lik FeCl₃, %2'lik K₃FeCN₆ çözeltilerin karışımı kullanılır. Jelde yeşil rengin görüldüğü an, jel saf su ile yıkanır. Jelde boyanmayan yerler katalaz aktivitesi olarak belirlenir.

3.3.16.d. Askorbat peroksidaz (APX) izoenzimlerinin belirlenmesi

Poliakrilamid jel elektroforezi ile askorbat peroksidaz izoenzimleri Lee ve Lee (2000) tarafından tanımlanan yöntemle %4-10 kesikli jel ile belirlendi. Elektroforezden sonra jel dikkatli bir şekilde çıkarılıp 2 mM askorbik asit içeren sodyum fosfat tamponuna (pH: 7.0) alınarak 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra jel, 4 mM askorbik asit ve 2 mM H₂O₂ içeren aynı tampon içerisinde 20 dakika inkübe edildi. Bundan sonra, 28 mM TEMED, 2.4 mM NBT içeren 50 mM sodyum-fosfat (pH: 7.8) tamponu içerisine alınarak 4-5 dakika bekletilen jel, son olarak saf su ile yıkandı ve izoenzim bantları belirlendiğinde saf su ile yıkandı.

3.3.16.e. Glutasyon redüktaz (GR) izoenzimlerinin belirlenmesi

Poliakrilamid jel elektroforezi ile glutasyon redüktaz izoenzimleri Laemmli (1970) tarafından tanımlanan yöntemle %4-10 kesikli jel ile belirlendi. Jel 30 mA de yürütüldü. Elektroforez sonunda çıkarılan jel 3.4 mM GSSG, 3 mM EDTA, 0.5 mM NADPH, 2 mM DTNB içeren 250 mM Tris-HCl (pH 7.5) tamponunda 30-40 dakika inkübe edildi. Daha sonra aynı tampona 0.2 mg/ml⁻¹ olacak şekilde DCPIP ilave edilerek jel oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletilerek izoenzimler belirlendi.

3.3.17. Westren blot ile Rubisco ifadesinin belirlenmesi

Bitki dokularından elde edilen protein ekstraktları %4-11 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) Laemmli (1970) yöntemi ile molekül büyüklüğüne göre ayrımı yapıldı. İlk önce nitroselüloz membran %100 metanolde 5 dk bekletildi. Sonra transfer tamponunda 5 dk bekletildi. Daha sonra molekül büyüklüğüne göre ayrılmış proteinler Towbin vd (1979) tarafından tanımlanan metodla 25 mM Tris-HCl (pH: 8.3), %20 metanol, 192 mM glisin ve 5 ml %10'luk SDS içeren (Bio-Rad Bulletin 6211) transfer tamponunda nitroselüloz membrana (0.45 mm por büyüklüğüne sahip) 60 mA'de 70 dakika süreyle (semi-dry) blotlama cihazında transferi gerçekleştirildi. Blotlamadan sonra 10 dk PBS ile yıkandı. Cold Spring Harb Protoc

2006'ya göre 137 mM NaCl, 2.37 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ (pH: 7.4) hazırlanmış olan 1×PBS'ye %2 süt tozu ve %0.1 Tween-20 ilave edildi ve membran bu çözeltide oda koşullarında bir saat inkübe edildi. Membran daha sonra 1.2000 PBS'de seyreltilmiş Rubisco için primer antibodyde bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi. PBST ile yıkayıp, PBS ve %0.2 BSA içeren 1.20000 seyreltilmiş sekonder antikorda ise oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Membran tekrar PBST ile 6 kez 5'er dk arayla yıkandı. Etkinleşen antikor 1'e 1 fento-piko Chemiluminescent substratında 5 dk bekletilip görüntüsü çekildi.

3.3.18. Nispi su içeriği

Hasat edilen buğday bitkilerinden 20 tanesi alınıp, yaş ağırlığı tartılarak 70°C'ye ayarlı olan etüve yerleştirilip, 72 saat inkübe edilerek ağırlıklarının sabitlenmesi beklenmiştir. Ağırlıkları sabitlenen örnekler tekrar tartılarak kuru ağırlıkları belirlenmiş ve her gruptaki bitkilerin yapraklarındaki nispi su içeriği Barrs ve Weatherly (1962)'ye göre hesaplanmıştır.

3.3.19. İstatistiksel analiz

Tez içerisinde sunulan sonuçlar, her bir uygulamadan üç bağımsız örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 2 tekrür yapıldıktan sonra elde edilen 6 değerın ortalamasıdır. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 15 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış ve gruplar arasındaki farklılıklar p<0.05 önem seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Tavuk Tüyü Protein Hidrolizatının (TTH) Aminoasit İçeriği

Çalışmamızda tavuk tüyü protein hidroliz işlemlerinde KOH kullanıldı ve daha sonra hidrolizat H_3PO_4 ile nötralize edildi. Bu işlem, bitkiler için iki makro besin minerali (K ve P) içeren fosfat tuzunun (KH_2PO_4) oluşmasına izin verdi. Böylece hidrolizat ortamında bitkilerin büyüme ve gelişmesini olumsuz etkileyecek toksik bileşiklerin oluşması önlenmiştir. Elde edilen protein hidrolizatı analiz edildi. Hidrolizatın aminoasit ve azot içerikleri Çizelge 4.1’de sunulmuştur. Tavuk tüyü hidrolizatının toplam protein verimi %72.8 (w/w) idi. Tavuk tüyü protein hidrolizatında (TTH) doğal proteinlerin yapısında bulunan 19 aminoasit belirlendi. Hidrolizatta kullanılan yöntemle sadece glutamin belirlenemedi. Elde edilen TTH; prolin, glisin, glutamat, aspartat, lösin, fenilalanin, sistein ve valin gibi proteinlerde hem bol hem de nadir bulunan aminoasitler bakımından zengindi. Diğer taraftan TTH’ın önemli oranlarda sitrüllin, sistin ve ornitin gibi proteinik olmayan aminoasitleri de barındırdığı görüldü. TTH ayrıca bitkide antioksidan olarak kullanılan sistein ile birlikte fenilalanin gibi aromatik aminoasitleri de önemli oranlarda içermektedir.

Çalışmamızda uygulama yapılacak olan TTH’ın en uygun konsantrasyonlarını bulmak için literatür verilerinden yararlanarak ön çalışmalar yapılmıştır. Ön çalışmalarda; TTH’ın %0.001, %0.005, %0.05, %0.075, %0.1, %0.125 konsantrasyonları 11 günlük buğday çeşitlerinin (*Triticum aestivum* cv. Altındane ve Bezostaya) yapraklarına eksojen olarak uygulanmış ve bitkiler soğuk ortama inkübe edilmişlerdir. Soğuk uygulamasından 72 saat sonra hasat edilen bitkilerin yaş-kuru ağırlık, klorofil içeriği ve LPO (MDA olarak) seviyeleri değerlendirilerek en uygun TTH konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu değerlendirmelere göre, tez çalışmalarının TTH’ın %0.05, %0.075 ve %0.1’lik konsantrasyonlarında yürütülmesine karar verilmiştir. Bu konsantrasyonlar literatür ile de uyumluluk göstermektedir.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan TTH'nin aminoasit içeriği

Parametre	Analiz sonucu (gr/100 gr)	Parametre	Analiz sonucu (gr/100 gr)
Aminoasit		Aminoasit	
Aspartik asit	4.512	Metiyonin	0.418
Glutamik asit	8.626	Triptofan	0.028*
Asparajine	0.011*	Fenilalanin	3.794
Serin	5.395	İzolösin	3.497
Histidin	0.319	Lösin	6.862
Glisin	6.654	Lizin	1.176
Treonin	1.066	Prolin	13.076
Arginin	2.530	Sistein	0.100
Alanin	4.832	Sitrüllin ⁺	0.313
Tirozin	1.599	Sistin ⁺	0.053
Valin	5.397	Ornitin ⁺	2.093
Toplam protein (%)		Toplam azot (%)	
72.8		11.7	

* Ölçüm metodunun tayin sınırı altındaki değeri ifade eder; +: Protein yapısında olmayan aminoasitler

4.2. TTH Uygulamasının Kök ve Gövde Uzunluğu Üzerine Etkileri

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, kök ve gövde uzunluklarında önemli seviyede ($P<0.05$) düşürmüştür. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında kök uzunluğunu, Altındanede kontrole göre %14.8 azaltırken, Bezostayada %11.8 oranında azaltmıştır. Gövde uzunluğu ise Altındanede kontrole göre %19.7 azaltırken,

Bezostayada %13 oranında azaltmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.1). Genelde soğuk uyulaması, kök ve gövde uzunluğu üzerinde hassas çeşit olan Altındanede daha olumsuz etkiye neden olmuştur.

Tek başına TTH uygulamalarının üçü de (%0.05, %0.075 ve %0.1), Altındanede ve Bezostayada kök ve gövde uzunluklarını önemli seviyede ($P<0.05$) artırmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.1). Bu uygulamalardan %0.1 TTH uygulaması, kontrolle karşılaştırıldığında, kök uzunluğunu Altındanede %18, Bezostayada ise %12 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olmuştur. Gövdede ise %0.075 TTH uygulaması, kontrolle karşılaştırıldığında, Altındanede %20 Bezostayada ise %13 oranında artış sağlayarak en etkili konsantrasyon olmuştur.

Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, kök ve gövde uzunluklarını her iki varyetede artırmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.1). Kökteki artışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %7.9, %12.8 ve %10.5 oranında, Bezostaya ise %5, %12.6 ve %15.5 oranında olmuştur. Gövdedeki artışlar ise sırasıyla Altındanede %7, %14 ve %11.5 oranında, Bezostaya ise %4, %8.9 ve %4.9 oranında olmuştur. Görüldüğü gibi Soğuk+TTH uygulamasında genelde %0.075 TTH konsantrasyonu en etkili doz olmuştur. Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi, buğdayda kök ve gövde uzunluklarını önemli seviyede düşürmüştür. Buna ilave olarak, soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, soğukun kök ve gövde üzerindeki olumsuz etkisini hafifleterek buğday soğuğa maruz kaldığında kök ve gövde uzunluklarını artırdığı ve bu artışta en etkili dozun %0.075 TTH olduğu belirlenmiştir.

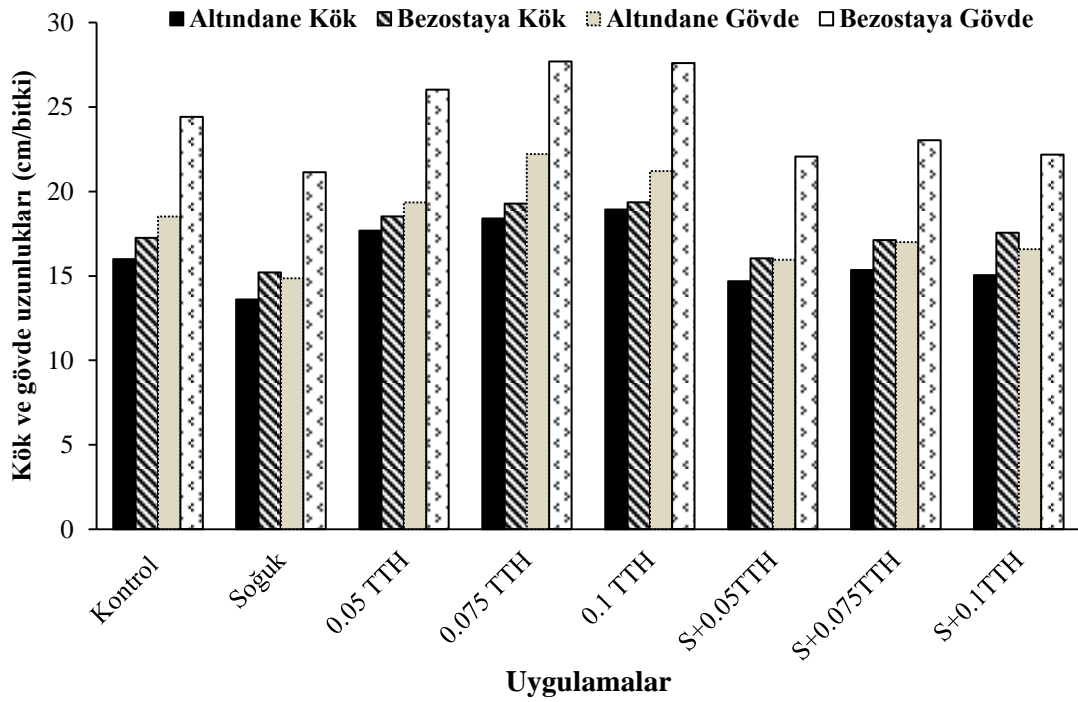
Çizelge 4.2. Kök ve gövde uzunlukları (cm/bitki) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındanede		Bezostaya	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
Kontrol	15.99±0.275c	18.51±0.281d	17.25±0.233c	24.42±0.251c
Soğuk	13.61±0.318e	14.86±0.384g	15.20±0.184e	21.13±0.409e
0.05 TTH	17.69±0.274b	19.36±0.210c	18.51±0.326b	26.03±0.275b

Çizelge 4.2. (devam)

0.075 TTH	18.41±0.401ab	22.22±0.495a	19.28±0.200a	27.70±0.374a
0.1 TTH	18.93±0.345a	21.20±0.462b	19.36±0.347a	27.59±0.278a
S+0.05 TTH	14.69±0.214d	15.95±0.245f	16.03±0.206d	22.07±0.43de
S+0.075 TTH	15.36±0.215cd	17.01±0.210e	17.12±0.214c	23.03±0.493d
S+0.1 TTH	15.04±0.275d	16.58±0.177ef	17.56±0.184c	22.18±0.439de

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. S: Soğuk, ±: SE



Şekil 4.1. Kök ve uzunlukları (cm/bitki) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

4.3. Yaş ve Kuru Ağırlık Bulguları

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, yaş ağırlıkta önemli seviyede ($P < 0.05$) düşümlere neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında yaş ağırlık, Altındanede %23.6 azalırken, Bezostayada %17 oranında azalmıştır (Çizelge 4.3, Şekil 4.2).

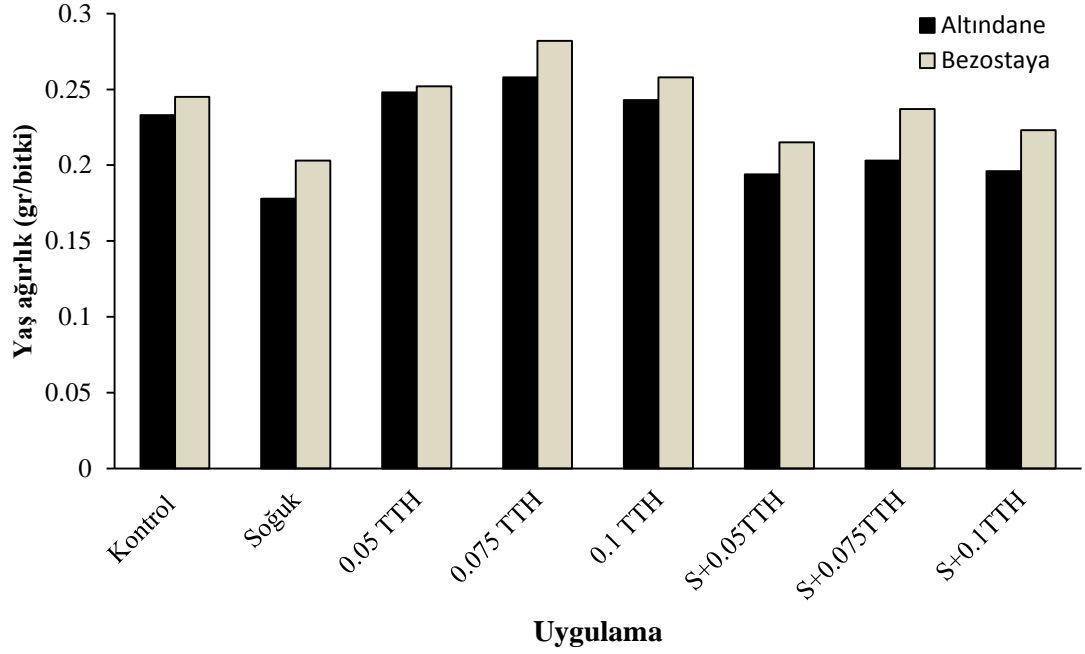
Tek başına TTH uygulamalarının üçü de, Altındane ve Bezostayada yaş ağırlığı önemli seviyede ($P<0.05$) artırmıştır (Çizelge 4.3, Şekil 4.2). Bu uygulamalardan %0.075 TTH, kontrolle karşılaştırıldığında, yaş ağırlığı Altındanede %10.7 Bezostayada ise %15 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olmuştur

Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, yaş ağırlığı her iki varyetede artırmış ve artışlar %0.05, %0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %8.9, %14 ve %10 oranında, Bezostaya ise %5.9, %16.7 ve %9.8 oranında olmuştur. Görüldüğü gibi Soğuk+TTH uygulamasında genelde %0.075 TTH soğuk ile azalan yaş ağırlığı iyileştirmede en etkili doz olmuştur. Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda yaş ağırlığı düşürdüğü belirlenmiştir. Ancak soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, buğday soğuğa maruz kaldığında yaş ağırlığı artırdığı ve bu artışta en etkili dozun %0.075 TTH olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Yaş ve kuru ağırlıklar (mg/bitki) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındane		Bezostaya	
	Yaş ağırlık	Kuru ağırlık	Yaş ağırlık	Kuru ağırlık
Kontrol	0.233±23dc	0.021±0.2d	0.245±6.7cb	0.0229±1.1
Soğuk	0.178±7.1f	0.0256±0.9a	0.203±8.8ef	0.0254±10c
0.05 TTH	0.248±7.2b	0.024±0.1bca	0.252±5.8b	0.0261±1.1c
0.075 TTH	0.258±9.1a	0.0255±0.16a	0.282±14.2a	0.0282±1.2ab
0.1 TTH	0.243±11.3cb	0.023±0.4c	0.258±9.8b	0.0259±1.2c
S+0.05 TTH	0.194±8.3e	0.0238±0.17ca	0.215±14.1e	0.0271±1.4bc
S+0.075 TTH	0.203±8.2e	0.0253±0.6a	0.237±16.8cd	0.0291±1.7a
S+0.1 TTH	0.196±7.4e	0.0248±0.1bca	0.223±14.7d	0.0266±1.3c

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P<0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. S:soğuk, ±: SE

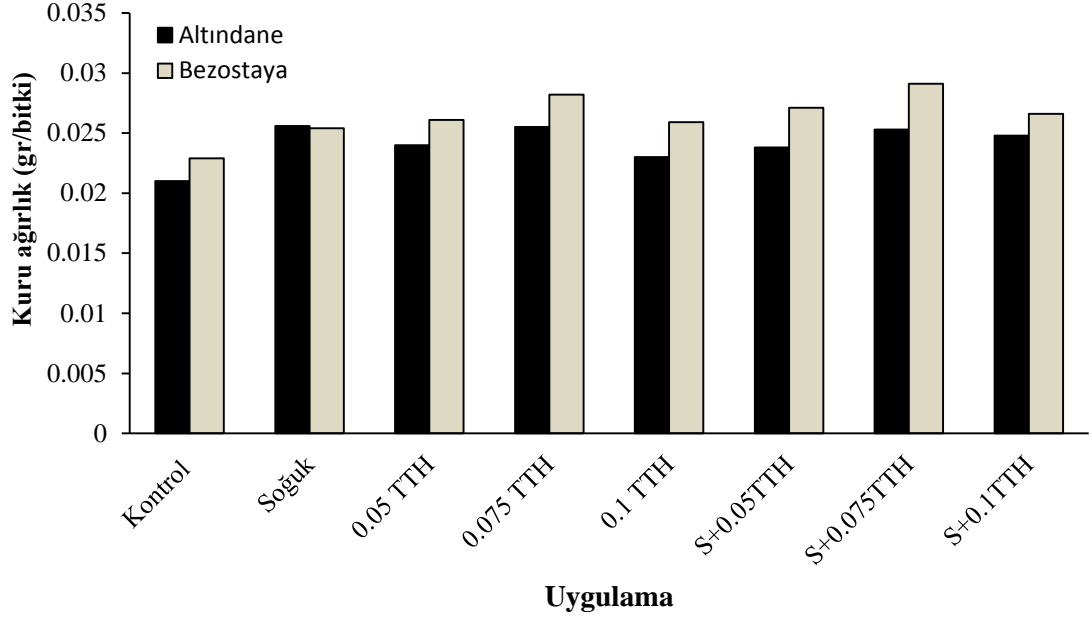


Şekil 4.2. Yaş ağırlık (gr/bitki) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, kuru ağırlıkta önemli seviyede ($P<0.05$) artışlara neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında kuru ağırlık, Altındanede kontrole göre %10.9 artarken, Bezostayada %21.9 oranında artmıştır (Çizelge 4.3, Şekil 4.3).

Tek başına TTH uygulamalarının üçü de, kontrolle karşılaştırıldığında, Altındane ve Bezostayada kuru ağırlığı önemli seviyede ($P<0.05$) artırmıştır (Çizelge 4.3, Şekil 4.3). Bu uygulamalardan %0.075 TTH uygulaması, kuru ağırlığı Altındanede %23 Bezostayada ise %21 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olmuştur.

Soğuk+TTH uygulamaları kuru ağırlığı, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, hassas varyetede (Altındane) önemli seviyede etkilemezken ($P>0.05$), dirençli varyetede (Bezostay) ise sadece %0.075 TTH'da %14 oranında artırmıştır ($P<0.05$). Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda kuru ağırlığı artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, sadece Bezostayada kuru ağırlık üzerine anlamlı bir etki yapmıştır.



Şekil 4.3. Kuru ağırlık (gr/bitki) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

4.4. Pigment İçeriği ve Rubisco Aktivitesine Ait Bulgular

4.4.1. Pigment içeriği

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, total klorofil içeriğinde düşüşe ($P < 0.05$) neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında klorofil içeriği, Altındanede kontrole göre %20.5 azalırken, Bezostayada %22.6 oranında azalmıştır (Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

Tek başına TTH uygulamalarının üçü de, Altındane ve Bezostayada total klorofil içeriklerini önemli seviyede ($P < 0.05$) artırmıştır (Çizelge 4.4, Şekil 4.4). Bu uygulamalardan %0.075 TTH uygulaması, kontrolle karşılaştırıldığında, aktiviteyi Altındanede %9 Bezostayada ise %11.5 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olmuştur.

Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, total klorofil içeriğini her iki varyetede artırmış ve artışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %6, %16 ve %9.6 oranında, Bezostaya ise %4.7, %13 ve %6 oranında olmuştur. Görüldüğü gibi Soğuk+TTH uygulamasında da genelde %0.075 ve 0.1 TTH konsantrasyonları en etkili doz olmuştur. Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda total klorofil içeriğini azalttığı belirlenmiştir. Ancak soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, buğday soğuğa maruz kaldığında total klorofil içeriğini artırdığı ve bu artışta en etkili dozların %0.075 ve 0.1 TTH olduğu belirlenmiştir.

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, karotenoid içeriğinde düşüşe ($P<0.05$) neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında içerik, Altındanede kontrole göre %22 azalırken, Bezostayada %18 oranında azalmıştır (Çizelge 4.4, Şekil 4.5).

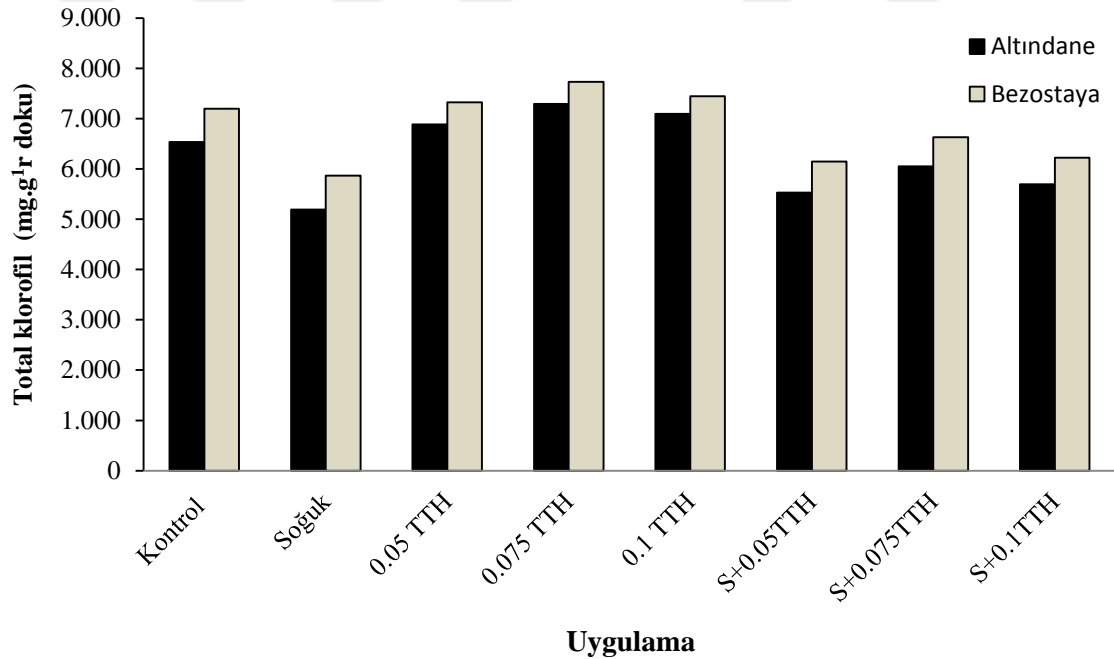
Tek başına TTH uygulamalarının üçü de, Altindane ve Bezostayada karotenoid içeriklerini önemli seviyede ($P<0.05$) artırmıştır (Çizelge 4.4, Şekil 4.5). Bu uygulamalardan %0.075 TTH uygulaması, kontrolle karşılaştırıldığında, aktiviteyi Altındanede ve Bezostayada %5 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olmuştur.

Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, karotenoid içeriğini her iki varyetede artırmış ve artışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %5.9, %15 ve %9.7 oranında, Bezostaya ise %7, %14 ve %9 oranında olmuştur. Görüldüğü gibi Soğuk+TTH uygulamasında genelde %0.075 TTH konsantrasyonu en etkili doz olmuştur. Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda karotenoid içeriğini azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca, soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, buğday soğuğa maruz kaldığında da karotenoid içeriğini artırdığı ve bu artışta en etkili dozun %0.075 olduğu belirlenmiştir.

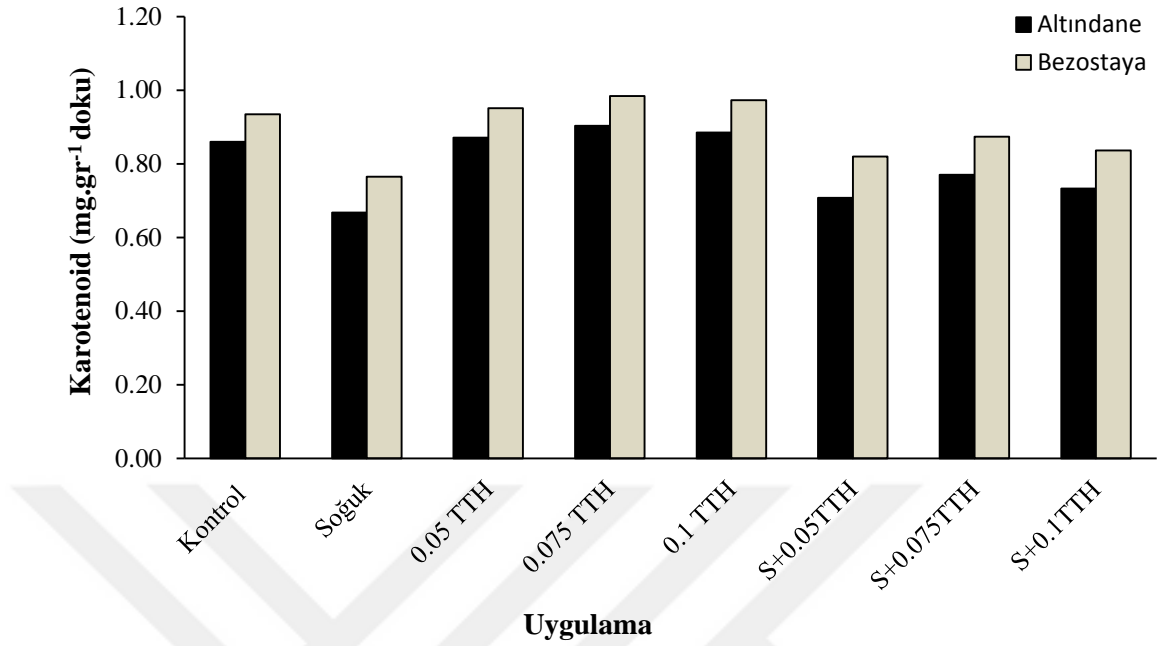
Çizelge 4.4. Total klorofil ve karotenoid (mg/gr doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındane		Bezostaya	
	Total Klorofil	Karotenoid	Total Klorofil	Karotenoid
Kontrol	6.538±0.167c	0.860±0.005c	7.200±0.080c	0.935±0.006c
Soğuk	5.195±0.068f	0.668±0.006g	5.868±0.065f	0.765±0.005g
0.05 TTH	6.888±0.104b	0.871±0.008bc	7.326±0.063bc	0.951±0.004b
0.075 TTH	7.291±0.130a	0.903±0.005a	7.735±0.089a	0.984±0.003a
0.1 TTH	7.095±0.070ab	0.885±0.003b	7.448±0.053b	0.973±0.002a
S+0.05 TTH	5.527±0.060e	0.708±0.05f	6.148±0.046e	0.820±0.004f
S+0.075 TTH	6.050±0.073d	0.770±0.008d	6.632±0.035d	0.874±0.007d
S+0.1 TTH	5.696±0.100e	0.733±0.004d	6.221±0.028e	0.836±0.003e

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P<0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. S:soğuk, ±: SE



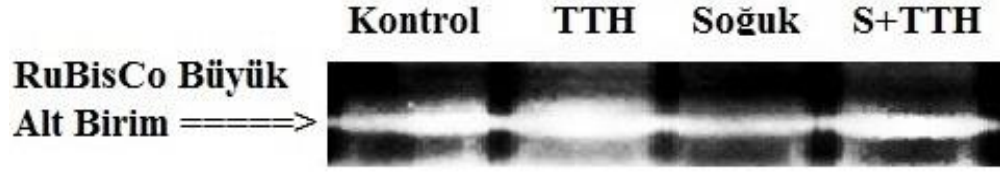
Şekil 4.4. Total klorofil içeriği (mg/gr doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri



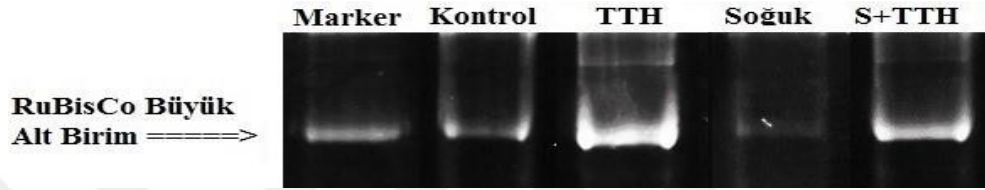
Şekil 4.5. Karotenoid (mg/gr doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

4.4.2. Rubisco aktivitesi

Rubisco (Rubiloz 1,5-Bifosfat Karboksilaz/Oksijenaz) bilindiği üzere fotosentezde karbon fiksasyonunda (Calvin yolu veya C₃ yolu) rol alan temel enzimdir. Rubisonun aktivitesi bitki verimi ve büyüme-gelişmeyle doğrudan ilişkilidir. Bizim çalışmamızda tek başına soğuk uygulaması, kontrol bitkilerine göre, buğdayın hem Altındane hem de Bezostaya çeşidinde Rubisco aktivitesini önemli seviyede düşürdüğü görülmüştür (Şekil 4.6 ve 4.7). Çalışmalarımızın büyük bir bölümünde TTH'nin soğuk stresini yatıştırmada en etkili konsantrasyonunun genelde %0.1 olarak belirlenmesinden dolayı, TTH'nin Rubisco aktivitesi üzerinde etkisini belirlemede sadece %0.1 TTH kullanılmıştır. Tek başına TTH uygulaması kontrol grubuna göre aktiviteyi artırmıştır. Diğer taraftan her iki buğday varyetesi soğuğa maruz kalmadan uygulanan TTH, bitkiler soğuğa maruz kaldıklarında, Rubisco aktivitesini önemli seviyede artırmıştır. Bu verilere göre, TTH'nin bitkide sadece antioksidan parametreleri etkilemediği, aynı zamanda fotosentezde karbon fiksasyonunu ve organik madde sentezini de iyileştirdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Altındane çeşidinde %0.1 TTH uygulamasının Rubisco enzimi ifadesi üzerine etkisi



Şekil 4.7. Bezostaya çeşidinde %0.1 TTH uygulamasının Rubisco enzimi ifadesi üzerine etkisi

4.5. Karbohidrat, Çözünebilir Protein ve Prolin İçeriğine Ait Bulgular

4.5.1. Total şeker içeriği

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, total şeker içeriklerinde artışa ($P<0.05$) neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında total şeker içerikleri, Altındanede kontrole göre %43 artarken, Bezostayada %36 oranında artmıştır. (Çizelge 4.5, Şekil 4.8).

Tek başına TTH uygulamalarının üçü de, Altındane ve Bezostayada total şeker içeriklerini önemli seviyede ($P<0.05$) artırmıştır (Çizelge 4.5, Şekil 4.8). Bu uygulamalardan %0.075 TTH uygulaması, kontrolle karşılaştırıldığında, aktiviteyi Altındanede %20 oranında artırırken, Bezostayada ise %0.1 TTH uygulaması %22 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olmuştur.

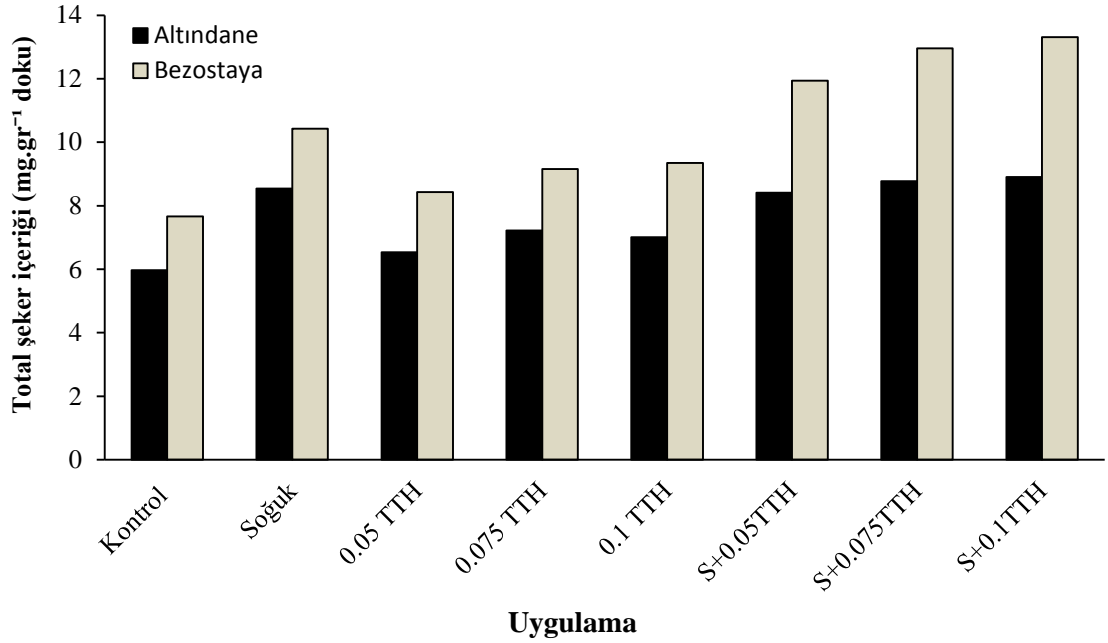
Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, çözünebilir şeker içeriğini varyetelere göre farklı etkilemiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.8). TTH uygulaması

soğuğa maruz Altındanede total çeker içeriğini önemli seviyede ($P>0.05$) etkilemezken, Bezostayada %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla %14, %24 ve %27.6 oranında artışlar olmuştur. Bezostayada soğuk+TTH uygulamasında %0.1 TTH konsantrasyonu en etkili doz olmuştur. Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayın soğuğa hem dirençli hem de duyarlı çeşidinde total şeker içeriğini artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, buğdayın özellikle soğuğa dirençli çeşidinde total şeker içeriğini artırdığı ve bu artışta en etkili dozun %0.1 TTH olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Total şeker içeriği (mg/gr doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındane	Bezostaya
Kontrol	5.97±0.146d	7.66±0.103f
Soğuk	8.54±0.144a	10.43±0.147c
0.05 TTH	6.54±0.155c	8.43±0.092e
0.075 TTH	7.22±0.111b	9.16±0.113d
0.1 TTH	7.01±0.154bc	9.35±0.147d
S+0.05TTH	8.41±0.172a	11.94±0.162b
S+0.075TTH	8.77±0.155a	12.96±0.192a
S+0.1TTH	8.91±0.264a	13.31±0.206a

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P<0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. S:soğuk, ±: SE



Şekil 4.8. Total şeker içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının etkileri

4.5.2. Çözünabilir protein içeriği

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, protein içeriklerinde artışa ($P < 0.05$) neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında protein içeriği, Altındanede kontrole göre %23 artarken, Bezostayada %29.8 oranında artmıştır (Çizelge 4.6, Şekil 4.9). Bu sonuç, SDS-PAGE verileriyle de desteklenmiştir. Örneğin, SDS-PAGE fotoğrafı incelendiğinde, soğuk uygulamasıyla Altındane ve Bezostaya çeşitlerinin her ikisinde özellikle 175, 75, 50, 25 ve 15 ve 10 kDa' luk proteinlerin arttığı görülmektedir (Şekil 4.10 ve 4.11).

Tek başına TTH uygulamalarının üçü de, Altındane ve Bezostayada protein içeriklerini önemli seviyede ($P < 0.05$) artırmıştır (Çizelge 4.6, Şekil 4.9). Bu uygulamalardan %0.075 TTH uygulaması, kontrolle karşılaştırıldığında, protein içeriğini Altındanede %8.7 Bezostayada ise %14 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olmuştur. Bu sonuç, SDS-PAGE üzerinde de görülmektedir. Örneğin, SDS jel fotoğrafı incelendiğinde, özellikle %0.075 TTH uygulamaları, 50 kDa, 25 kDa ve 10 kDa

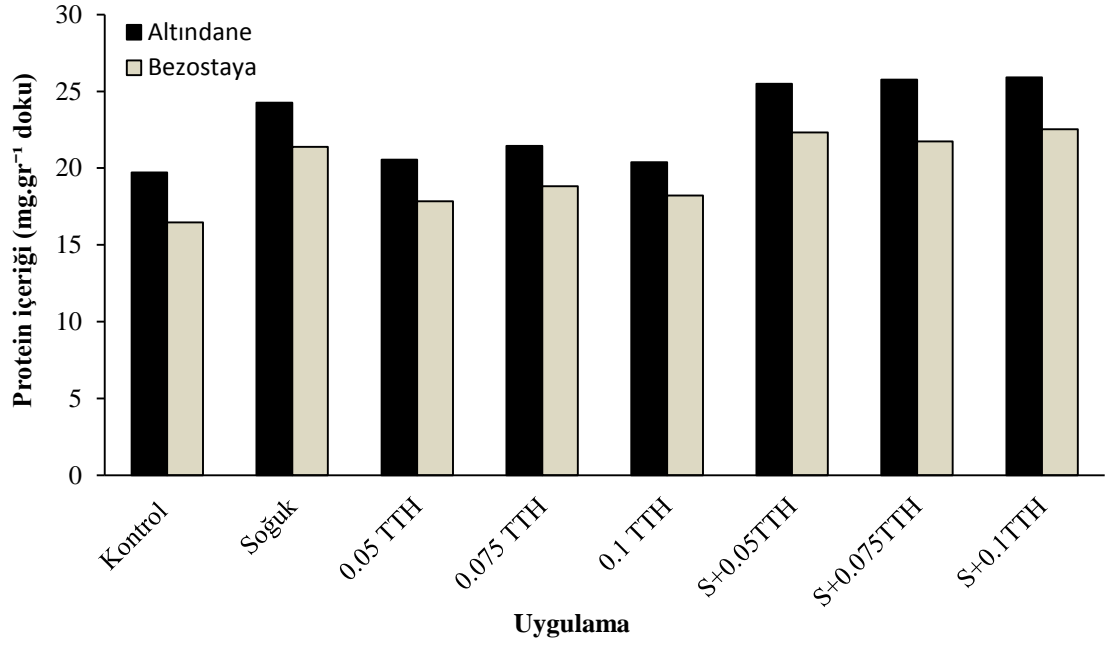
proteinlerin yoğunluklarındaki değişimler her iki varyetede daha belirgindi (Şekil 4.10 ve 4.11).

Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, protein içeriklerini her iki varyetede artırmış, ancak artışlar Bezostayada istatistik olarak anlamlı ($P>0.05$) bulunmamıştır. Örneğin, artışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %5, %6 ve %6.8 oranında, Bezostaya ise %4, %1.6 ve %5 oranında olmuştur. Soğuk+TTH uygulamasında genelde %0.1 TTH konsantrasyonu en etkili doz olmuştur. Bu sonuç, SDS jeli üzerinde de görülmektedir. Şekil 4.10 ve 4.11'e dikkat edildiğinde, SDS jeli üzerinde özellikle soğuk+%0.075 ve soğuk+0.1 TTH uygulamaları, 50, 25, 20 ve 10 kDa' luk proteinlerin yoğunluklarındaki değişimler her iki varyetede daha belirgindi. Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda protein içeriğini artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, özellikle buğdayın dirençli çeşidinde protein içeriğini artırdığı ve bu artışta en etkili dozun %0.1 TTH olduğu belirlenmiştir.

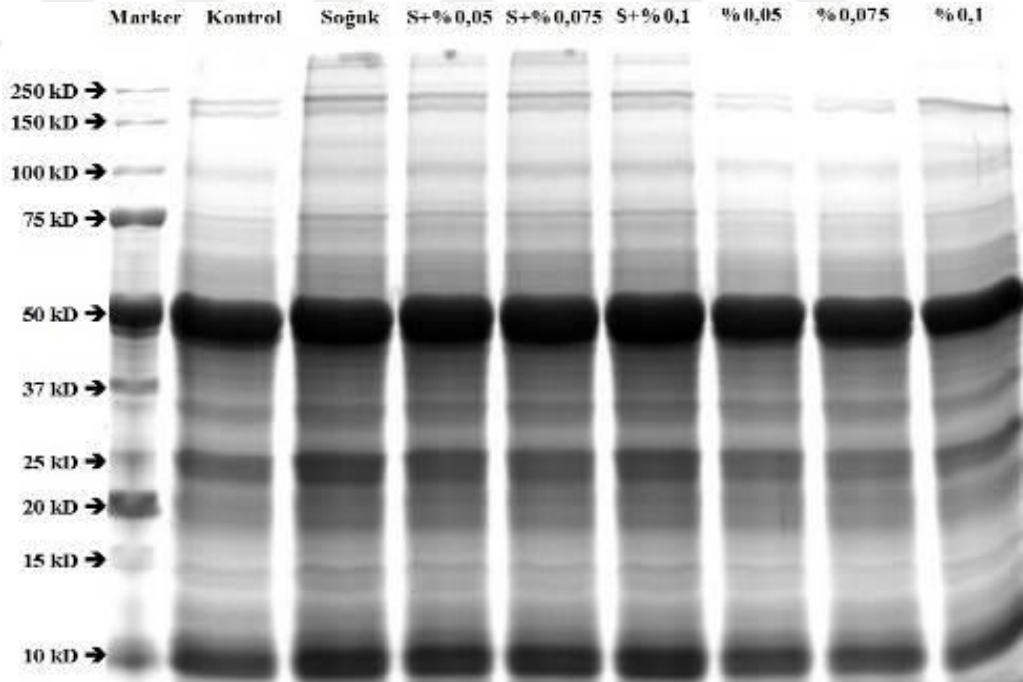
Çizelge 4.6. Çözünabilir protein içeriği (mg/gr doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındanede	Bezostaya
Kontrol	19.72±0.405e	16.47±0.312c
Soğuk	24.26±0.464b	21.38±0.385a
0.05 TTH	20.55±0.629d	17.85±0.331b
0.075 TTH	21.44±0.364c	18.88±0.353b
0.1 TTH	20.39±0.443d	18.21±0.204b
S+0.05TTH	25.49±0.549ab	22.33±0.495a
S+0.075TTH	25.77±0.316a	21.73±0.498a
S+0.1TTH	25.91±0.430a	22.52±0.746a

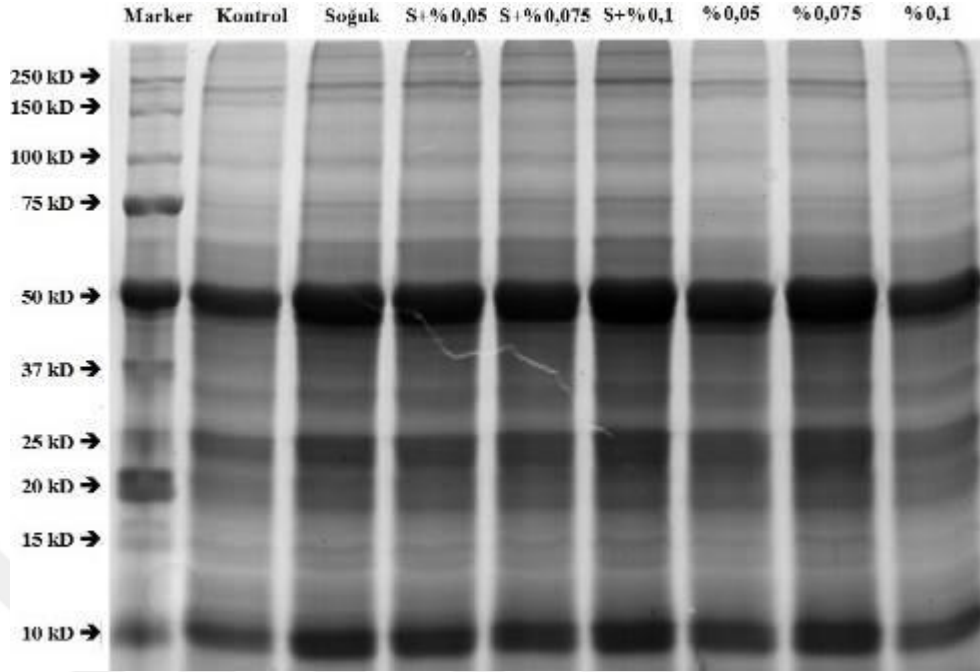
Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P<0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. S:soğuk, ±: SE



Şekil 4.9. Çözünabilir protein içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri



Şekil 4.10. Altındane çeşidinde protein profilinin SDS-PAGE ile görüntülenmesi
S:Soğuk; kD: Kilodalton



Şekil 4.11. Bezostaya çeşidinde protein profilinin SDS-PAGE ile görüntülenmesi

4.5.3. Prolin içeriği

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, prolin içeriğinde artışa ($P<0.05$) neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında prolin içeriği, Altıdanede kontrole göre %50.7 artarken, Bezostayada %63.6 oranında artmıştır. (Çizelge 4.7, Şekil 4.12).

Tek başına TTH uygulamalarının üçü de, Altıdanede ve Bezostayada prolin içeriğini önemli seviyede ($P<0.05$) artırmıştır (Çizelge 4.7, Şekil 4.12). Bu uygulamalardan %0.075 TTH uygulaması, kontrole karşılaştırıldığında, aktiviteyi Altıdanede %17 Bezostayada ise %28.6 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olmuştur.

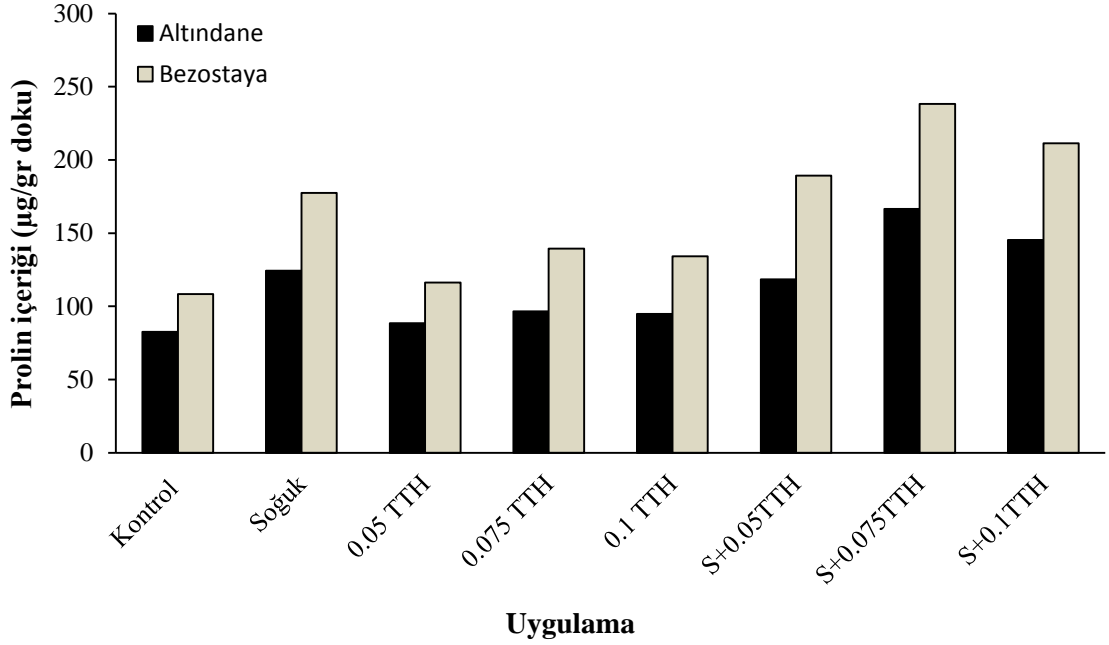
Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, prolin içeriği her iki varyetede genelde artırmıştır. Örneğin, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında Altıdanede sırasıyla %33.8 ve %16.8 oranında, Bezostaya ise %6.5, %34 ve %19 oranında artış belirlenmiştir. Ancak %0.05 TTH'da her iki varyetede istatistik olarak anlamlı ($P>0.05$)

bir farklılık belirlenmemiştir. Veriler topluca değerlendirildiğinde, Soğuk+TTH uygulamasında genelde %0.075 TTH en etkili doz olmuştur. Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda prolin içeriğini artırdığı ve ayrıca soğuk stresi öncesi uygulanan TTH'ın da prolin içeriğini artırdığı ve bu artışta en etkili dozun %0.075 TTH olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. Prolin içeriği ($\mu\text{g}/\text{gr}$ doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındane	Bezostaya
Kontrol	82.55 \pm 3.40d	108.44 \pm 4.90e
Soğuk	124.42 \pm 7.91c	177.5 \pm 4.91c
0.05 TTH	88.45 \pm 3.01d	116.26 \pm 4.26e
0.075 TTH	96.65 \pm 5.10d	139.55 \pm 2.63d
0.1 TTH	94.88 \pm 4.73d	134.28 \pm 4.58d
S+0.05TTH	118.46 \pm 4.64c	189.21 \pm 4.67c
S+0.075TTH	166.58 \pm 4.55a	238.26 \pm 5.79a
S+0.1TTH	145.33 \pm 5.04b	211.39 \pm 6.57b

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. S: soğuk, \pm : SE



Şekil 4.12. Prolin içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

4.6. Reaktif Oksijen Türleri İçeriğine Ait Bulgular

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

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, süperoksit anyon içeriğinde artışa ($P<0.05$) neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında içerik, Altındanede kontrole göre %27 artarken, Bezostayada %25 oranında artmıştır (Çizelge 4.8, Şekil 4.13).

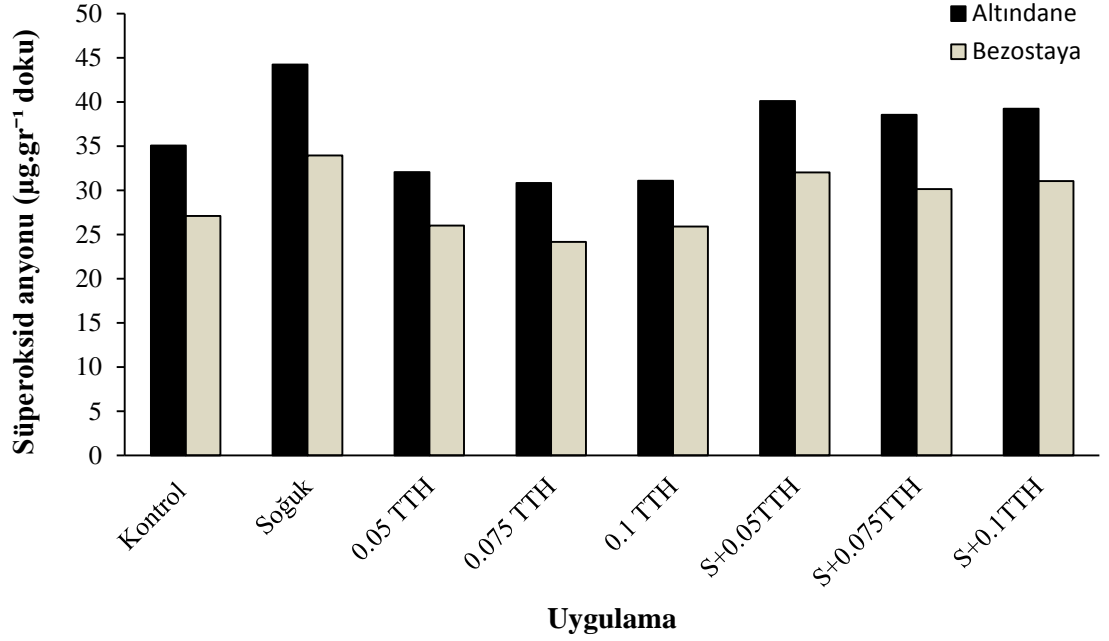
Tek başına TTH uygulamalarının üçü de, Altındane ve Bezostayada süperoksit anyon içeriğini önemli seviyede ($P<0.05$) düşürmüştür (Çizelge 4.8, Şekil 4.13). Bu uygulamalardan %0.075 TTH uygulaması, kontrolle karşılaştırıldığında, aktiviteyi Altındanede %12 Bezostayada ise %10.8 oranında azaltarak en etkili konsantrasyon olmuştur.

Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, süperoksit içeriğini her iki varyetede düşürmüş ve bunlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %10, %13 ve %12 oranında, Bezostaya ise %5.7, %11 ve %8.5 oranında olmuştur. Görüldüğü gibi Soğuk+TTH uygulamasında da genelde %0.075 TTH konsantrasyonu en etkili doz olmuştur. Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda süperoksit anyon içeriğini artırdığı belirlenmiştir. Ancak soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, buğday soğuğa maruz kaldığında süperoksit içeriğini azalttığı ve bu azalışta en etkili dozun %0.075 TTH olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ($\mu\text{g.gr}^{-1}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) içerikleri ($\mu\text{g/gr}$ doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındanede		Bezostaya	
	$O_2^{\cdot-}$	H_2O_2	$O_2^{\cdot-}$	H_2O_2
Kontrol	35.105±0.228d	51.383±0.541d	27.103±0.255e	45.713±0.476d
Soğuk	44.623±0.223a	64.026±0.670a	33.958±0.113a	55.688±0.470a
0.05 TTH	32.048±0.227e	51.595±0.662d	26.013±0.109f	45.083±0.644d
0.075 TTH	30.827±0.286f	49.297±0.646e	24.151±0.129g	42.591±0.580e
0.1 TTH	31.092±0.241f	51.091±0.611d	25.890±0.151f	43.034±0.502e
S+0.05 TTH	40.097±0.198b	59.894±0.798b	32.011±0.140b	52.421±0.433b
S+0.075 TTH	38.557±0.269c	57.073±0.606c	30.133±0.178d	49.804±0.485c
S+0.1 TTH	39.225±0.285c	58.336±0.393bc	31.057±0.102c	49.356±0.620c

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P<0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. S: soğuk, ±: SE



Şekil 4.13. Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

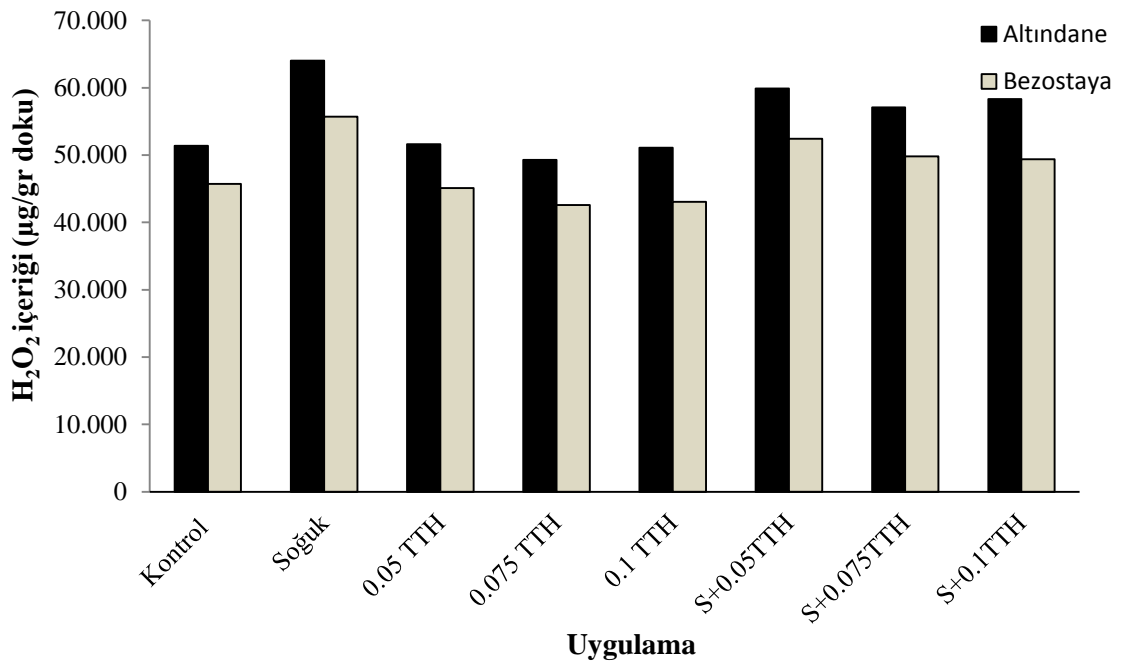
4.6.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriği

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, H_2O_2 içeriğinde artışa ($P<0.05$) neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında H_2O_2 içeriği, Altındanede kontrole göre %24.6 artarken, Bezostayada %21.8 oranında artmıştır. (Çizelge 4.8, Şekil 4.14).

Tek başına TTH uygulamalarının üçü de Bezostayada H_2O_2 içeriğini önemli seviyede ($P<0.05$) azaltırken, Altındanede %0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında azaltmıştır. (Çizelge 4.8, Şekil 4.14). Bu uygulamalardan %0.075 TTH uygulaması, kontrole karşılaştırıldığında, aktiviteyi Altındanede %4 Bezostayada ise %6.8 oranında azaltarak en etkili konsantrasyon olmuştur.

Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, H_2O_2 içeriğini her iki varyetede düşürmüş ve azalışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla

Altındanede %6, %10.8 ve %8.8 oranında, Bezostaya ise %0.4, %10.5 ve %11 oranında olmuştur. Görüldüğü gibi Soğuk+TTH uygulamasında genelde %0.075 ve %0.1 TTH konsantrasyonları en etkili doz olmuştur. Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda H₂O₂ içeriğini artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, buğday soğuğa maruz kaldığında da H₂O₂ içeriğini düşürdüğü ve bu düşüşte en etkili dozun %0.075 ve %0.1 TTH olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.14. Hidrojen peroksit (H₂O₂) içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

4.7. Oksidatif Hasar Parametrelerine Ait Bulgular

4.7.1. LPO göstergesi olarak MDA içeriği

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, MDA içeriğide artışa ($P < 0.05$) neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında MDA içeriği, Altındanede kontrole göre %32 artarken, Bezostayada %31 oranında artmıştır (Çizelge 4.9, Şekil 4.15).

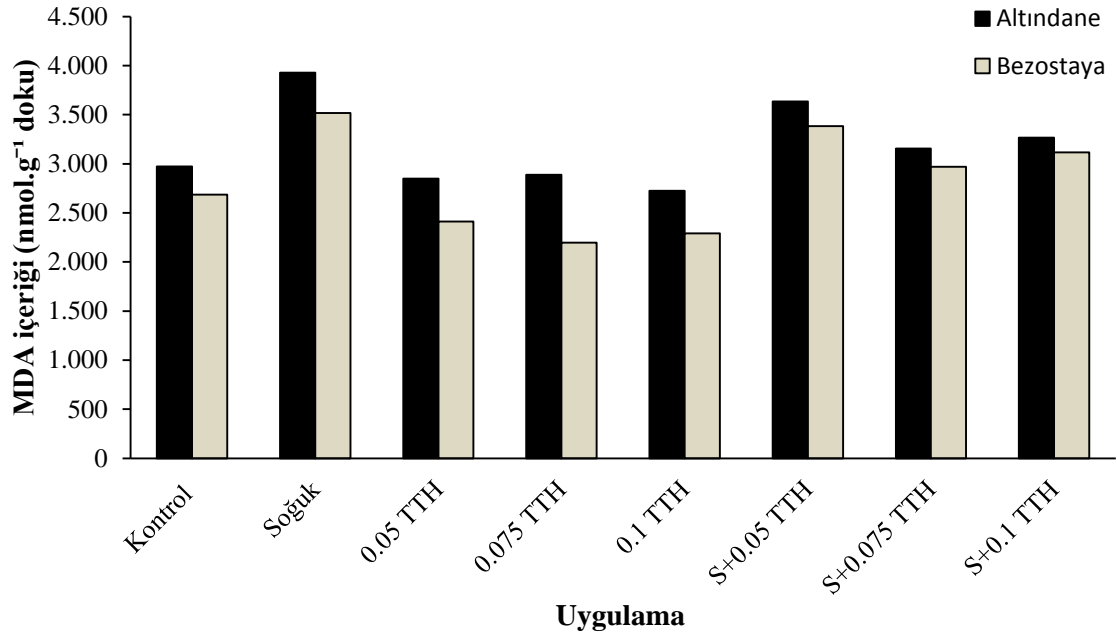
Tek başına TTH uygulamalarının üçü de, Altındane ve Bezostayada MDA içeriğini önemli seviyede ($P<0.05$) düşürmüştür (Çizelge 4.9, Şekil 4.15). Bu uygulamalardan %0.075 TTH uygulaması, kontrole karşılaştırıldığında, aktiviteyi Altındanede %12.5 Bezostayada ise %18 oranında azaltarak en etkili konsantrasyon olmuştur.

Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, MDA içeriğini her iki varyetede düşürmüş ve bu düşüşler, %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %7, %19.7 ve %16.8 oranında, Bezostaya ise %3.8, %15.6 ve %7.5 oranında olmuştur. Görüldüğü gibi Soğuk+TTH uygulamasında genelde %0.075 TTH konsantrasyonu en etkili doz olmuştur. Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda MDA içeriğini artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, buğday soğuğa maruz kaldığında MDA içeriğini düşürdüğü ve bu düşüşte en etkili dozun %0.075 TTH olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. MDA içerikleri (nmol/gr doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındane	Bezostaya
Kontrol	2.972±0.038e	2.686±0.042e*
Soğuk	3.928±0.040a	3.519±0.029a
0.05 TTH	2.848±0.041f	2.412±0.028f
0.075 TTH	2.600±0.040h	2.197±0.009h
0.1 TTH	2.724±0.023g	2.291±0.020g
S+0.05TTH	3.636±0.025b	3.384±0.017b
S+0.075TTH	3.154±0.008d	2.969±0.015d
S+0.1TTH	3.268±0.035c	3.117±0.023c

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P<0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. S: soğuk, ±: SE



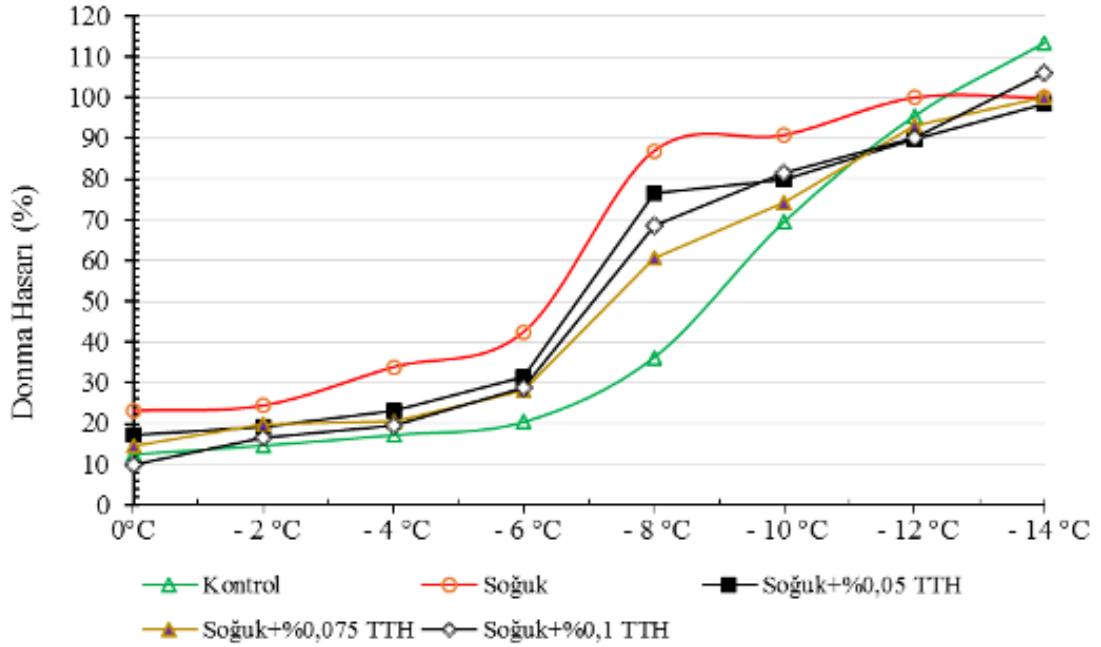
Şekil 4.15. MDA içerikleri üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

4.7.2. Donma Hasarına (DH) ait bulgular

Aşağıdaki tablo ve çizelgelerde iyon iletkenliği ve donma hasarı üzerine stresli ve stressiz şartlar altında TTH'nın etkileri detaylı olarak sunulmuştur (Çizelge 4.10, 4.11, Şekil 4.16 ve 4.17). İyon iletkenliği ($\mu\text{S}/\text{cm}$) ölçümünden faydalanarak elde edilen sonuçlara göre, hem hassas hemde dirençli varyetelerde düşük sıcaklık uygulaması kontrol bitkilerine kıyasla yapraklarda donmanın daha erken derecelerde başlamasını sağlamış ve donma hasarının önemli derecede artmasına sebep olmuştur. Düşük sıcaklık öncesi uygulanan TTH uygulamaları ise %DH'nın ve donmanın başladığı dereceleri önemli derecede etkileyerek bitkilerin direnç kazanmasına sebep olmuştur. İki varyete arasında hem donma hasarı hemde donmanın başlama derecesinde önemli farklılıklar olmasına karşın, %0,075 uygulaması her iki çeşitte en iyi sonuçları sağlamıştır. Ayrıca, %0.075 TTH uygulaması, hassas varyetede LT50 değerini tek başına soğuk uygulamasına göre yaklaşık -6.5°C 'den -7.5°C 'ye kadar, dirençli varyetede ise -7°C 'den -9.5°C 'ye kadar düşürmüştür. Benzer şekilde stressiz şartlar altında da TTH uygulanan bitkilerde kontrol bitkilerine kıyasla %DH'nın daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. Altındane çeşidinde %Donma Hasarı ($\mu\text{S}/\text{cm}$) üzerine TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

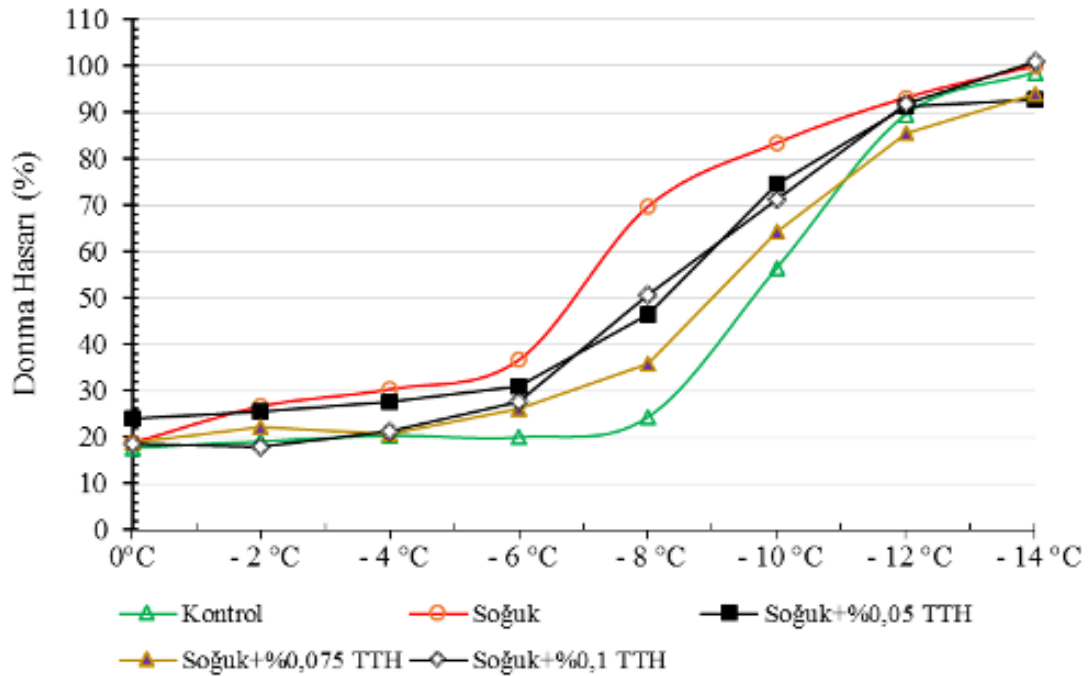
Uygulamalar	% Donma Hasarı (Sıcaklık (°C))							
	0	- 2	- 4	- 6	- 8	-10	- 12	- 14
Kontrol	12.45	14.60	17.18	27.06	36.20	76.72	95.47	113.4
Soğuk	23.13	20.65	25.69	35.50	84.79	90.82	100	100
0.050 TTH	17.35	19.08	23.08	31.56	79.55	79.79	89.78	98.40
0.075 TTH	14.40	19.80	20.53	28.10	72.52	74.07	93.20	100.14
0.1 TTH	10.03	13.67	15.00	17.30	77.37	81.37	90.0	106.00
Soğuk+0.05 TTH	21.02	23.91	25.18	32.66	39.41	66.67	96.81	104.28
Soğuk+0.075TTH	19.84	24.68	29.84	33.30	44.75	62.50	98.12	107.45
Soğuk+0.1 TTH	6.00	8.00	8.00	10.00	56.00	77.30	87.0	94.00



Şekil 4.16. Soğuk stresine maruz buğday (*Triticum aestivum* cv. Altındane) bitkilerinin yapraklarında % donma hasarı

Çizelge 4.11. Bezostaya çeşidinde %Donma Hasarı ($\mu\text{S}/\text{cm}$) üzerine TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	% Donma Hasarı (Sıcaklık (°C))							
	0	- 2	- 4	- 6	- 8	-10	-12	- 14
Kontrol	17,76	19,12	20,36	20,03	24,33	56,47	89,47	98,59
Soğuk	18,77	26,70	30,38	36,69	69,69	83,41	93,15	100,00
0.050 TTH	23,92	25,61	27,64	30,94	46,39	74,56	91,19	92,74
0.075 TTH	19,02	22,24	20,79	26,17	35,80	64,38	85,41	94,07
0.1 TTH	18,67	18,00	21,33	27,67	50,67	71,26	91,67	101,00
Soğuk+0.05 TTH	18,55	21,70	22,87	25,37	34,19	58,45	81,97	89,21
Soğuk+0.075TTH	18,06	20,76	19,84	26,03	47,68	54,23	84,16	87,95
Soğuk+0.1 TTH	12,00	11,33	21,67	23,00	47,17	59,60	84,33	94,33



Şekil 4.17. Soğuk stresine maruz buğday (*Triticum aestivum* cv. Bezostaya) bitkilerinin yapraklarında % donma hasarı

4.8. Antioksidan Sistem Parametrelerine Ait Bulgular

4.8.1. Antioksidan enzim aktiviteleri ve izoenzim bulguları

4.8.1.a. SOD aktivitesi ve izoenzimleri

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, SOD enzim aktivitesinde artışa ($P<0.05$) neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında aktivite, Altındanede %32, Bezostayada ise %25 oranında artmıştır (Çizelge 4.12, Şekil 4.18). Bu sonuç, SOD izozimlerinin belirlendiği çalışma ile de desteklenmiştir. Örneğin, SOD izozim jel fotoğrafı incelendiğinde, soğuk uygulamasıyla özellikle 2 ve 3 nolu izozimleri her iki çeşitte belirgin ölçüde artırdığı görülmektedir (Şekil 4.19 ve 4.20).

Tek başına TTH uygulamalarının üçü, Altındanede SOD aktivitesinin hafif derecede azaltırken ($P>0.05$), Bezostayada ise sadece %0.75 TTH uygulamasında ($P<0.05$) artırmıştır (Çizelge 4.12, Şekil 4.18). Hassas varyetede bu uygulamalardan %0.1 TTH uygulaması, kontrolle karşılaştırıldığında, aktiviteyi %5.2 oranında azaltan, Bezostayada ise %0.75 TTH uygulaması %8.3 oranında artıran en etkili konsantrasyon olmuştur. Bu sonuç, SOD izozimleri üzerinde de görülmektedir. SOD izozim jel fotoğrafı incelendiğinde, hassas varyetede azalışlar gözlenirken, dirençli varyetede TTH uygulamaları, 3 nolu izoenzimini belirgin ölçüde artırdığı görülmektedir (Şekil 4.19 ve 4.20).

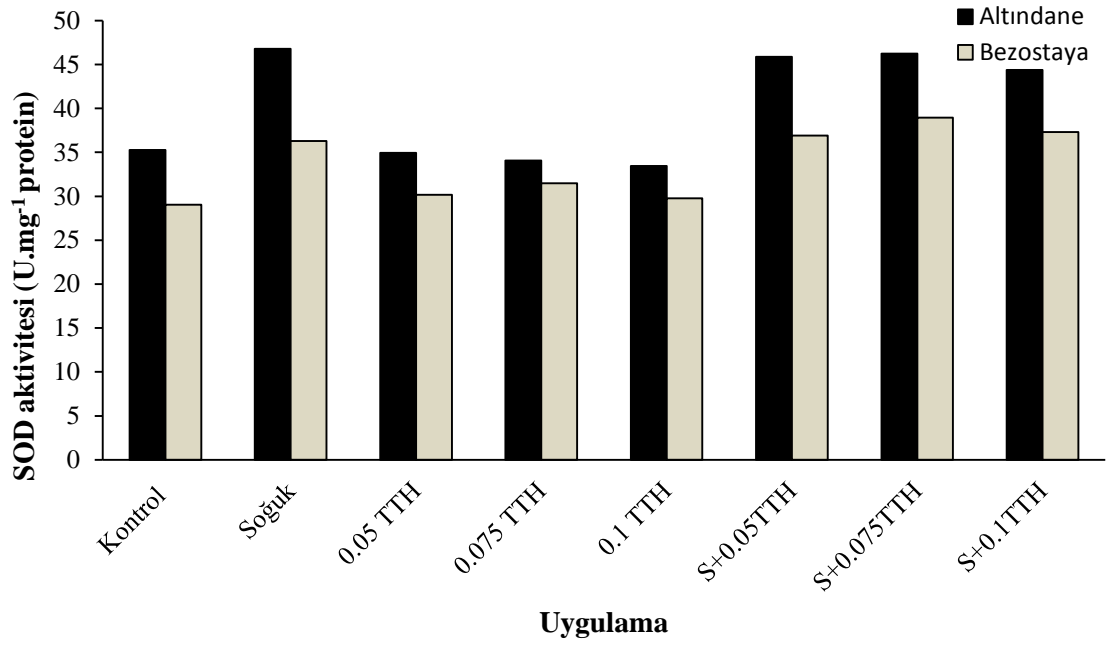
Soğuk+TTH uygulamaları SOD aktivitesini, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, hassas varyetede sadece %0.1 TTH'da önemli seviyede ($P>0.05$) azaltırken, dirençli varyetede genelde artırmıştır. Hassas varyetede belirlenen düşüşler %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla %2, %1 ve %5 oranındayken, Bezostayada belirlenen artışlar %1.6, %7 ve %2.7 oranında artışlar olmuştur. Görüldüğü gibi soğuk stresin öncesinde uygulanan TTH buğdayın iki varyetesinde SOD aktivitesi üzerinde farklı etkilere neden olmuştur. Bu sonuç, SOD izozimleri üzerinde de görülmektedir. Şekil 4.19 ve 4.20'ye dikkat edildiğinde, SOD izozim jeli üzerinde özellikle

soğuk+TTH uygulamaları, 3 nolu izozim hassas çeşitte belirgin ölçüde azalırken, dirençli çeşitte artmıştır. Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda SOD aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, buğday soğuğa maruz kaldığında SOD aktivitesini hassas varyetede düşürmüştü ancak dirençli varyetede artırmıştır ve bu her iki farklı etkide etkili dozun %0.075 TTH olduğu belirlenmiştir.

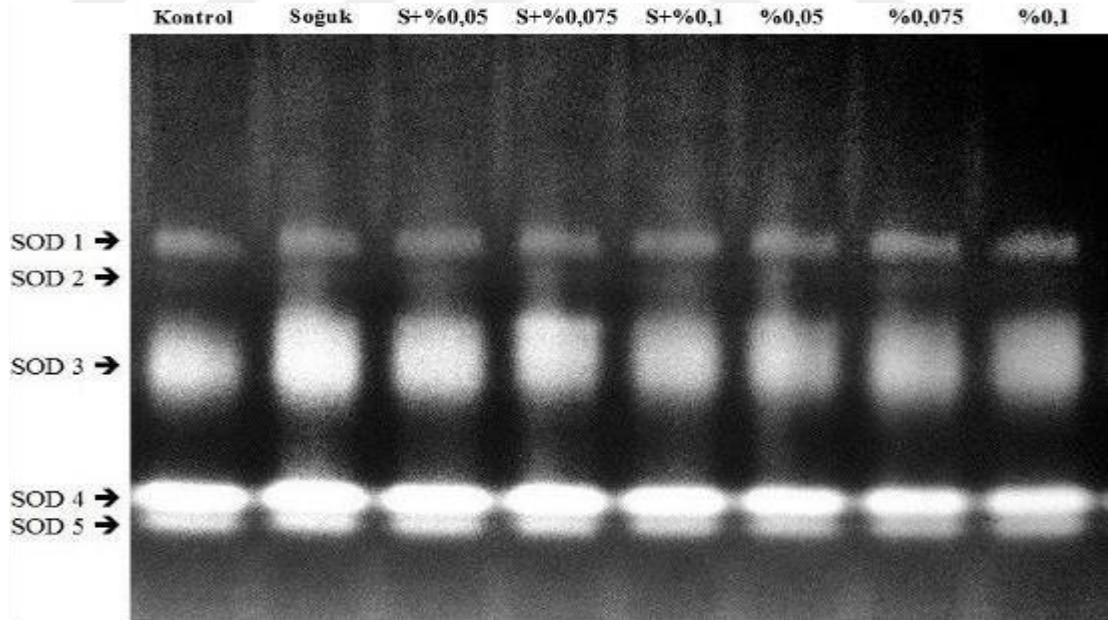
Çizelge 4.12. SOD aktivitesi ($U.mg^{-1}$ protein) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındane	Bezostaya
Kontrol	35.28±0.32c	29.04±0.27e
Soğuk	46.79±0.4a	36.3±0.35c
0.05 TTH	34.94±0.36c	30.18±0.30de
0.075 TTH	34.08±0.42c	31.46±0.42d
0.1 TTH	33.44±0.53c	29.78±0.70e
S+0.05TTH	45.88±0.5ab	36.89±0.52c
S+0.075TTH	46.24±0.15ab	38.94±0.60a
S+0.1TTH	44.38±0.27b	37.31±0.62b

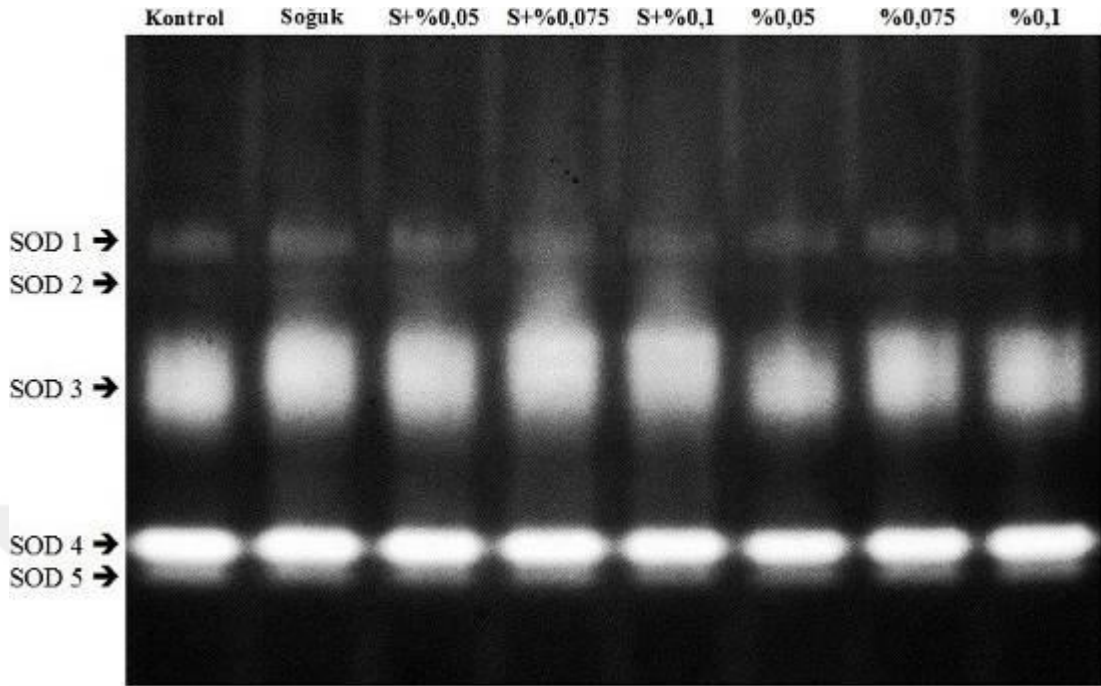
Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P<0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. S: soğuk, ±: SE



Şekil 4.18. SOD aktivitesi üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri



Şekil 4.19. Altındane çeşidinde TTH uygulamasının SOD izoenzimleri üzerine etkisi



Şekil 4.20. Bezostaya çeşidinde TTH uygulamasının SOD izoenzimleri üzerine etkisi

4.8.1.b. POX aktivitesi ve izoenzimleri

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, POX aktivitelerinde önemli artışa ($P < 0.05$) neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında, aktivite Altındanede kontrole göre %87, Bezostayada %21 oranında artmıştır (Çizelge 4.13, Şekil 4.21). Bu sonuç, POX izozimlerinin belirlendiği çalışmada ile de desteklenmiştir. Örneğin, POX izozim jel fotoğrafı incelendiğinde, soğuk uygulamasıyla hassas varyete de 2, 3 ve 5 nolu izozimler artarken, dirençli varyete 3 ve 5 nolu izozimlerin belirgin ölçüde artırdığı görülmektedir (Şekil 4.22 ve 4.23).

Tek başına TTH uygulamalarının üçü Altındanede POX aktivitesini önemli seviyede ($P < 0.05$) artırırken, Bezostayada ise düşürmüştür (Çizelge 4.13, Şekil 4.21). Bu uygulamalardan %0.1 TTH uygulaması, kontrole karşılaştırıldığında, aktiviteyi Altındanede %24 artırırken, %0.075 TTH uygulaması kontrole kıyasla Bezostayada %4.3 oranında azaltarak en etkili konsantrasyon olmuştur. Bu sonuç, POX izozimleri üzerinde de görülmektedir. Örneğin, POX izozim jel fotoğrafı incelendiğinde, hassas

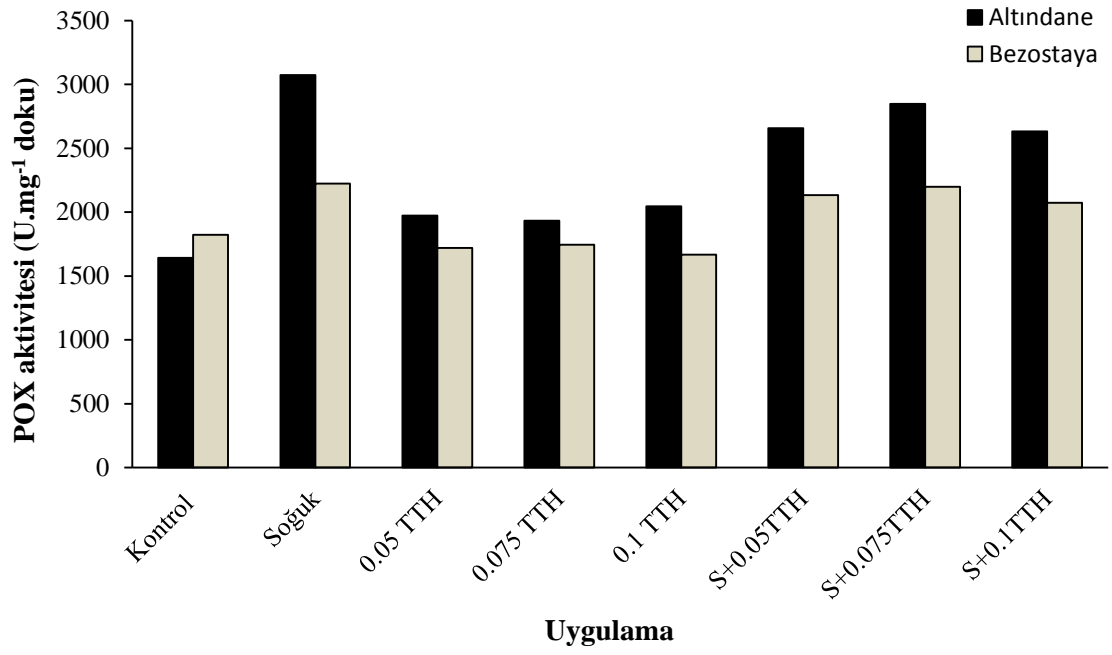
varyetede tek başına TTH uygulaması kontrol bitkilerine nazaran bariz bir yoğunluk artışına neden olurken, dirençli varyetede düşüşe neden olmuştur (Şekil 4.22 ve 4.23).

Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, POX aktivitesini hassas varyete ve dirençli varyetede düşürmüştür. Bu azalışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %13.5, %7.3 ve %14.3 oranında, Bezostaya ise %4, %1 ve %6.7 oranında olmuştur. Bununla birlikte Soğuk+TTH uygulamasında genelde %0.1 TTH konsantrasyonu en etkili doz olmuştur. Bu sonuç, POX izozimleri üzerinde de görülmektedir (Şekil 4.23).

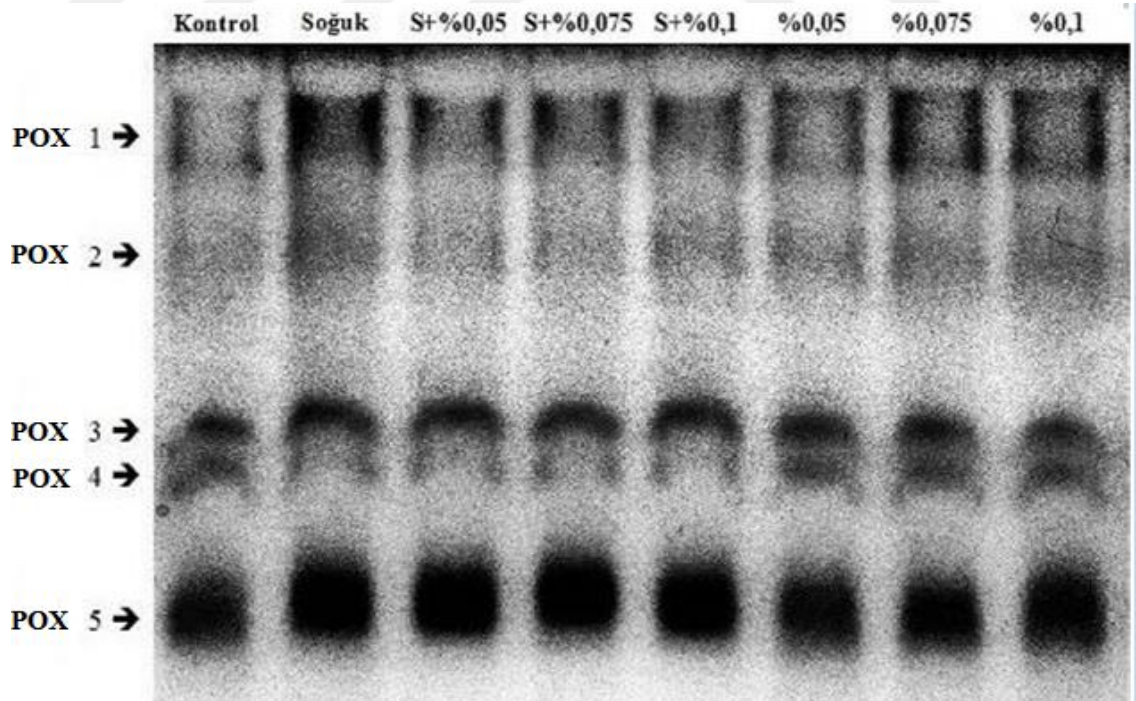
Çizelge 4.13. POX aktivitesi ($U \cdot mg^{-1}$ protein) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındanede	Bezostaya
Kontrol	1643±1e	1824±1.5b
Soğuk	3074±0.5a	2223±1a
0.05 TTH	1974±0.6d	1721±1.2b
0.075 TTH	1932±0.8d	1744±1.01b
0.1 TTH	2046±0.8d	1668±0.99b
S+0.05TTH	2658±0.9c	2133±0.5a
S+0.075TTH	2847±1.5b	2198±0.9a
S+0.1TTH	2633±1.0c	2074±0.93a

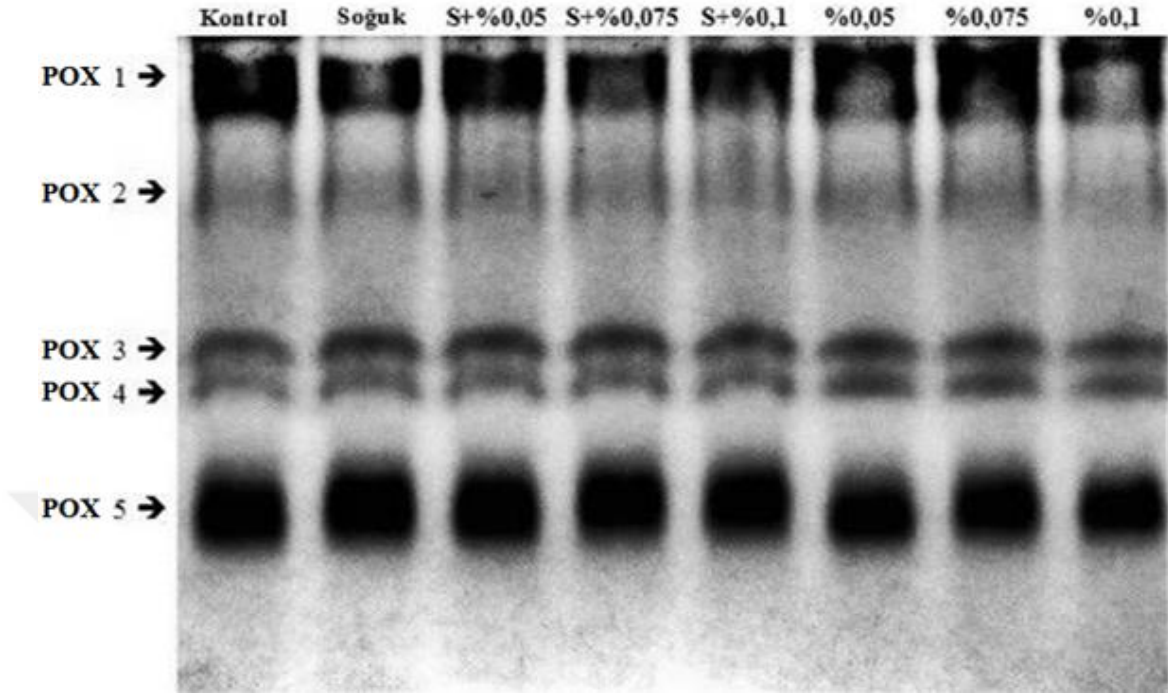
Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. S: soğuk, ±: SE



Şekil 4.21. POX aktivitesi üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri



Şekil 4.22. Altındane çeşidinde TTH uygulamasının POX izoenzimleri üzerine etkisi



Şekil 4.23. Bezostaya çeşidinde TTH uygulamasının POX izoenzimleri üzerine etkisi

4.8.1.c. CAT aktivitesi ve izoenzimleri

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, CAT enzim aktivitelerinde artışa ($P<0.05$) neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında aktivite, Altındanede kontrole göre %44 artarken, Bezostayada %17 oranında artmıştır (Çizelge 4.14, Şekil 4.24). Bu sonuç, CAT izozimlerinin belirlendiği çalışmada da desteklenmiştir. Örneğin, CAT izozim jel fotoğrafı incelendiğinde, soğuk uygulamasıyla özellikle hassas varyetede 3. bir bandın varlığı açıkça görülmektedir (Şekil 4.25 ve 4.26).

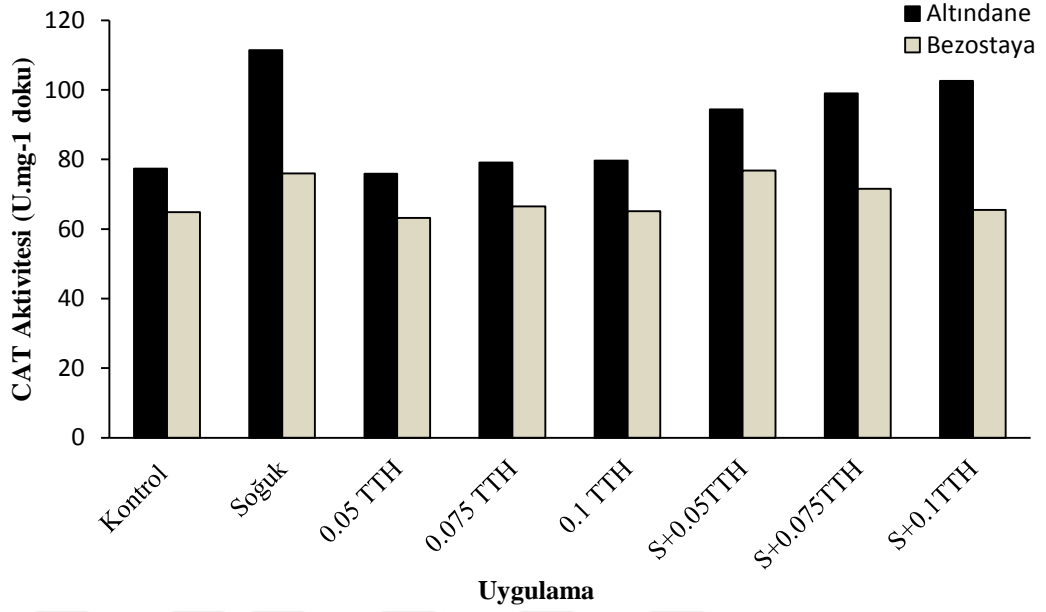
Tek başına TTH uygulamaları CAT aktivitesini Altındanede %0.1'lik dozda önemli seviyede ($P<0.05$) artış gözlenirken, Bezostayada ise %0.075'lik dozda bir artış gözlenmiştir (Çizelge 4.14, Şekil 4.24). Altındanede TTH uygulaması, kontrole karşılaştırıldığında, aktiviteyi %2.5 oranında artırırken, Bezostayada ise %3 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olmuştur. Bu sonuç, CAT izozimleri üzerinde de görülmektedir (Şekil 4.25 ve 4.26).

Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, CAT aktivitesini her iki varyetede genelde azaltmış ve azalışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %8, %10.8 ve %15.2 oranında, Bezostayada %0.075 ve %0.1 uygulamalarında %5.3 ve %13 oranında olmuştur. Görüldüğü gibi Soğuk+TTH uygulamasında genelde %0.1 TTH konsantrasyonu en etkili doz olmuştur. Bu sonuç, CAT izozimleri üzerinde de görülmektedir (Şekil 4.25 ve 4.26).

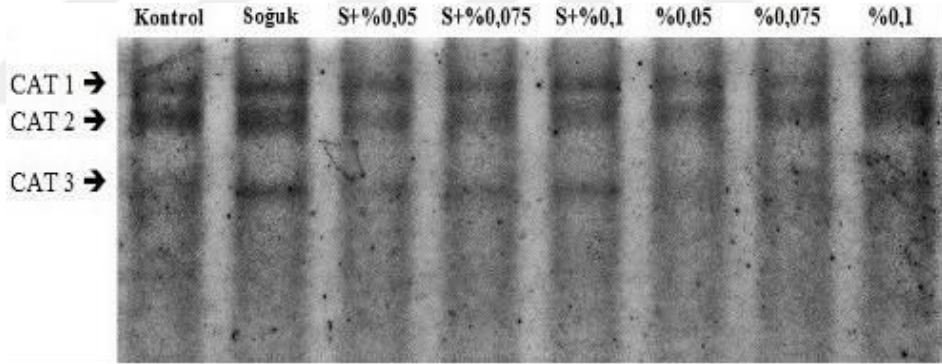
Çizelge 4.14. CAT aktivitesi ($U.mg^{-1}$ protein) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındanede	Bezostaya
Kontrol	77.33±0.45f	64.86±0.35cd
Soğuk	111.45±0.67a	75.98±0.53a
0.05 TTH	75.89±0.5g	63.22±0.48d
0.075 TTH	79.08±0.72e	66.48±0.6c
0.1 TTH	79.64±0.47e	65.14±0.51cd
S+0.05TTH	94.42±0.3d	76.84±0.72a
S+0.075TTH	99.02±0.37c	71.56±0.15b
S+0.1TTH	102.6±0.42b	65.48±0.35c

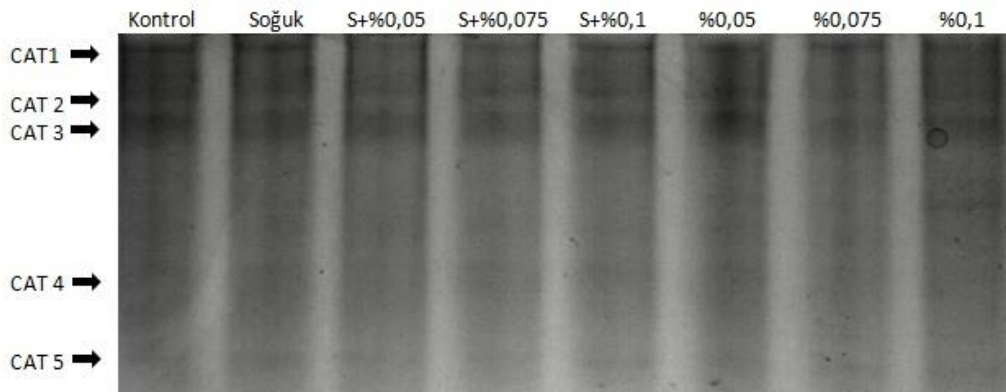
Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.24. CAT aktivitesi üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri



Şekil 4.25. Altındane çeşidinde TTH uygulamasının CAT izoenzimleri üzerine etkisi



Şekil 4.26. Bezostaya çeşidinde TTH uygulamasının CAT izoenzimleri üzerine etkisi

4.8.1.d. APX aktivitesi ve izoenzimleri

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, APX enzim aktivitelerinde artışa ($P<0.05$) neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında aktivite, Altındanede kontrole göre %44 artarken, Bezostayada %26 oranında artmıştır. (Çizelge 4.15, Şekil 4.27). Bu sonuç, APX izozimlerinin belirlendiği çalışmada da desteklenmiştir. Örneğin, APX izozim jel fotoğrafı incelendiğinde, soğuk uygulamasıyla özellikle 4 ve 5 nolu izozimleri her iki çeşitte belirgin ölçüde artırdığı görülmektedir (Şekil 4.28 ve 4.29).

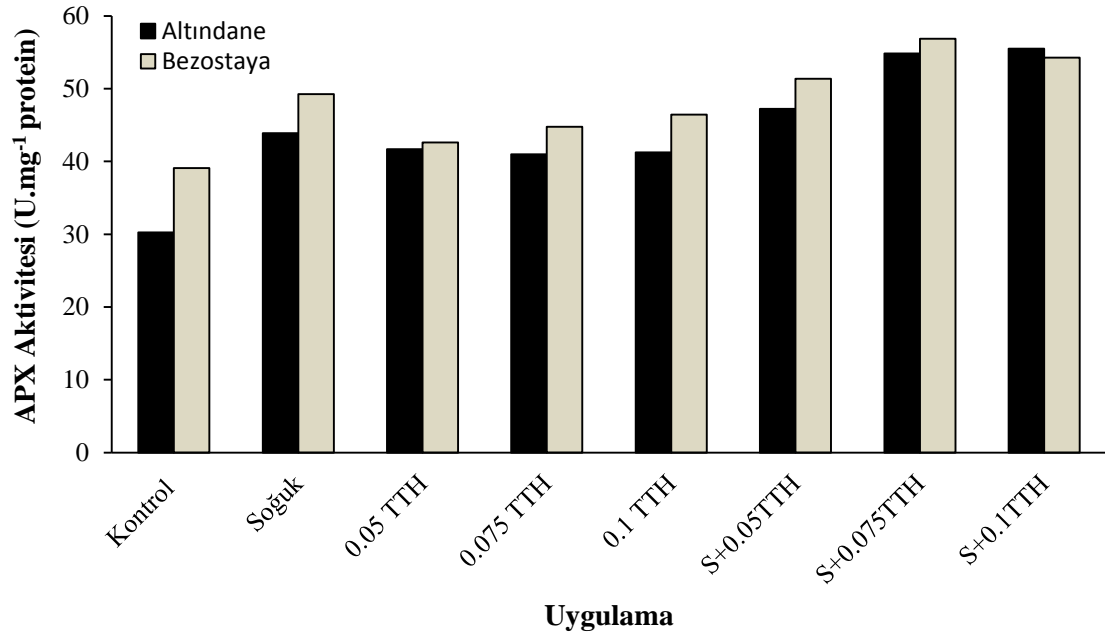
Tek başına TTH uygulamalarının üçü de, Altından ve Bezostayada APX aktivitesini önemli seviyede ($P<0.05$) artırmıştır (Çizelge 4.15, Şekil 4.27). Bu uygulamalardan %0.1 TTH uygulaması, kontrolle karşılaştırıldığında, aktiviteyi Altındanede %36 Bezostayada ise %18.8 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olmuştur. Bu sonuç, APX izozimleri üzerinde de görülmektedir. Örneğin, APX izozim jel fotoğrafı incelendiğinde, özellikle %0.075 ve %0.1 TTH uygulamaları, 4 ve 5 nolu izozimleri her iki çeşitte belirgin ölçüde artırdığı görülmektedir (Şekil 4.28 ve 4.29).

Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, APX aktivitesini her iki varyetede artırmış ve artışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %7, %24 ve %26 oranında, Bezostaya ise %4, %15 ve %10 oranında olmuştur. Görüldüğü gibi Soğuk+TTH uygulamasında da genelde %0.1 TTH konsantrasyonu daha etkili doz olmuştur. Bu sonuç, APX izozimleri üzerinde de görülmektedir. Şekil 4.28 ve 4.29'a dikkat edildiğinde, APX izozim jeli üzerinde özellikle Soğuk+%0.075 ve Soğuk+0.1 TTH uygulamaları, 4 ve 5 nolu izozimleri her iki çeşitte belirgin ölçüde artırdığı görülmektedir. Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda APX aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, buğday soğuğa maruz kaldığında APX aktivitesini artırdığı ve bu artışta en etkili dozun %0.1 TTH olduğu belirlenmiştir.

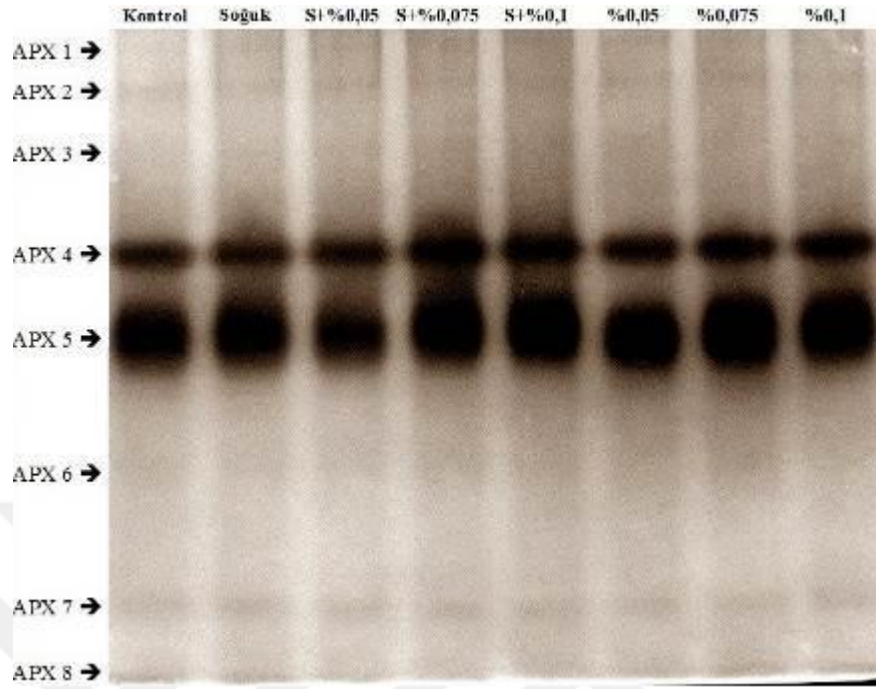
Çizelge 4.15. APX aktivitesi (U.mg^{-1} protein) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındane	Bezostaya
Kontrol	30.27±0.18e	39.08±0.32h
Soğuk	43.87±0,2c	49.27±0.40d
0.05 TTH	41.68±0.45d	42.60±0.5g
0.075 TTH	40.98±0.5d	44.78±0.5f
0.1 TTH	41.25±0.18d	46.44±0.1e
S+0.05TTH	47.21±0.37b	51.38±0.45c
S+0.075TTH	54.86±0.6a	56.87±0.5a
S+0.1TTH	55.49±0.4a	54.25±0.3b

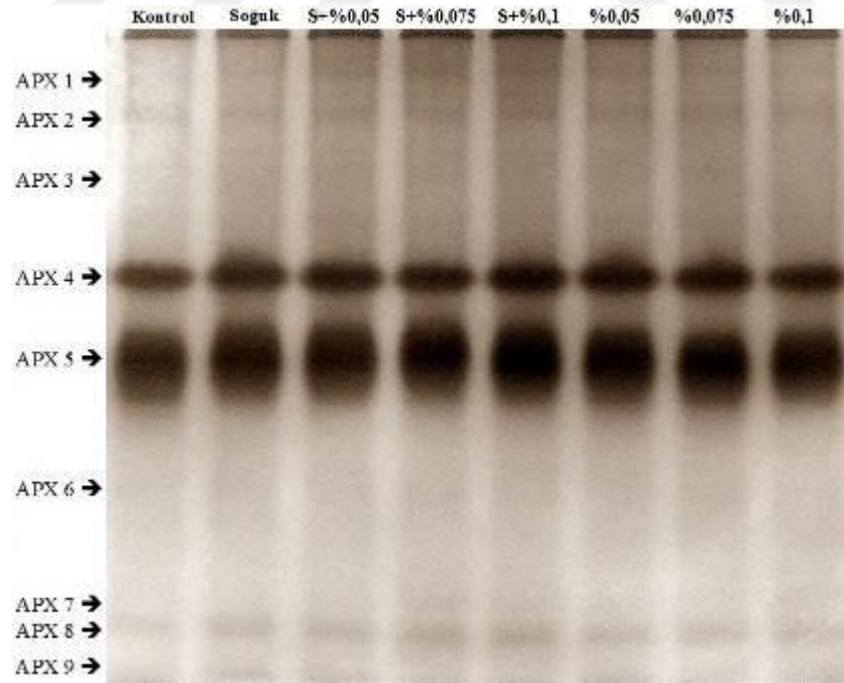
Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. \pm , standart hatayı (SE) gösterir.



Şekil 4.27. APX aktivitesi üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri



Şekil 4.28. Altındane bitkisine TTH uygulamasının APX izoenzimleri üzerine etkisi



Şekil 4.29. Bezostaya bitkisine TTH uygulamasının APX izoenzimleri üzerine etkisi

4.8.1.e. GR aktivitesi ve izoenzimleri

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, GR enzim aktivitelerinde artışa ($P<0.05$) neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında aktivite, Altındanede %83 artarken, Bezostayada %23 oranında artmıştır (Çizelge 4.16, Şekil 4.30). Bu sonuç, GR izozimlerinin belirlendiği çalışmada da desteklenmiştir. Örneğin, GR izozim jel fotoğrafı incelendiğinde, soğuk uygulamasıyla tüm bantların yoğunluğu her iki çeşitte belirgin ölçüde artırdığı görülmektedir (Şekil 4.31 ve 4.32).

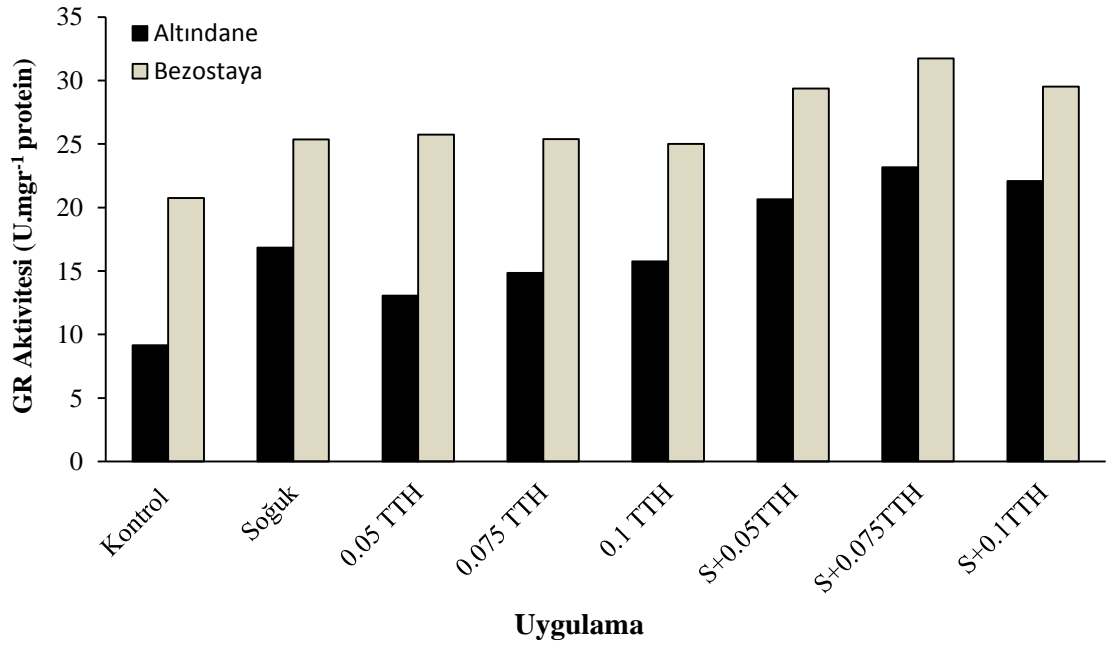
Tek başına TTH uygulamalarının üçü de, Altındanede ve Bezostayada GR aktivitesini önemli seviyede ($P<0.05$) artırmıştır (Çizelge 4.16, Şekil 4.30). Bu uygulamalardan %0.1 TTH uygulaması, kontrolle karşılaştırıldığında, aktiviteyi Altındanede %72 Bezostayada ise %0.05 uygulama aktiviteyi %24 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olmuştur. Bu sonuç, GR izozimleri üzerinde de görülmektedir. Örneğin, GR izozim jel fotoğrafı incelendiğinde TTH uygulamaları, tüm izozimleri her iki çeşitte belirgin ölçüde artırdığı görülmektedir (Şekil 4.31 ve 4.32).

Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, GR aktivitesini her iki varyetede artırmış ve artışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %22, %37 ve %31 oranında, Bezostaya ise %15, %25 ve %16.4 oranında olmuştur. Görüldüğü gibi Soğuk+TTH uygulamasında genelde %0.075 TTH konsantrasyonu en etkili doz olmuştur. Bu sonuç, GR izozimleri üzerinde de görülmektedir. Şekil 4.31 ve 4.32'ye dikkat edildiğinde, GR izozim jeli üzerinde özellikle Soğuk+%0.075 ve Soğuk+0.1 TTH uygulamaları, tüm izozimleri her iki çeşitte belirgin ölçüde artırdığı görülmektedir. Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda GR aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, buğday soğuğa maruz kaldığında da GR aktivitesini artırdığı ve bu artışta en etkili dozun %0.075 TTH olduğu belirlenmiştir.

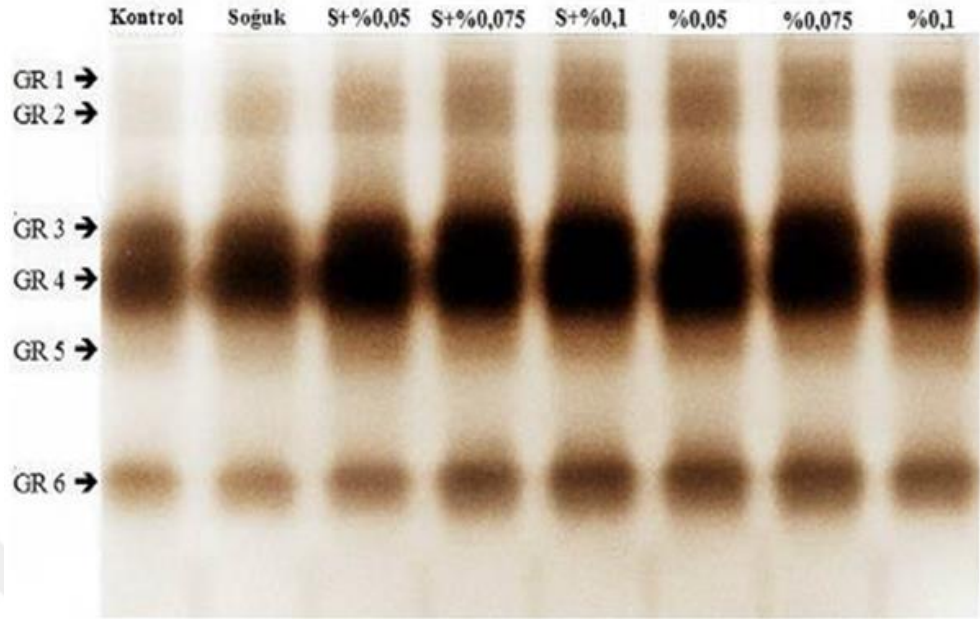
Çizelge 4.16. GR aktivitesi (U.mg^{-1} protein) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındane	Bezostaya
Kontrol	9.16±0.23f	20.75±0.23d
Soğuk	16.84±0.42c	25.36±0.22c
0.05 TTH	13.07±0.18e	25.75±0.48c
0.075 TTH	14.85±0.36d	25.40±0.6c
0.1 TTH	15.76±0.1cd	25.01±0.15c
S+0.05TTH	20.65±0.1b	29.36±0.3b
S+0.075TTH	23.17±0.3a	31.73±0.5a
S+0.1TTH	22.08±0.25ab	29.53±0.4b

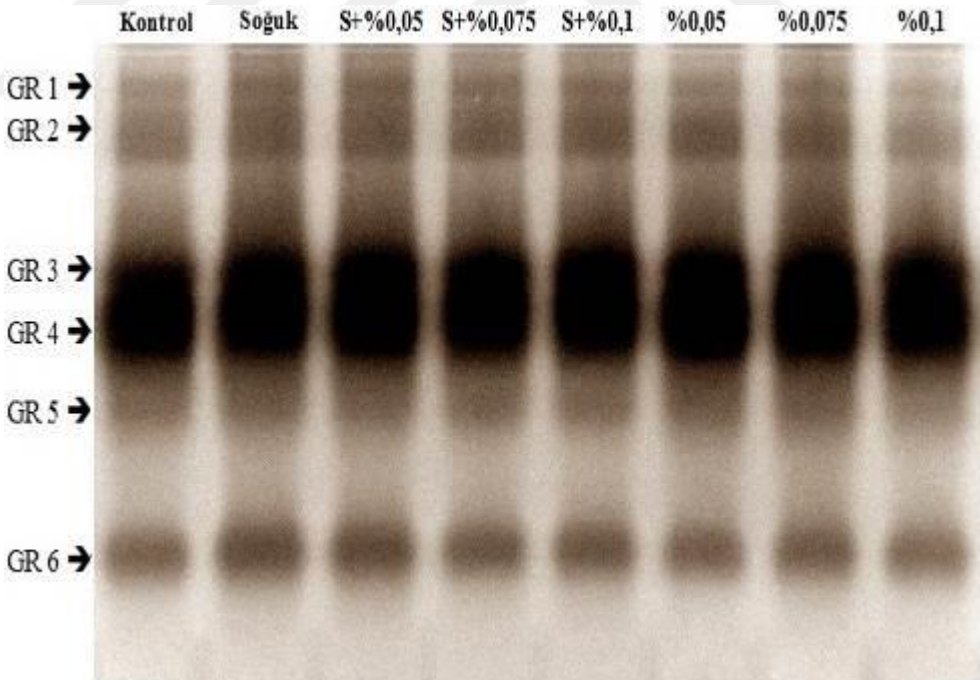
Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. \pm , standart hatayı (SE) gösterir.



Şekil 4.30. GR aktivitesi üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri



Şekil 4.31. Altındane çeşidinde TTH uygulamasının GR izoenzimleri üzerine etkisi



Şekil 4.32. Bezostaya çeşidinde TTH uygulamasının GR izoenzimleri üzerine etkisi

4.8.2. Enzimatik olmayan antioksidanlara ait bulgular

4.8.2.a. Total AsA, AsA ve DHA içerikleri

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, AsA içeriklerinde düşüğe ($P<0.05$) neden olurken, DHA içeriklerinde artışa neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında AsA içeriği, Altındanede kontrole göre %21.5 azalırken, Bezostayada %21 oranında azalmıştır. DHA içeriği ise, soğuk uygulaması Altındanede kontrole göre %101 artarken, Bezostayada %79 oranında artmıştır (Çizelge 4.17, Şekil 4.33 ve 4.34).

Tek başına TTH uygulamalarının üçü de, Altıdanede ve Bezostayada AsA içeriklerini önemli seviyede ($P<0.05$) artırırken, DHA içeriklerinde düşümlere neden olmuştur (Çizelge 4.17, Şekil 4.33 ve 4.34). AsA içeriği bu uygulamalardan %0.075 TTH uygulaması, kontrole karşılaştırıldığında, içeriği Altındanede %79 Bezostayada ise %36 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olmuştur. DHA içeriği ise %0.05 TTH uygulamasında kontrole karşılaştırıldığında, içeriği Altındanede %29.8 Bezostayada ise %14 oranında düşürerek en etkili konsantrasyon olmuştur.

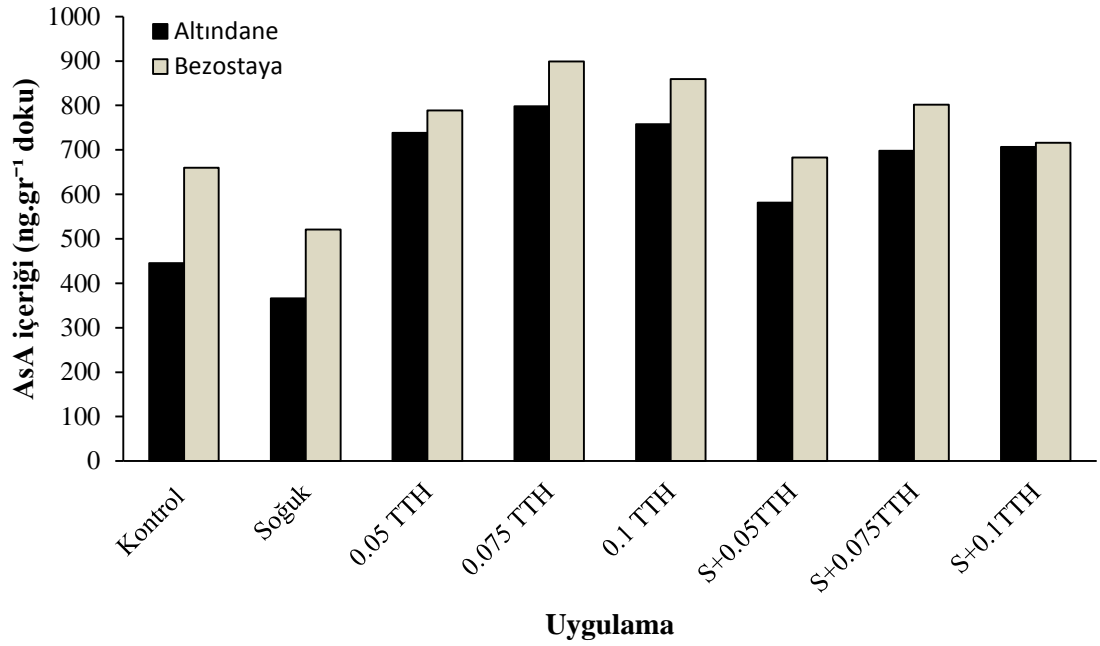
Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, AsA içeriğini her iki varyetede artırmış ve artışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %58.7, %90.7 ve %93 oranında, Bezostaya ise %31, %53.9 ve %37 oranında olmuştur. Soğuk şartlar altında Asa içeriğini artırmada %0.075 TTH en etkili doz olmuştur. Soğuk+TTH uygulamaları, DHA içeriğini ise her iki varyetede azaltmış ve azalışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %3.5, %2.8 ve %10.6 oranında, Bezostaya ise %7, %7.5 ve %1.6 oranında olmuştur. DHA içeriğinin düşürülmesinde en etkili doz hassas varyetede %0.075 TTH iken, dirençli olanda %0.1 TTH olmuştur (Çizelge 4.17, Şekil 4.33 ve 4.34). Buradaki veriler genel olarak değerlendirildiğinde, tek başına soğuk stresi AsA içeriğini düşürürken, DHA içeriğini artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, AsA

içeriğini artırırken, DHA içeriğini düşürdüğü ve bu artış ile azalışlarda etkili dozların %0.075 ve 0.1 TTH olduğu belirlenmiştir.

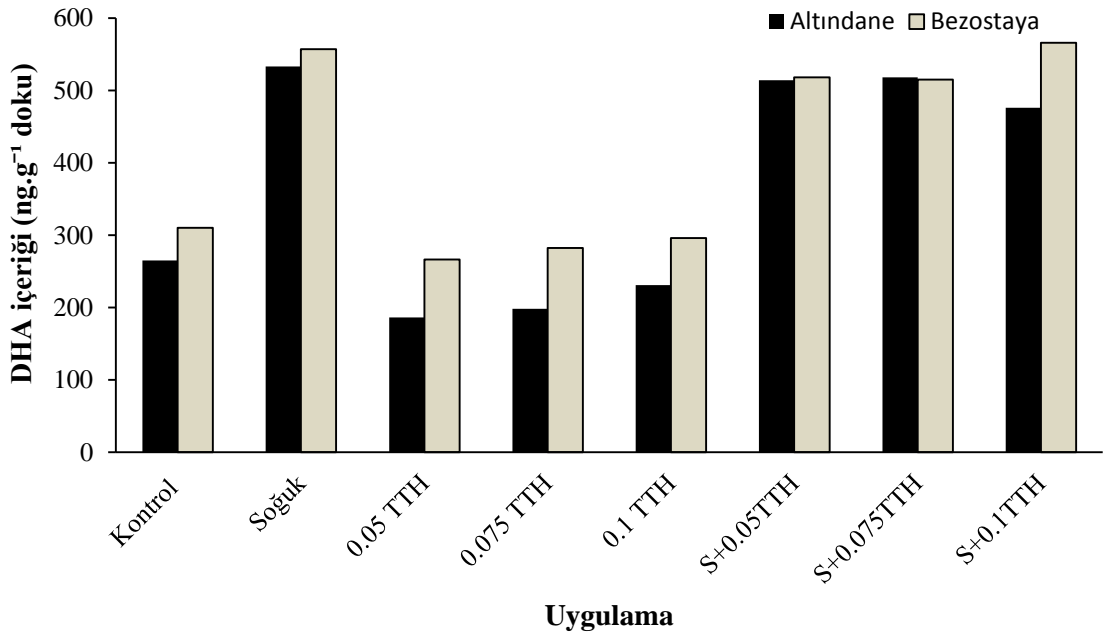
Çizelge 4.17. AsA ve DHA içerikleri (ng.gr^{-1} doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındane		Bezostaya	
	AsA	DHA	AsA	DHA
Kontrol	445±1d	265±2c	660±3c	310±0.9c
Soğuk	366±1.5e	533±2.5a	521±5e	557±2.0a
0.05 TTH	738± 2.8ab	186±2.8e	789±3.5b	266±1.3e
0.075 TTH	798±3a	198±3.2de	899±2,8a	282±1.0d
0.1 TTH	758±5ab	231±4dc	859±3ab	296±1.5cd
S+0.05TTH	581±2c	514±3a	683±5dc	518±1.8b
S+0.075TTH	698±3b	518±1a	802±5.2b	515±2.0b
S+0.1TTH	707±3b	476±2b	716±3d	566±2.5a

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. ±, standart hatayı (SE) gösterir.



Şekil 4.33. AsA içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri



Şekil 4.34. DHA içerikleri üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, total AsA içeriklerinde artışa ($P < 0.05$) neden olurken, AsA/DHA içeriklerinde düşüşe neden olmuştur. Soğuk uygulaması,

kontrol bitkileriyle kıyaslandığında total AsA içeriği, Altındanede kontrole göre %26.6 artarken, Bezostayada %11 oranında artmıştır. AsA/DHA içeriği ise, soğuk uygulaması Altındanede kontrole göre %58.9 azalırken, Bezostayada %55.8 oranında azalmıştır (Çizelge 4.18, Şekil 4.35 ve 4.36).

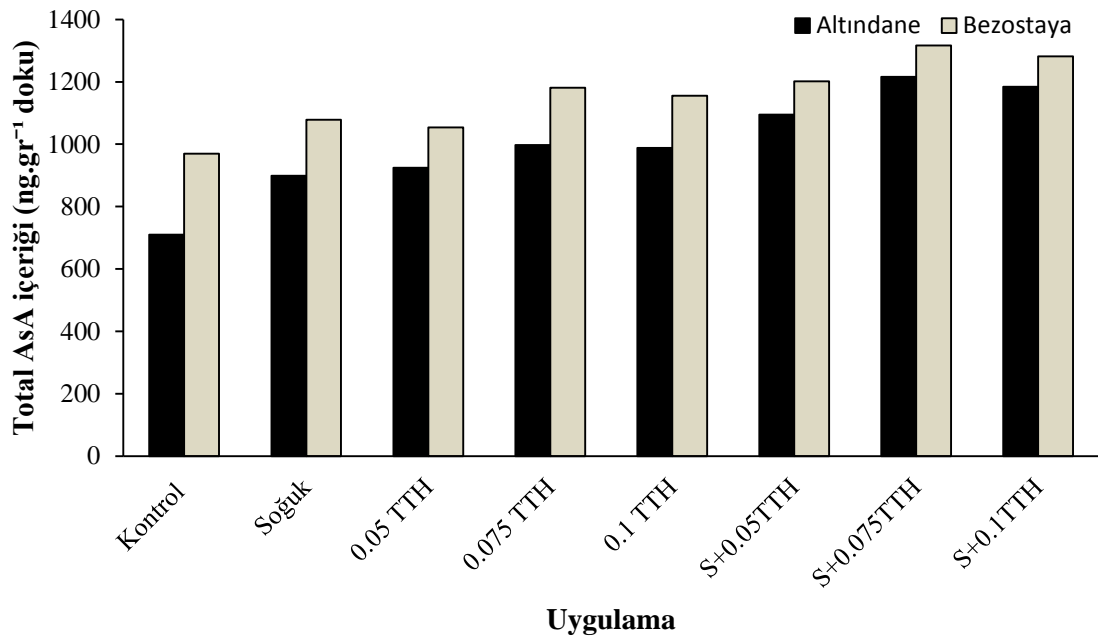
Tek başına TTH uygulamalarının üçü de, Altındane ve Bezostayada total AsA içeriğini ve AsA/DHA içeriğinde önemli seviyede ($P<0.05$) artışa neden olmuştur (Çizelge 4.18, Şekil 4.35 ve 4.36). Total AsA içeriği üzerine %0.075 TTH uygulaması, kontrole karşılaştırıldığında, Altındanede %40, Bezostayada ise %21.7 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olmuştur. AsA/DHA içeriği ise %0.075 TTH uygulamasında kontrole karşılaştırıldığında, içeriği Altındanede %139, Bezostayada ise %49.7 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olmuştur.

Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, total AsA içeriğini her iki varyetede artırmış ve artışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %21.8, %35 ve %31 oranında, Bezostaya ise %11.5, %22 ve %18.9 oranında olmuştur. Total AsA içeriğinde Soğuk+TTH uygulamasında %0.075 TTH konsantrasyonu en etkili doz olmuştur. AsA/DHA içeriğini ise her iki varyetede artırmış ve artışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %63.7, %95.6 ve %114 oranında, Bezostaya ise %40, %65.9 ve %34 oranında olmuştur. AsA/DHA içeriğinde ise Soğuk+TTH uygulamasında hassas varyetede %0.1 TTH konsantrasyonu iken, dirençli varyetede en etkili doz %0.075 TTH olmuştur (Çizelge 4.18, Şekil 4.35 ve 4.36). Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda total AsA içeriğini artırırken, AsA/DHA içeriğini düşürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca, soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, buğday soğuğa maruz kaldığında da total AsA içeriğini ve AsA/DHA içeriğini artırdığı ve bu artışlarda en etkili dozun %0.075 ve 0.1 TTH olduğu belirlenmiştir.

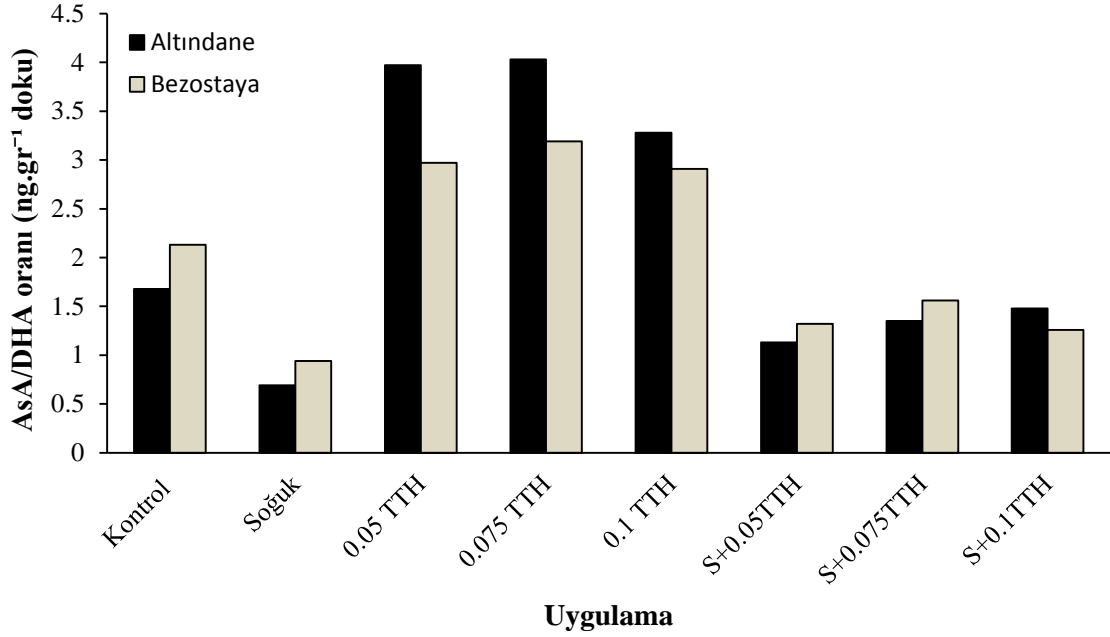
Çizelge 4.18. Total AsA ve AsA/DHA seviyeleri (ng.gr^{-1} doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındane		Bezostaya	
	Total AsA	AsA/DHA	Total AsA	AsA/DHA
Kontrol	710±1.0e	1.68±0.7c	970±2.0e	2.13±0.8c
Soğuk	899±1.2d	0.69±0.01g	1078±3.2cde	0.94±0.1fg
0.05 TTH	924±1.8d	3.97±0.42a	1054±2.8de	2.97±0.65ab
0.075 TTH	997±2.2cd	4.03±0.7a	1181±3.1abcd	3.19±0.65a
0.1 TTH	988±2.2cd	3.28±0.5b	1155±2.0bcd	2.91±0.41b
S+0.05TTH	1095±5.0bc	1.13±0.5f	1202±5.0abc	1.32±0.35de
S+0.075TTH	1216±3.1a	1.35±0.45e	1317±4.5a	1.56±0.48d
S+0.1TTH	1184±2.0ab	1.48±0.35d	1282±2.5ab	1.26±0.32def

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. \pm , standart hatayı (SE) gösterir.



Şekil 4.35. Total AsA seviyeleri üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri



Şekil 4.36. AsA/ DHA seviyeleri üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

4.8.2.b. GSH, GSSG ve total GSH içerikleri

Tek başına soğuk uygulaması, hassas varyetede GSH içeriğinde anlamlı ($P>0.05$) bir değişikliğe neden olmazken, dirençli varyetede düşüşe neden olmuştur (Çizelge 4.19, Şekil 4.37 ve 4.38). GSSG içeriği ise soğuk stresi ile her iki varyetede önemli oranda ($P<0.05$) artmıştır. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında GSH içeriği, Bezostayada %16.5 oranında azalmıştır. GSSG içeriği ise Altındanede kontrole göre %82 artarken, Bezostayada %113 oranında artmıştır (Çizelge 4.19, Şekil 4.37 ve 4.38).

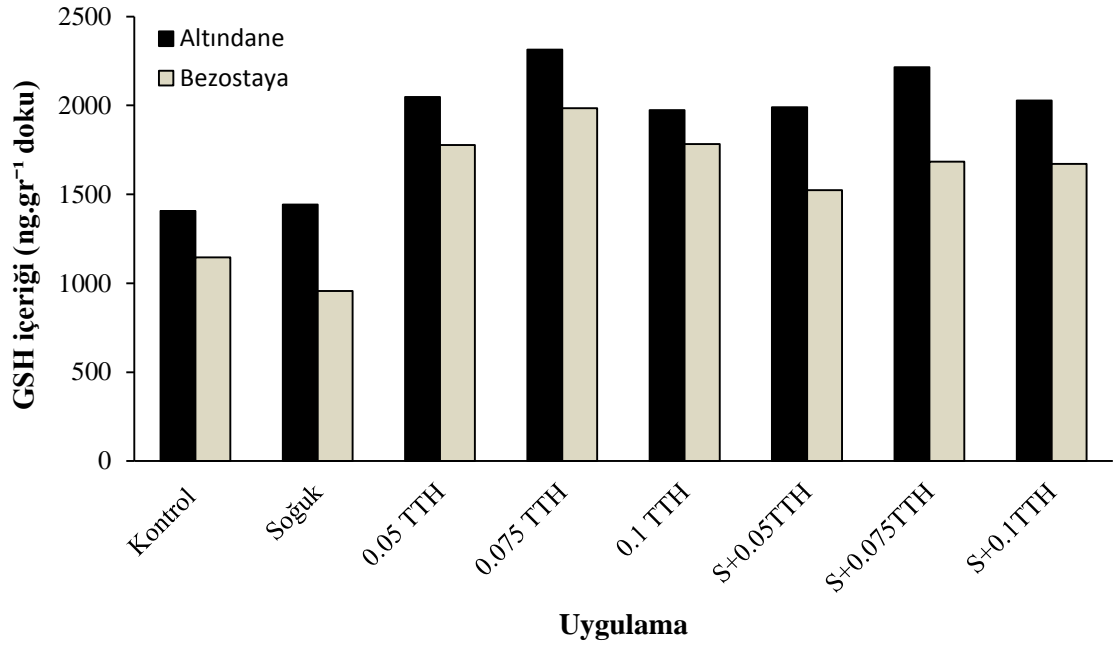
Tek başına TTH uygulamalarının üçü de, Altındane ve Bezostayada GSH içeriğinde önemli seviyede ($P<0.05$) artışa neden olmuştur. GSSG içeriği ise tek başına TTH uygulamaları ile Altındanede artarken, Bezostayada genelde düşürülmüştür. GSH içeriği, uygulamalardan %0.075 TTH tarafından Altındanede %64 Bezostayada ise %73 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olmuştur (Çizelge 4.19, Şekil 4.37 ve 4.38). GSSG artış ve düşüşünde de en etkili konsantrasyon %0.05TTH olmuştur.

Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, GSH içeriğini her iki varyetede artırırken, GSSG içeriğini hassas varyetede artırmış, dirençli varyetede ise genelde düşmüştür. GSH içeriğindeki artışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %38, %53.6 ve %40 oranında, Bezostaya ise %59, %76 ve %74.7 oranında olmuştur. GSH içeriğinin artışında, %0.075 TTH en etkili doz olmuştur. GSSG içeriği ise %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %12, %13 ve %9 oranında artarken, Bezostayada ise %1, %9 ve %3.7 oranında düşmüştür. GSSG içeriğinde de %0.075 TTH en etkili doz olmuştur (Çizelge 4.19, Şekil 4.37 ve 4.38). Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda GSH içeriğini hassas varyetede artırırken, dirençli varyetede özellikle %0.05TTH'da düşürmüştür. GSSG içeriğini ise her iki varyetede artırdığı belirlenmiştir. Hem GSH içeriğinde hemde GSSG içeriğinde en etkili dozun %0.075 olduğu belirlenmiştir.

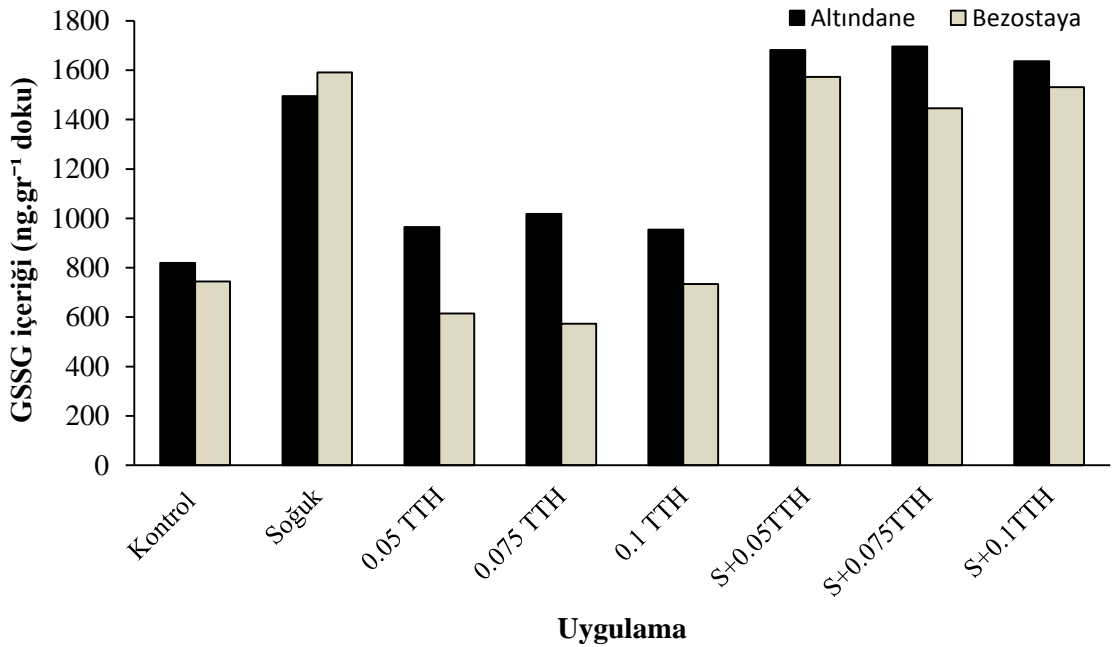
Çizelge 4.19. GSH ve GSSG seviyeleri (ng.gr⁻¹ doku) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındane		Bezostaya	
	GSH	GSSG	GSH	GSSG
Kontrol	1407±15d	820±5e	1146±18bc	744±5c
Soğuk	1442±20d	1495±6b	956±5d	1591±12a
0.05 TTH	2048±18b	965±3d	1777±21a	615±3b
0.075 TTH	2314±17a	1018±4c	1985±25a	573±5b
0.1 TTH	1974±13c	955±3.5d	1782±17a	734±8c
S+0.05TTH	1990±30cb	1681±3a	1524±22ab	1573±17a
S+0.075TTH	2215±25a	1696±4a	1684±15a	1446±11b
S+0.1TTH	2027±23b	1636±5a	1671±20a	1531±16a

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. ±, standart hatayı (SE) gösterir.



Şekil 4.37. GSH içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri



Şekil 4.38. GSSG içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede total GSH içeriğinde artışa ($P < 0.05$), aksine GSH/GSSG içeriğinde ise düşüşe neden olmuştur (Çizelge 4.20, Şekil 4.39 ve

4.40). Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında total GSH içeriği, Altındanede kontrole göre %31.8 artarken, Bezostayada %34.7 oranında artmıştır. GSH/GSSG içeriği ise Altındanede kontrole göre %44 azalırken, Bezostayada %61 oranında azalmıştır (Çizelge 4.20, Şekil 4.39 ve 4.40).

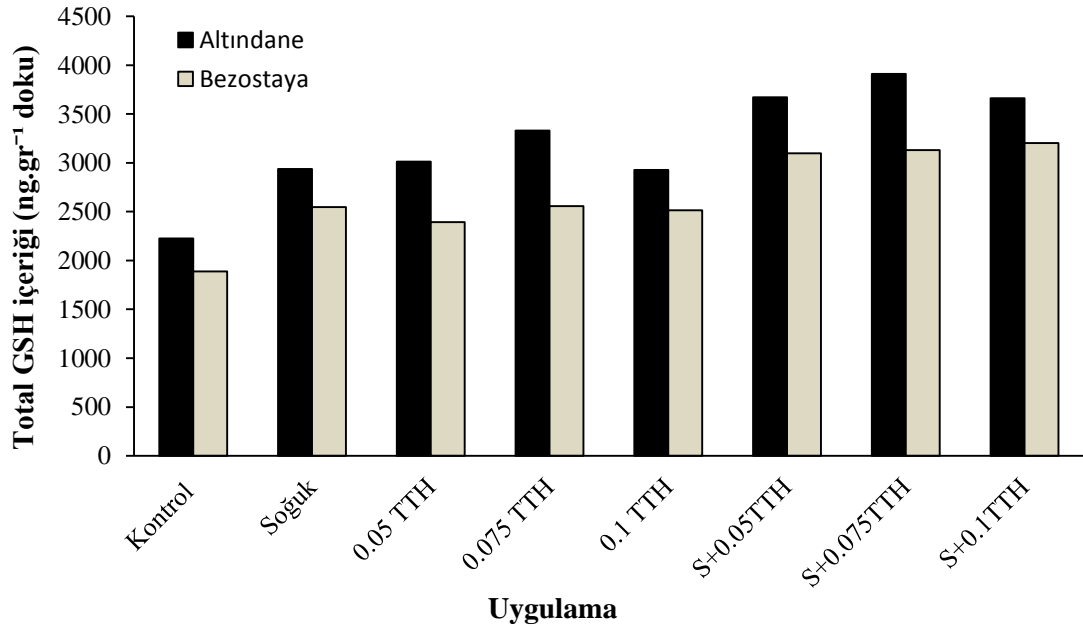
Tek başına TTH uygulamalarının üçü de, Altindane ve Bezostayada hem total GSH hemde GSH/GSSG içeriğinde genelde artışa neden olmuştur. Total GSH içeriği üzerinde bu uygulamalardan %0.075 TTH uygulaması, kontrole karşılaştırıldığında, içeriği Altındanede %49.6, Bezostayada ise %35 oranında artırarak en etkili konsantrasyon olurken, GSH/GSSG içeriğinde de aynı konsantrasyon Altındanede %32.5, Bezostayada ise %125 oranında artırarak en etkili doz olmuştur (Çizelge 4.20, Şekil 4.39 ve 4.40).

Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, hem total GSH içeriğini hemde GSH/GSSG içeriğini her iki varyetede artırmıştır ($P<0.05$). Total GSH içeriğindeki artışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %24.9, %33 ve %24.7 oranında, Bezostaya ise %21.5, %22.8 ve %25.7 oranında olmuştur. Total GSH içeriğinde Soğuk+TTH uygulamasında %0.075 ve %0.1 TTH konsantrasyonları en etkili doz olmuştur. GSH/GSSG içeriğindeki artışlar %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %22.9, %36 ve %29 oranında artarken, Bezostayada ise %61.6, %95 ve %81.6 oranında artmıştır. GSH/GSSG içeriğinde ise Soğuk+TTH uygulamasında %0.075 TTH konsantrasyonu en etkili doz olmuştur (Çizelge 4.20, Şekil 4.39 ve 4.40). Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda total GSH içeriğini artırırken, GSH/GSSG içeriğini düşürmüştür. Ancak soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, buğday soğuğa maruz kaldığında total GSH içeriğini ve GSH/GSSG içeriğini artırmıştır. Hem total GSH hem de GSH/GSSG içeriğinde en etkili dozların %0.075 ve %0.1 olduğu belirlenmiştir.

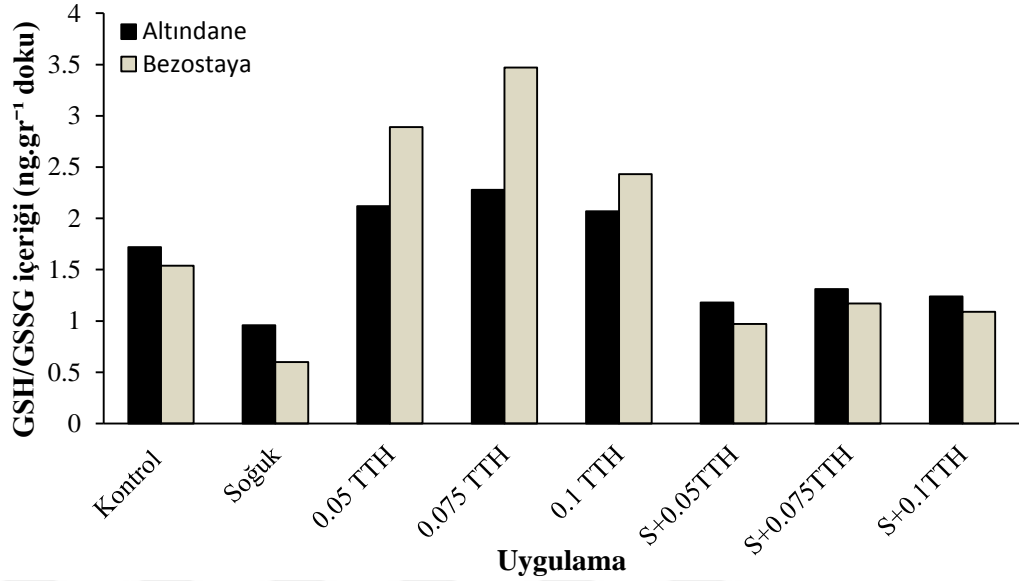
Çizelge 4.20. Total GSH içeriği (ng.gr^{-1} doku) ve GSH/GSSG seviyeleri üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındane		Bezostaya	
	Total GSH	GSH/GSSG	Total GSH	GSH/GSSG
Kontrol	2227±22e	1.72±0.5d	1890±20c	1.54±0.25d
Soğuk	2937±18d	0.96±0.15h	2547±25b	0.60±0.01h
0.05 TTH	3013±18d	2.12±0.7b	2392±19b	2.89±0.8b
0.075 TTH	3332±15c	2.28±0.62a	2558±20b	3.47±0.72a
0.1 TTH	2929±10d	2.07±0.53c	2516±21b	2.43±0.5c
S+0.05TTH	3671±29b	1.18±0.6g	3097±27a	0.97±0.3g
S+0.075TTH	3911±30a	1.31±0.42e	3130±20a	1.17±0.7ef
S+0.1TTH	3663±25b	1.24±0.15f	3202±23a	1.09±0.5ef

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. \pm , standart hatayı (SE) gösterir.



Şekil 4.39. Total GSH içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri



Şekil 4.40. GSH/GSSG oranı üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

4.8.2.c. Fenolik madde içeriği

Tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, fenolik madde içeriğinde artışa ($P < 0.05$) neden olmuştur. Soğuk uygulaması, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında, fenolik madde içeriğini Altındanede %25, Bezostayada %13.5 oranında artırmıştır (Çizelge 4.21, Şekil 4.41).

Tek başına TTH uygulamaları, Altındane ve Bezostayada fenolik madde içeriğini önemli seviyede ($P < 0.05$) azaltmıştır (Çizelge 4.21, Şekil 4.41). Bu uygulamalardan %0.075 TTH, Altındanede kontrolle karşılaştırıldığında içeriği %19.8 oranında, Bezostayada ise %0.1 TTH içeriği %20 oranında azaltarak en etkili konsantrasyonlar olmuşlardır.

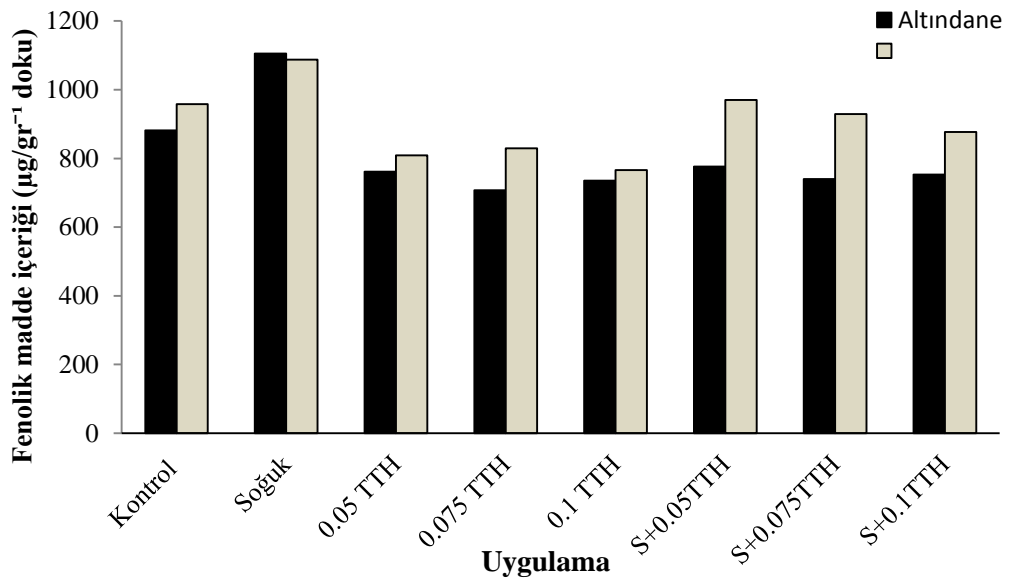
Soğuk+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, fenolik madde içeriğini her iki varyetede düşürmüştür (Çizelge 4.21, Şekil 4.41). Bu düşüşler %0.05, 0.075 ve %0.1 TTH uygulamalarında sırasıyla Altındanede %29.7, %33 ve %31.8, Bezostaya ise %10.8, %14.6 ve %19 oranında olmuştur. Diğer taraftan, Soğuk+TTH uygulamasında

genelde %0.05 TTH konsantrasyonu en etkili doz olmuştur. Bu sonuçlara göre, tek başına soğuk stresi buğdayda fenolik madde içeriğini önemli oranda artırdığı belirlenmiştir. Ancak soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, buğday soğuğa maruz kaldığında, fenolik madde içeriğini düşürdüğü ve en etkili dozun da %0.05 TTH olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.21. Fenolik madde içeriği ($\mu\text{g}/\text{gr}^{-1}$) üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

Uygulamalar	Altındane	Bezostaya
Kontrol	882±23.54b	958±47.86cb
Soğuk	1105±52.72a	1088±90.04a
0.05 TTH	761±13.15c	809±23.15e
0.075 TTH	707±20.78c	829±33.50fe
0.1 TTH	735±25.64c	766±34.07f
S+0.05TTH	776±25.74c	970±57.03cb
S+0.075TTH	740±30.42c	929±70.04c
S+0.1TTH	753±26.58c	877±28.48d

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır. \pm , standart hatayı (SE) gösterir.



Şekil 4.41. Fenolik madde içeriği üzerine farklı TTH konsantrasyonlarının (%) etkileri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Düşük sıcaklık stresinin bitkiler üzerindeki en önemli etkilerinden birisi, reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini artırarak metabolizmanın bozulmasına ve hücrelerde tahribata neden olmasıdır. Bu nedenle, ROT'un detoksifikasyonunu sağlayan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemde sağlanabilecek bir iyileşme bitki toleransının artırılmasına önemli katkı sağlayacaktır (Baxter *et al.* 2013). Günümüzde ROT'ların detoksifikasyonu ile bitki direncini artırmak için; bir taraftan bitki büyüme düzenleyicileri ve birçok kimyasal madde kullanılırken, diğer taraftan da biyoteknolojik yöntemlerle yüksek verimli ve streslere dayanıklı transgenik bitkiler elde edilmeye çalışılmaktadır (Kumar *et al.* 2014). Ancak bu maddelerin kullanımının, onları gıda olarak kullanan insan ve hayvanların sağlıkları açısından ne derece uygun oldukları halen önemli bir tartışma konusudur. Bu yüzden, hem bitki büyüme ve gelişmesini teşvik etmek, hem de bitkilerin direncini artırmak için organik kökenli maddelerin ve biyogübrelerin kullanıldığı organik tarıma olan ilgi giderek artmaktadır (Senthilkumar *et al.* 2016). Bu amaçla çok sayıda çalışma yapılmasına ve çok büyük bütçeler harcanmasına rağmen, henüz problemi çözecek anlamda tatmin edici sonuçlar elde edilememiştir. Bu bağlamda mevcut çalışmada, ülkemiz ve dünya genelinde hızla gelişen tavukçuluk sektörünün en önemli atıklarından biri olan tavuk tüyünün, zengin organik ve inorganik içeriği nedeniyle, soğuk stresine karşı bitki toleransının artırılmasında kullanılması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak tavuk tüyünden suda çözünebilir protein hidrolizati hazırlanmıştır. Hazırlanan tavuk tüyü protein hidrolizati (TTH) üç konsantrasyonda (%0.05, 0.075 ve 0.1) buğdayın Altındane (soğuğa duyarlı) ve Bezostaya (toleranslı) çeşitlerine uygulanmıştır. Daha sonra, bitkiler 3 gün için soğuğa (5/2°C) transfer edilmişlerdir. Soğuk uygulamasından sonra hasat edilen bitkilerde literatürde soğuk toleransının değerlendirilmesinde en çok kullanılan fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerin kontrollerine göre değişimleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler literatür bilgileri ışığında tartışılmıştır.

Protein hidrolizatlarının hazırlanmasında en önemli adım hidroliz prosesidir. Çünkü hidroliz işlemi sırasında ortaya çıkan NaCl vb. gibi aşırı oluşan inorganik tuzlar, bitki

yaşamı için toksik olduğundan uygun olmayacaktır. Genelde hayvansal kaynaklı protein hidrolizatlarının üretilmesinde bazik, asidik veya her ikisini içine alan kimyasal prosesler kullanılır. Asit hidroliz prosesi yüksek sıcaklıklarda (yaklaşık 120°C) ve basınçta (yaklaşık 220 kPa) gerçekleştirilmesine rağmen, alkali hidroliz prosesi buna göre birçok avantajı içeren daha basit bir işlemdir (Pasupuleti and Braun 2010). Çalışmamızda tavuk tüyünün hidrolizi prosesi, Taşkın ve Kurbanoglu (2011) ve Taşkın (2012)'nin önerdikleri yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak, KOH ile başlatılmış ve daha sonra H₃PO₄ ile nötralize edilerek sonlandırılmıştır (Şekil 3.1 ve 3.2). Bu işlem, NaCl'den ziyade bitkiler için iki makro besin minerali (K ve P) içeren fosfat tuzunun oluşmasına sebep olduğundan dolayı, bitki büyüme ve gelişmesi için daha uygun bir prosestir. Çalışmada toplam 80 gram kurutulmuş tavuk tüyü kullanılsada, süzme işlemi sonucunda bunun 76 gramının çözündüğü görülmüştür. Dolayısıyla, hidrolizat içerisine 76 gram çözünebilir materyalin geçtiği düşünülmüştür.

Yukarıda ifade edildiği şekilde üretilen TTH'nın çok zengin bir organik içeriğe sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1). TTH'nın toplam protein veriminin %72.8 gibi yüksek olduğu ve 19 tane proteinik aminoasit ve 3 tane proteinik olmayan aminoasit içerdiği belirlenmiştir. Hazırlanan hidrolizat içinde sadece glutamin belirlenemedi. Elde edilen hidrolizat analiz edildiğinde protein verimi, amino asit ve mineral içeriği, Taşkın ve Kurbanoglu (2011) ve Taşkın (2012) tarafından hazırlanan protein hidrolizat içeriğine benzerdi. Elde edilen TTH; prolin, glisin, glutamat, aspartat, lösin, fenilalanin, sistein ve valin gibi proteinlerde hem bol hem de nadir bulunan aminoasitler bakımından zengindi. Diğer taraftan TTH'nın önemli oranlarda sitrüllin, sistin ve ornitin gibi proteinik olmayan aminoasitleri de barındırdığı görüldü. TTH ayrıca bitkide antioksidan olarak kullanılan sistein ile birlikte fenilalanin gibi aromatik aminoasitleri de önemli oranlarda içermektedir. Yapısında bulundurduğu bu aminoasitler sayesinde bitkiler için önemli bir besin kaynağı olmasının yanında, bitkiyi strese karşı da korumada etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu maddenin buğday bitkilerinin büyüme ve direnç parametreleri üzerine etkileri aşağıda detaylı olarak tartışılıp, soğuğa toleransları farklı olan iki buğday varyetesinde TTH'nın etki mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi amaçlanmıştır.

Kök uzaması ve gövde büyümesinde meydana gelen inhibisyonlar bitkilerin soğuk stresine verdiği en hızlı cevaplar arasındadır. Bu nedenle, bu organlardaki inhibisyon oranları bitkilerin strese karşı tolerans derecelerini göstermesi bakımından önemlidir. Temel bitki organı olan kökler, su ve besinlerin absorbe edilmesi ve diğer organlara iletilmesinin yanı sıra bitkilere mekanik destek görevi de görmektedir (Feng *et al.* 1995). Toprak sıcaklığındaki aşağı veya yukarı yönlü değişimlerden kolayca etkilenen bu organlarda değişiminin büyüklüğüne bağlı olarak önemli inhibisyonlar meydana gelmektedir. Yapılan çalışmalar, düşük sıcaklıkların kök aktivitesi üzerine direkt etkiye sahip olduğunu ve köklerin düşük sıcaklıklara sanıldan çok daha hassas olduğunu ortaya koymuştur (Neumann and Römhald 2007). Mevcut çalışmada da soğuk stresi hem dayanıklı hem duyarlı iki buğday varyetesinin kök-gövde uzunlukları ile yaş ağırlıkta belirgin inhibisyonlara yol açtı (Çizelge 4.2 ve 4.3). Soğuk uygulaması, genelde kök ve gövde uzunluğu üzerinde hassas çeşit olan Altındanede daha negatif etkiye neden olmuştur. Soğuk stresi altında büyüme parametrelerinde meydana gelen bu azalmalar çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilen bulgularla da uyum göstermektedir (Aghaee *et al.* 2011; Gorbani *et al.* 2011). Örneğin Aidoo vd (2017) soğuk stresine maruz bırakılan biber bitkisinde kök büyümesinin yavaşladığı ve kök uzaması ve büyümesinde önemli inhibisyonların meydana geldiğini rapor etmiştir. Benzer şekilde, Liu vd (2010) soğuk stresinin kışlık buğday bitkilerinde kök uzamasından biyomasa kadar birçok büyüme parametresinde inhibisyonlara neden olduğunu bildirmiştir. Büyüme parametrelerinde soğuk stresi kaynaklı bu inhibisyonlar, hücre zarlarında meydana gelen bozulma ve suyun viskozitesindeki artıştan kaynaklanan su alınımının azalmasının yanı sıra, turgorun azalması ve stomaların kapanması nedeniyle karbon asimilasyonunda meydana gelen inhibisyonla da bağlantılıdır. Aktivitesi azalan fotosentezin karbon çemberi nedeniyle şeker üretimi ve dolayısıyla yapraklardan diğer organlara ihraç edilen karbon miktarında önemli bir azalma meydana gelir ve buna bağlı olarak kök ve yapraklardaki kuru madde miktarları da indirgenir (Feng *et al.* 1995; Liu *et al.* 2010; Aghaee *et al.* 2011). Ancak çalışmamızda, soğuk stresi öncesi uygulanan TTH (S+TTH), soğukun kök ve gövde uzunluğu üzerindeki olumsuz etkisini hafifleterek, buğday soğuğa maruz kaldığında bu parametrelerdeki düşüşleri iyileştirmiştir (Çizelge 4.2). İlave olarak, S+TTH uygulamaları, her iki çeşitte soğuk stresi etkisiyle azalan yaş ağırlığı da artırmıştır

(Çizelge 4.3). Ayrıca bu parametreler üzerinde en etkili dozun %0.075 TTH olduğu da belirlenmiştir. Bu veriler, TTH tarafından başta fotosentez ve protein sentezi olmak üzere çeşitli biyosentez reaksiyonlarının uyarıldığını gösterebilir. Çünkü bizim çalışmamızda soğuk uygulamasıyla azalan klorofil (Çizelge 4.4) ve Rubisco aktivitesi (Şekil 4.6 ve 4.7) TTH uygulamasıyla iyileştirilebilmiştir. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, uygulanan TTH buğdayda fotosentezin hem ışık hem de karbon fiksasyon reaksiyonlarını uyardığı ve bunun fizyolojik bir sonucu olarak kök-gövde uzunluğu gibi biyomasda bir artış olduğu yorumlanabilir. Bulgularımızı destekler nitelikte, alfalfa protein hidrolizati ile yapılan bir çalışmada, elde edilen protein hidrolizati mısır bitkisine uygulandığında TCA döngüsü ile azot metabolizması enzimlerini uyararak mısır bitkisinde büyümenin artırıldığı belirlenmiştir (Schiavon *et al.* 2008).

TTH'nin fotosentez üzerine etkilerini belirlemek ve böylelikle büyüme ve gelişmede meydana gelen değişmelerin fotosentetik aktiviteyle ilgili olduğunu ortaya koymak için fidelerde hem klorofil içeriği hem de Rubisco enziminin protein miktarı belirlendi. Çizelge 4.4 incelendiğinde, soğuk stresi her iki varyetede total klorofil ve karotenoid içeriklerini düşürmüştür. S+TTH uygulamaları ise her iki varyetede, kontrolüne oranla, total klorofil ve karotenoid içeriklerinde önemli artışlara neden oldu. Yapılan benzer bir çalışmada koç boynuzundan elde edilen protein hidrolizati fasulye yapraklarına uygulandığında, klorofil-a, b ve toplam klorofil içeriği anlamlı derecede artmıştır (Kurbanoglu *et al.* 2004). Birçok araştırmacı bitkide klorofil içeriğindeki iyileşmeyi, metabolik aktivitedeki ivmelenmeye bağlamaktadırlar (Abdel-Sabour and Abo El-Seoud 1996). Ayrıca, klorofil içeriğindeki artışlar, fotosentetik ürünlerin artışı işaret eden fotosentez etkinliği ile orantılı olduğu da belirtilmiştir (Atıcı *et al.* 2003). Bizim bulgularımızda da klorofil içeriğinden elde edilen bulgular, çalışılan büyüme parametrelerinden elde edilen bulgular ile tutarlı idi (Çizelge 4.4). Buna ilave olarak, artan pigment içeriğinin fotosentezin karbon fiksasyon reaksiyonlarına yansıyor yansımadağı belirlemek için Rubisco enziminin etkinliği Western Blot ile belirlendi (Şekil 4.6 ve 4.7). Rubisco (Rubiloz 1,5-Bifosfat Karboksilaz/Oksijenaz) bilindiği üzere fotosentezde karbon fiksasyonunda (Calvin veya C3 yolu) rol alan temel

enzimdir. Rubisco'nun etkinliği bitki verimi ve büyüme-gelişmeyle doğrudan ilişkilidir. Bu çalışmada soğuk uygulaması, kontrol bitkilerine göre, buğdayın iki çeşidinde de Rubisco sentezini önemli seviyede düşürmüştür (Şekil 4.6 ve 4.7). Diğer taraftan her iki buğday varyetesi soğuğa maruz kalmadan uygulanan TTH (S+TTH), Rubisco sentezini her iki varyetede önemli seviyede artırmıştır. Bu verilere göre, TTH'ın fotosentezin karbon fiksasyonunu ve organik madde sentezini iyileştirdiği ileri sürülebilir. Artan fotosentetik aktiviteye bağlı olarak organik madde miktarında artış meydana geldiği ve beraberinde protein sentezinden azot metabolizmasına kadar çok sayıda metabolik süreçlerin de aktif hale gelerek büyüme ve gelişmeye katkı sağladığı düşünölmektedir. Nitekim, protein hidrolizatlarındaki bazı serbest amino asitlerin; fotosentez, protein sentezi, lignifikasyon hızı ve abiyotik stres direncinde yer alan mekanizmalar üzerine etki ederek bitki büyümesini olumlu yönde etkileyebileceği ileri sürölmüştür (Colla *et al.* 2015a).

Çözünür protein içeriği bitki metabolizmasında dönüşümlü ve dönüşümsüz değişimlerin indikatörü olması bakımından çok önemlidir. Dışsal farklılaşma genellikle içsel dokulardaki protein, karbohidratlar ve prolin değişimleri tarafından belirlenir. Bu nedenle bu parametreler büyüme ve gelişmenin indikatörleri olarak kabul edilirler (Dogra and Kaur 1994). Ayrıca birçok bitkide, serbest prolin, geniş bir biyotik ve abiyotik strese cevap olarak birikir (Hare and Cress 1997). Kavunda balık protein hidrolizatının uygulandığı bir çalışmada, uygulanan hidrolizat hücrelerde prolin seviyesini artırarak ve pentoz fosfat yolunu aktifleştirerek sitokinin ve oksin hormonlarını uyardığı bulunmuştur (Milazzo *et al.* 1999). Ayrıca transgenik *Arabidopsis thaliana*'da prolinin morfogenez ve ozmotoleranstaki biyolojik fonksiyonları incelendiğinde, Prolinin stresli bitkilerde osmoregulator olarak görev aldığı ve hücre duvarının yapısal proteinlerinin önemli bir unsuru olarak ozmotoleransta benzersiz bir işleve sahip olduğu ileri sürölmüştür (Nanjo *et al.* 1999). Bizim bulgularımızda Çizelge 4.5, 4.6 ve 4.7 incelendiğinde, soğuk stresi her iki çeşitte protein, şeker ve prolin içeriklerini önemli derecede artırdı. S+TTH uygulamaları da soğuk etkisiyle artan bu parametrelerin daha fazla artışına neden olmuştur. SDS-PAGE görüntüleri de uygulamalardan kaynaklanan çözünür protein içeriğindeki artışları

doğruladı. Şekil 4.10 ve 4.11 incelendiğinde soğuk stresindeki artışın uygulamalarla daha fazla arttığı açık bir şekilde görülmektedir. Tek başına TTH uygulamaları da özellikle 100, 50, 25 ve 15 kDa'luk proteinlerin birikimlerinde belirgin artışlara neden olduğu görüldü. Bu sonuç, TTH uygulamaların hem büyük hem de küçük molekül ağırlığına sahip proteinlerin sentezini artırmak suretiyle metabolizmada sadece bir yönlü değil çok yönlü etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle 55 kDa civarında protein bandının miktarında artışların meydana gelmesi, bu uygulamaların direk fotosentez süreci üzerine etkisinin olabileceği fikrini de desteklemiştir. Çünkü fotosentezin kilit enzimi olan Rubisco'nun büyük alt biriminin molekül ağırlığı 56 kDa ağırlığındadır.

Diğer taraftan Kurbanoglu vd (2004)' nun yaptıkları çalışmada, koç boynuzundan elde edilen protein hidrolizatını fasulye bitkilerine uyguladıklarında, fasulye yapraklarındaki prolin içeriğinin uygulanan koçboynuzu protein hidrolizatı ile arttığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada prolin artışının kontrol bitkilerine göre yaklaşık %40 arttığı ifade edilmiştir. Buna ilave olarak, prolin ve glutamati içeren balık protein hidrolizatları, bezelye ve kavun fidelerinde endojen prolin içeriğini arttırmıştır (Milazzo *et al.* 1999; Andarwulan and Shetty 1999). Bizim çalışmamızda TTH uygulamasıyla elde edilen sonuç, yukarıda yapılan araştırmalardan elde edilen bulgu ile uyumludur. Prolin aminoasidi, bitki hücresinde önemli bir yere sahiptir ve glutamattan bir dizi indirgeme tepkimesi ile sentezlenir ve daha sonra pentoz fosfat, şikimat ve fenilpropanoid yollar gibi bazı anabolik yolları stimüle eder (Hare and Cress 1997; Andarwulan and Shetty 1999). Glutamat ve prolin hücrel redoks döngüleri, anabolik yolların uyarılmasıyla (Andarwulan and Shetty 1999) sitokinler ve indol asetik asit gibi fenolik metabolitleri ve bitki hormonları içeriğini artırabilmektedir. Bu bileşikler, özellikle lignifikasyon ve bitki büyümesi ve regülasyonu için, farklılaşma ve organogenez süreçleri için kullanılmaktadır (Lynn and Chang 1990; Milazzo *et al.* 1999; Andarwulan and Shetty 1999).

Bilindiği gibi stres şartlarına maruz kalan bitkilerde ROT seviyelerinde önemli artışlar meydana gelmekte ve artan ROT seviyesine bağlı olarak hücrel hasarın büyüklüğü de

artmaktadır. Stres şartlarına maruz kalan bitkilerde meydana gelen hasarın ve bitkilerin maruz kaldığı stresin büyüklüğünün belirlenebilmesi için genellikle lipid peroksidasyon seviyesi (MDA olarak) ve elektriksel konduktivite ölçümü (hücre zarı iletkenliği) yapılır. ROT'ların ilk saldırdıkları yer hücre zarlarındaki doymamış yağ asitleri olduğu için artan stresle birlikte ROT miktarı ve ona paralel olarak zarlardaki hasar oranı da artacaktır. Örneğin, salatalık yapraklarında yapılan bir çalışmada soğuk stresi MDA, O_2^- ve H_2O_2 seviyelerini artırdığı bulunmuştur (Li *et al.* 2011). Transgenik domates bitkilerinde yapılan bir çalışmada soğuk stresinde elektrolit sızıntısının daha yüksek olduğu bulunmuştur (Shu *et al.* 2011). Yine düşük sıcaklık mısır bitkisinde H_2O_2 ile O_2^- miktarını, lipid peroksidasyon seviyesini artırmıştır (Esim 2011). Soğuk stresi buğdayda MDA, H_2O_2 ve O^- seviyelerini artırdığı da rapor edilmiştir (Esim *et al.* 2012). Bizim bulgularımıza göre de tek başına soğuk uygulaması her iki varyetede H_2O_2 ve O^- ile MDA içeriklerinde önemli artışa neden olmuştur (Çizelge 4.8 ve 4.9). Ancak çalışmalarımızda, her iki buğday varyetesine (Altındane ve Bezostaya) soğuk stres öncesi uygulanan TTH (S+TTH), bu ROT bileşiklerinin seviyesini düşürmüş ve lipid peroksidasyonun göstergesi olan MDA seviyesi azaltmıştır. Ayrıca bu parametrelerin düşürülmesinde en etkili dozun %0.075 TTH olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8 ve 4.9). Literatürde herhangi bir protein hidrolizatının bitkilerde soğuk stresi cevabı üzerine ve özellikle ROT seviyeleri üzerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak bazı sinyal bileşiklerin bitkilere uygulandığında stres esnasında ROT seviyelerini düşürdüğü ve bunun bir sonucu olarak lipid peroksidasyonu seviyesinin iyileştirildiği gösterilmiştir. Örneğin, düşük sıcaklık stresi altındaki buğdayda yapılan bir çalışmada soğuk stresiyle seviyeleri artan ROT ve MDA seviyeleri, bitki sinyal bileşikleri nitrik oksit (NO) ve salisilik asit (SA) uygulamasıyla düşürülebildiği gösterilmiştir (Esim and Atıcı 2015). Araştırmacılar NO ve SA uygulamaların bu etkilerinin bir sonucu olarak bitkinin düşük sıcaklığa toleransına önemli bir katkı yaptığını ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da TTH uygulamasıyla benzer bir etkinin olması, çalışılan buğday çeşitlerinde TTH'nin buğdayın düşük sıcaklık toleransının artırılmasına önemli bir katkı yaptığı düşünülmektedir. Bu sonucu TTH'nin donma hasarı çalışmasından elde edilen bulgular da desteklemektedir. Çünkü çalışmamızda TTH uygulaması, soğuk stresine maruz her iki buğday varyetesinde hücrelerdeki elektrolit sızıntısını (Donma Hasarı) önemli oranda düşürmüştür (Çizelge 4.10 ve 11).

Bitkiler düşük sıcaklığa maruz kaldıklarında zarların akışkanlığı azalmakta ve zarlarda kırılmalar olduğundan dolayı membran geçirgenliği artabilmektedir. Düşük sıcaklığa hassas *Coffea arabica* bitkisinde soğuk uygulamasından sonra elektrolit geçirgenliğinin arttığı belirlenmiştir (Campos *et al.* 2003). Arpa çeşitlerinin (Plazek and Zur 2003) ve buğdayda (Atıcı and Nalbantoğlu 2003) düşük sıcaklıkta donma hasarının da arttığı belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda da literatürdeki çalışmalarla paralel olarak hem hassas hem de dirençli buğday varyetelerinde düşük sıcaklık uygulaması, kontrol bitkilerine kıyasla, yapraklarda donmanın daha erken derecelerde başlamasını sağlamış ve donma hasarının önemli derecede artmasına sebep olmuştur (Çizelge 4.10 ve 4.11). Diğer taraftan, soğuk uygulamasıyla kıyaslandığında, düşük sıcaklık öncesi uygulanan TTH, her iki varyetede donmanın başladığı dereceleri önemli derecede etkileyerek DH'nın düşmesini sağlamıştır. Soğuk stresi esnasında donma hasarının düşmesi, bitkinin düşük sıcaklığa toleransının en iyi göstergelerinden biri olarak değerlendirilmiştir (Griffith and McIntyre 1993; Atıcı and Nalbantoğlu 2003). Literatürde protein hidrolizatlarının bitkilerde donma hasarı üzerine etkisiyle ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızdan elde edilen veriler literatür için yenidir.

Bitkiler uygun olmayan koşullardan kaçamadıklarından stresli şartlar altında kendilerini koruyabilmek ve savunabilmek için güçlü savunma sistemlerine sahiptirler. Bu kapsamda enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere iki farklı antioksidan savunma mekanizması bulunur. Enzimatik antioksidan mekanizma süperoksit, hidroksil radikali, singlet oksijen, hidrojen peroksit gibi ROT'ları parçalayan enzimleri içerir. Bu enzimlerin başlıcaları süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerdir. Normal şartlar altında da aktive göstermelerine karşın, stres şartlarında artan ROT seviyelerine paralel olarak bu enzimlerin aktivitelerinde de önemli artışlar meydana gelmektedir. Eğer stres çok ağır ve bitkinin baş edebileceğinden fazla ise o zaman bu enzimlerin üretimi ve aktiviteleri de bozulur. Tek başına bir enzimin artması veya azalması çok anlam ifade etmeyeceği için, bir mekanizmayı değerlendirebilmek veya yorumlayabilmek için çok sayıda enzimin ve parametrenin bir arada değerlendirilmesi gerekmektedir (Gill and

Tuteja 2010; Sharma *et al.* 2012). Soğuk stresi bu antioksidan metabolizma üzerinde en etkili olan streslerden biridir. Örneğin, kışlık buğdayda soğuk uygulamasıyla CAT enzimi azalırken, POX enzimi arttığı bulunmuştur (Taşgın *et al.* 2006). Soğuk stresinin yine buğdayda antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığı bildirilmiştir (Esim *et al.* 2012). Başka bir çalışma da antioksidan savunma sistemini araştırmak için salatalık yapraklarında antioksidan enzimlerin stresle indüklenen değişimlerine değerlendirilmiş ve soğuk stresi SOD, APX, GR ve POX enzim aktiviteleri artarken, CAT aktivitesinde azalmaya neden olmuştur (Lee *et al.* 2000). İlave olarak, düşük sıcaklık stresinin çilek bitkisinde (Yong *et al.* 2008) CAT, POX, APX ve SOD enzimlerinin aktivitelerinin artırdığı bulunmuştur. Mandalina meyvelerinde yapılan bir çalışmada ise soğuğa dayanıklı çeşitlerde CAT, APX ve GR enzim aktivitelerinin soğuğa toleranslı çeşitlerde daha yüksek olduğu, SOD enzimi ise her iki çeşitte de arttığı gözlenmiştir (Sala 1998). Bizim çalışmamızda literatürdeki verilere benzer şekilde tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, SOD, POX, CAT, APX ve GR enzim aktivitelerinde artışa neden olmuştur. Soğuk stresi etkisiyle varyeteler arasında bu enzimlerin aktivitelerinin artışında önemli bir fark görülmemiştir. Buna ilave olarak tek başına TTH uygulamalarının üçü de genel olarak antioksidan enzim aktivitelerini artırmıştır (Çizelge 4.12-16). Bu bulgular enzimlerin elektroforetik izoenzim profillerinin belirlendiği bulgularlar da örtüşmektedir (Şekil 4.19-32). Diğer taraftan S+TTH uygulamalarında SOD aktivitesi, hassas varyetede düşürmüş, dirençli varyetede ise artırmıştır. POX aktivitesinde ise düşmüştür (Çizelge 4.12-13). CAT aktivitesi ise S+TTH uygulamalarında her iki varyetede genelde düşmüştür (Çizelge 4.14). Ancak, APX ve GR aktiviteleri her iki varyetede artırmış (Çizelge 4.15-16). Bu artışlarda en etkili dozun genelde %0.1 TTH olduğu belirlenmiştir. Enzimlerin aktivitelerine ait bu bulgular elektroforetik izoenzim profillerinin belirlendiği jeller üzerinde de görülebilmektedir (Şekil 4.28-32). Yukarıdaki bulgulara göre, soğuk stresi buğdayın her iki varyetesinde de çalışılan antiokasidan enzimlerin tümünün aktivitesini artırmıştır. Ancak aynı bitkilere soğuk stresi öncesi uygulanan TTH aktivitelerin davranışlarında farklılıklara neden olmuştur. Burada farklı tepki veren ilk enzim SOD'dur. SOD aktivitesinin soğuğa dirençli ve hassas varyeteler arasında farklı tepki vermesi, soğuğa toleransta önemli olabilir. Diğer taraftan POX ve CAT da soğuk stresinde TTH ile düşmüşlerdir. Bu sonuçların en önemli sebebi, bu üç enzimin ROT'ların temizlenmesinde oynadıkları ana

rolden kaynaklanabilir. Çünkü hatırlanırsa, soğuk uygulaması her iki varyetede ROT'ların ve LPO'nun seviyesini artırırken, soğuk stresinde TTH uygulamasıyla bu artışlar bastırılabilmiştir. Bu olayın bir sonucu olarak, bitkide CAT ve POX'un fazla artışına gerek kalmamış ve bitkide bu enzimlerin aktivitelerinin düşürülmüş olabilir. Literatürde TTH'ın veya protein hidrolizatlarının bitkilerde soğuk stresinde oynadığı rol ile ilgili herhangi bir çalışma olmadığından bu bulguların farklı bitkilerde de denenmesi elde edilen verileri daha güçlü kılacaktır. Literatürde tavuk tüyüyle ilgili çalışma bulunmasa da bitkilerde soğuk toleransının artırılmasında kullanılan bazı bileşiklerin antioksidan enzimler üzerine olan etkileri ile ilgili bilgiler bulunmaktadır. Örneğin, mısırdaki düşük sıcaklığın üzerine nitrik oksitinin araştırıldığı bir çalışmada, soğuk stresi öncesi uygulanan nitrik oksitin CAT aktivitesini düşürdüğü bulunmuştur (Esim 2011). Soğuğa hassas ve dirençli buğday çeşitlerinde; benzoik asit uygulamasıyla GR enzim aktivitesinin ise arttığı belirlenmiştir (Kanbur 2016). Soğuk stresine hassas ve dirençli arpada yapılan bir çalışmada; salisilik asit uygulaması ile POX enzim aktivitesinin soğuk uygulamasına göre her iki çeşitte arttığı gözlemlenmiştir (Esim *et al.* 2014).

Diğer yandan enzimatik olmayan antioksidanlar da ROT'ların detoksifikasyonunda doğrudan ve dolaylı olarak çok önemli roller oynamaktadır. Ayrıca bu antioksidan maddelerin hücre içi redoks durumunu düzenleme gibi çok önemli rolleri de vardır. Hücrelerdeki en önemli antioksidan maddelerin başında glutatyon, askorbik asit, prolin, fenolik maddeler ve karotenoidler gelmektedir. Bu maddelerden askorbat ve glutatyon kendi başlarına çok kuvvetli antioksidan olmalarının yansısı, hücrel redoksun devamında ve hidrojen peroksidin detoksifikasyonunu sağlayan askorbat-glutatyon çemberinde önemli rol oynarlar. Soğuk stresi ile ilgili yapılan birçok çalışmada askorbat-glutatyon çemberinin aktivitesi soğuk stresi ile arttığı bildirilmiştir. Askorbat glutatyon çemberinin en iyi göstergelerinden birisi AsA/DHA ile GSH/GSSG oranlarıdır. Bu oranlarda artış, ortamda ROT'ları temizleyecek indirgen Asa'nın ve indirgen GSH'in fazlalığını gösterir. Ancak, bu oranlardaki düşüş ROT'ları temizleyecek yeterli AsA ve GSH olmadığını ve bu bileşiklerin oksitlenmesi sonucu ortamda okside askorbat yani DHA ve okside glutatyon yani GSSG'nin birikimini

gösterir. Yapılan literatür çalışmalarında soğuk stresi koşullarında TTH uygulaması ile bitkilerde AsA, GSH miktarının değişimini gösteren herhangi bir veriye rastlanılmamıştır. Mevcut veriler literatüre yeni bilgiler kazandıracak ve bundan sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutacaktır. Çalışmalarımızda enzimatik olmayan antioksidanlardan elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, soğuk stresi AsA/DHA ve GSH/GSSG oranını her iki varyetede düşürmüştür. Yapılan bir çalışmada soğuğa dayanıklı buğday çeşitlerinde soğuk stresiyle birlikte GSH içeriğinin arttığı bulunmuştur ve böylece GSH'nin soğuğa toleransında artan bir madde olduğu sonucuna varılmıştır (Kocsy *et al.* 1999). Ancak bu bilgi bizim bulgumuzla tam örtüşmemektedir. Diğer taraftan, soğuk stresi öncesi uygulanan TTH, bu iki değerlerin oranını artırmıştır. Bu artış etkili dozun genelde %0.075 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.18 ve 20). Bu bulgulara göre soğuk stresi her iki varyetede enzimatik olmayan antioksidanların oranını düşürmüştür ve uygulanan TTH ise soğuk etkisiyle azalan bu antioksidanların miktarını artırarak, buğdayın antioksidan kapasitesinin artmasına önemli katkı yapmıştır. Ayrıca enzimatik antioksidanlardan olan APX ve GR aktivitelerinde belirlenen artışlar da bu durumu desteklemiştir. Çünkü bu iki non-enzimatik bileşiğin indirgen formları APX ve GR'nin aktif olarak katıldığı reaksiyonlarda (askorbat-glutasyon çemberi) üretilmektedir.

Enzimatik olmayan antioksidanlara ilave olarak bu çalışmada soğuk ve TTH'nin fenolik madde içeriği üzerine etkisi de değerlendirilmiştir. Benzer şekilde fenolik maddeler ile prolinin de antioksidan rollerinin yanı sıra, osmo-protaktan ve kryo-protaktan rolleri nedeniyle soğuk stresinde su kaybının azalması ve proteinlerin stabilizasyonunun sağlanmasında önemli rolleri vardır. Buğday bitkisinde yapılan bir çalışmada düşük sıcaklık stresinde fenolik madde içeriğinin arttığı bulunmuştur (Olenichenko *et al.* 2005). Bizim çalışmamızda da tek başına soğuk uygulaması, her iki varyetede, fenolik madde içeriğinde artışa neden olmuştur (Çizelge 4.21). Ancak, S+TTH uygulamaları, tek başına soğuk ile kıyaslandığında, fenolik madde içeriğini her iki varyetede düşürmüştür (Çizelge 4.21). Ayrıca, uygulamamızda genelde %0.05 TTH konsantrasyonu en etkili doz olmuştur. Bu sonuçlar, tek başına soğuk stresinin buğdayda fenolik madde içeriğini önemli oranda artırdığı göstermektedir. Fakat soğuk

stresi öncesi uygulanan TTH, buğday soğuga maruz kaldığında, fenolik madde içeriğini düşürmüştür. Bu çalışmada, bitki düşük sıcaklığa maruz kaldığında fotosentezin karbon fiksasyon reaksiyonlarının önemli derecede inhibe olduğu Rubisco aktivitesi ölçülerek gösterilmişti (Şekil 4.6 ve 4.7). Soğuk stresi gibi stresli şartlarda fotosentezin karbon reaksiyonları inhibe olur ancak fotosentezin ışık reaksiyonları için durum farklıdır. Fotosentetik ETS'de soğuk etkisi ile yavaşlamalar olsa bile soğukta ışığın şiddeti genelde değişmez. Bu da ışık toksitesine yani ışık zararına yol açar (Taiz and Zeiger 2005). Bitkiler genellikle fotosentezin ışık reaksiyonlarındaki bu toksisiteyi gidermek için fenolik maddeleri kullanırlar. Çünkü fenolik maddelerin bazıları bitki fotosentetik aygıtlarına gelen fazla UV ve diğer toksik seviyedeki ışıkları absorplar ve fotosistemi korurlar. Örneğin ışık şiddetinin yüksek, sıcaklığın düşük olduğu dağ gibi yüksek yerlerdeki bitkilerin fenolik madde içerikleri de normal koşullardakilerine göre çok yüksektir (Taiz and Zeiger 2005). Bu bilgiler fenolik bileşiklerin stres toleransında ROT'ları temizleyerek önemli roller üstlendiğini göstermektedir. Bizim bulgularımızda da görüldüğü gibi soğuk stresi buğdayda fenolik madde içeriğini artırmıştır. Ancak soğuk stresinden önce uygulanan TTH, buğdayda fenolik madde içeriğini düşürmüştür. İlk bakışta TTH'ın fenolik madde içeriğini düşürdüğü ve bunun da bitki toleransına olumsuz etki yaptığı değerlendirilebilir. Ancak durum öyle değildir. Bitki soğuga maruz kaldığında, artan ROT miktarına karşılık, fenolik maddeler gibi yüksek karbon içeriğinden oluşan bileşiklerin sentezi için büyük miktarda karbon (CO₂) ve enerji maliyeti ödenecektir. Ancak bitkiye uygulanan TTH hücrelerde antioksidan kapasiteyi artırdığı için bitki bu karbon ve enerji maliyetinin düşürülmesi için artan fenolik içeriği düşürecektir. Böylece stres altında büyüme ve gelişmeye daha fazla karbon ve enerji girdisi sağlanabilecektir.

5.1. Sonuç

Mevcut çalışmada elde edilen bulgular şu şekilde özetlenebilir;

- 1) Soğuk stresiyle her iki buğday varyetesinde büyüme parametreleri azalmıştır. Azalan büyüme parametrelerinin TTH uygulamasıyla iyileştirilmesi, TTH'ın zengin aminoasit içeriğine sahip olmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir.
- 2) Soğuk stresiyle azalan pigment içeriği, TTH uygulamasıyla iyileştirilebilmiştir. Ayrıca yine TTH uygulaması soğuk stresi esnasında özellikle protein, total şeker ve prolin miktarını artırarak buğdayın soğuk toleransının artırılmasına katkı yapmıştır.
- 3) Reaktif oksijen türlerinin soğuk stresi etkisiyle artması ve meydana gelen hücre zarlarındaki bozulmalar, TTH uygulamasıyla birlikte reaktif oksijen türlerinin miktarları azaltılarak hücre zarlarındaki bozulmaları önlemiş olduğu düşünülmektedir.
- 4) Soğuk etkisiyle bitkide fotosentezin karbon fiksasyon enzimi Rubisco sentezi önemli ölçüde düşmüştür. TTH uygulaması ise bitki için bu olumsuz durumu iyileştirebilmiştir. Bu TTH'ın içerdiği zengin aminoasit içeriğine bağlanmıştır.
- 5) Soğuk stresi altında her iki çeşitte enzimatik antioksidanların aktiviteleri artırmıştır. Bu artışlar enzimlerin izoenzim profilleri ile de desteklenmiştir. Soğuk bitkide enzimatik olmayan antioksidanların oranını genelde düşürürken fenolik madde içeriğini artırmıştır. Soğuk stresi öncesi bitkilere uygulanan TTH hem antioksidan enzimlerin aktivitelerini hem de enzimatik olmayan antioksidanların içsel seviyelerini bitki lehine olacak şekilde düzenlenmesini sağlamıştır. Bu durumda TTH'ın soğuk stresi sonucu oluşan oksidatif strese karşı tolerans sağlamada bir bütün olarak askorbat-glutasyon çemberini aktifleştirdiği de ileri sürülmüştür.

KAYNAKLAR

- Abdel Sabour, MF., Abo El-Seoud, MA. 1996. Effect of organic waste compost addition on sesame growth, yield and chemical composition, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 60,157-164.
- Agarwal, S. and Pandey, V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 48(4), 555-560.
- Aghaee, A., Moradi, F., Zare-Maivan, H., Zarinkamar, F., Irandoost, HP., Sharifi, P. 2011. Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress.
- Ahmed, M., Hassen, F., Qadeer, U., and Aslam ,MA.2008.Silicon application and drought tolerance mechanism of sorghum. *African Journal of Agricultural Research*, 6(3), 594-607.
- Aidooa, MK., Shermanb, Tal., Lazarovitcha, N., Faita, Aaron. and Rachmilevitcha, Shimon. 2017. A bell pepper cultivar tolerant to chilling enhanced nitrogen allocation and stress-related metabolite accumulation in the roots in response to low root-zone temperature. *Physiologia Plantarum*, doi:10.1111/ppl.12584
- Akkuş, İ. 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkiler, Mimoza Yayınları, Konya.
- Aktas, M., Altay, K., Dumanli, N., 2005. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of *Babesia ovis* infection in sheep and goats. *Vet. Parasitol*, 133, 277–281.
- Allen DJ, Ort DR. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends Plant Science*, 6(1),36-42.
- Andarwulan, N. and Shetty, K. 1999. Improvement of pea (*Pisum sativum*) seed vigour response by fish protein hydrolysates in combination with acetyl salicylic acid. *Process Biochemistry* 35, 159–165.
- Andrews JE. and Roberts DWA. 1961. Association Between Ascorbic Acid Concentration And Cold Hardening In Young Winter Wheat Seedlings. *Canadian Journal of Botany*, 39(3), 503-512.
- Aono, A., Hazama, M , Notoya, K., Taketomi, S., Yamasaki, H., Tsukuda, R., Sasaki, S., Fujisawa, Y.1995. Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 210 (3), 670-7.
- Apel, K. and Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology*, 55,373-99.
- Asada, K. 1999. The Water-Water Cycle In Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology*, 50,601-639.
- Atıcı, O. and Nalbantoğlu, B. 2003. Antifreeze proteins in higher plants *Phytochemistry*, 64, 1187–1196.
- Atıcı Ö., Demir Y., Kocaçalışkan İ., 2003. Effects of low temperature on winter wheat and cabbage leaves, *Biologia Plantarum*, 46, 603-606.
- Bailly, C., Benamar, A. and Corbineau, F. 1996. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in

- sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Plant Physiology*, 97, 104-110.
- Banci, L. 1997. Structural properties of peroxidases. *Journal of Biotechnology* 53,(2–3) , 253-263.
- Barrs, HD., And Weatherly, PE., 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* , 15,413–428.
- Bates, L., Waldren, RP., Teare, ID., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39, 205–207.
- Baxter, A., Mittler, R and Suzuki, N. 2013. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65 (5), 1229–1240.
- Bertamini, M., Muthuchelian, K., Rubinigg, M., Zorer, R., Velasco, R., and Nedunchezian, N. 2006. Low-night temperature increased the photoinhibition of photosynthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling) leaves. *Environmental Experimentation of Botany*, 57, 25-31.
- Beuchamp, C. and Fridovich, I., 1971. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochimica et Biophysica Acta*, 317, 50-64.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Kurt V. Fagerstedt 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of botany* 91-2.
- Campos, J., Huertas, F., Colado, JC., López AL., Pablos y, A., Pablos, C. 2003. Efectos De Un Programa De Ejercicio Físico Sobre El Bienestar Psicológico De Mujeres Mayores De 55 Años *Revista De Psicología Del Deporte* Vol. 12, núm. 1, pp. 7-26.
- Cavani, L., Ter Halle, A., Richard, C., and Ciavatta, C. 2006. Photosensitizing properties of protein hydrolysate-based fertilizers. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9160– 9167. doi: 10.1021/jf802362g
- Chaudière, J., and Ferrari, R. 1999. Iliou Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9), 949-962.
- Cheng, M., Chao, LI., Zhou, L., Xie, SC. 2015. Mo marine geochemistry and reconstruction of ancient ocean redox states *Science China* 58.
- Cheng, Y., and Song, C., 2006. Hydrogen peroxide homeostasis and signaling in plant cells. *Sci. China Series C Life Sci.* 49 (1), 1–11.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, JK. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science* 12, 444–451.
- Choi, WS., Yan, M., Nusinow, D., Gralla, JD. 2002. In vitro transcription and start site selection in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal Molecular Biology*, 319(5),1005-13.
- Colla, G., Roupael, Y., Canaguier, R., Svecova, E. and Cardarelli, M. 2015b. Biostimulant action of a plant derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis, *Plant Science*, doi: 10.3389/00448
- Colla, G., Roupael, Y., Di Mattia, E., El-Nakhel, C., Cardarelli, M., 2015a. Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *Journal Science Food Agriculture* 95, 1706–1715.
- Corpas, FJ., Hayashi, M., Mano, S., Nishimura, M., Barroso, JB. 2001. Peroxisomes Are Required for in Vivo Nitric Oxide Accumulation in the Cytosol following Salinity Stress of *Arabidopsis* Plants *Plant Physiology*, 151, 2083–2094.

- Costa, P., Neto, A., Bezerra, M. 2005. Antioxidant enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. *Braz. Journal of Plant Physiology* 17(4), 353-362.
- Creissen, G., Broadbent, P., Stevens, R., Wellburn, AR. and Mullineaux ,P. 1996. Manipulation of glutathione metabolism in transgenic plants. *Biochemical Society Transactions*, 24, 465-469.
- Davey, W. 2000. Katrien Kenis, and Johan Keulemans Genetic Control of Fruit Vitamin C Contents. *Plant Physiology*, 142(1), 343–351.
- Dehon, L., Macheix, JJ., and Durand, M. 2002. Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*. *Journal Experimental of Botany*, 53, 303–311.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K., Hailiu, R., 2002. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3010–3014.
- Dische Z., 1962. Color reactions of carbohydrates. *Methods in carbohydrate chemistry*, 1,475-514.
- Dixon, M. 2010. Confining and defining proprietary estoppel: the role of unconscionability. *Legal Studies*, 30(3), 408–420.
- Dogra, R. and A. Kaur, 1994. Effect of steroids on some growth and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. during germination. *Field Crops Research*, 8: 611-620.
- Durmuş, N., 2003. Büyümeyi düzenleyici maddelerin oksidatif stres üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Elstner, EF. and Heupel, A. 1976. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Analytical Biochemistry*, 70, 616-620..
- Ertani, A., Pizzeghello, D., Francioso, O., Sambo, P., Sanchez-Cortes, S., and Nardi, S. 2014. *Capsicum chinensis* L. growth and nutraceutical properties are enhanced by biostimulants in a long-term period: chemical and metabolomic approaches. *Frontiers in Plant Science*, 5:375.
- Esim N, Atici O (2015). Effects of Exogenous Nitric Oxide and Salicylic Acid on Chilling-Induced Oxidative Stress in Wheat (*Triticum aestivum*). *Frontiers in Life Science*. 8(2)-124-130.
- Esim, N., 2011. Nitrik Oksitin Mısırdada (*Zea Mays*) Düşük Sıcaklık Stresi Toleransı Üzerine Etkisi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Esim, N., Atici, Ö. and Mutlu S. 2014. Effects of exogenous nitric oxide in wheat seedlings under chilling stress. *Toxicology and Industrial Health* 30(3) 268–274.
- Esim, N., Tiryaki, D., Karadagoglu, O., Atici O. 2012. Toxic effects of boron on growth and antioxidant system parameters of maize (*Zea mays* L.) roots. *Toxicol Ind Health* DOI 10.1177/0748233712442729.
- Eyidogan, F., Oktem, HA., Yiicel, M. 2003. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. *Acta Physiologicae Plantarum* 25 (3), 263-269.
- Ezeh, AC., Boongaarts, J., Mberu, B. 2012. Global population trends and policy options. *The Lancet*, 380, 142-148.
- Fakhfakh, N., Ktari, N., Haddar, A., Mnif, IH., Dahmen, I., Nasri, M. 2011. Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic

- bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. *Process Biochemistry* 46, 1731–1737.
- Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J. 1995. The RNA component of human telomerase. *Science*. 269(5228),1236-41.
- Foyer, C.H., Trebst, A. and Noctor, G. 2005. Signaling and integration of defense functions of tocopherol, ascorbate, and glutathione. In *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment* (eds B. Demmig-Adams & W. W. Adams), pp. 00–00. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, in press.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. 2003. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Plant Physiology* 119, 355–364
- Foyer, C.H. and Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133,21-25.
- Foyer, C.H. and Noctor G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context *Plant, Cell and Environment*, 28, 1056–1071.
- Frova, C. 2006. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives, *Biomolecular Engineering*, 2006 Sep;23(4), 149-69
- Gechev, T., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inzé, D., Dukiandjiev, S., Toneva, V., and Minkov, I. 2003. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular Molecul Life Science*, 59, 708–714.
- Gechev, T., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inze', D., Dukiandjiev, S., Toneva, V., Minkov, I. 2002. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 708–714.
- Gill, S.S., and Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology Biochemistry*, 48(12), 909-30.
- Gong, Y., Toivonen, P.M.A., Lau, O.L., Wiersma, P.A., 2001. Antioxidant system level in 'Braeburn' apple in related to its browning disorder. *Botanical bulletin of Academia Sinica*, (42), 259-264.
- Gorbani, A., Zarinkamar, F., Fallah, A. 2011. The effect of cold stress on the morphologic and physiologic characters of two rice varieties in seedling stage. *Journal of Cell and Tissue* 2, 235-244
- Gousterova, A., Nustorova, M., Paskaleva, D., Naydenov, M., Neshev, G., Vasileva-Tonkova, E. 2012. Assessment of Feather Hydrolysate from Thermophilic Actinomycetes for Soil Amendment and Biological control Application. *International Journal of Environmental Research*, 6(2):467-474.
- Griffith, M. and McIntyre, HCH. 1993. The interrelationship of growth and frost tolerance in winter rye. *Plant Physiology*, 187, 335–344
- Griffith, M., Ala, P., Yang, D.S.C., Hon, W.C. ve Moffatt, B.A., (1992). Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves, *Plant Physiology*, 100; 593–596.
- Gurav, R.G. and Jadhav, J.P. 2013. A novel source of biofertilizer from feather biomass

- for banana cultivation. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 4532–4539.
- Güler, NS., 2008. *Ctenanthe Setosa*'da Yaprak Kıvrılması Sırasında Apoplastik Ve Simplastik Alanlarda Antioksidan Sistemde Meydana Gelen Değişimler. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Hagar, J., Howlinb, S., Ganio, L. 1996. Short-term response of songbirds to experimental thinning of young Douglas-fir forests in the Oregon Cascades. *Forest Ecology and Management*, 199, 333–347.
- Halliwell, B. 2006. Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiology*, 141, 312–322.
- Halliwell, B., and Gutteridge J M .1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219(1),1–14.
- Halliwell, B., and Gutteridge., JMC. 1999. *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press.
- Hannah, M., Heyer, AG., and Hinch, DK. (2005). A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 1:e26. doi: 10.1371/journal.pgen.0010026
- Hare, PD. And Cress ,WA. 1997. Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21, 79–102
- Heath, RL. and Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125(1), 189-198.
- Heidarvand, L., Maali-Amiri Reza. 2013. Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *Journal of Plant Physiology* 170, 459–469
- Higashi, T., Kawamata, F., Sakamoto, T., 1974. Studies on Rat Liver Catalase. VII. Double-Labeling of Catalase by ¹⁴C-Leucine and ³H-d- Aminolevulinic Acid. *Journal Biochemistry*, 76, 703-708,
- Hodges, D.M., Andrews, C.J., Johnson, D.A., Hamilton, R.I., 1996. Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Plant Physiology*, 98, 685-692.
- Hogewoning, S., Trouwborst, G., Maljaars, H., Wim, HP. and Harbinson J. 2010. Blue light dose-responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of *Cucumis sativus* grown under different combinations of red and blue light. *Journal of Experimental Botany*, 61(11), 3107–3117.
- Hong, CY., Hsu, YT., Tsai, YC., Kao, CH. 2007. Expression of ascorbate peroxidase 8 in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany* , 58, 3273-3283.
- Horii, A., McCue, P., Shetty, K. 2012. Seed vigour studies in corn, soybean and tomato in response to fish protein hydrolysates and consequences on phenolic-linked responses. *Bioresource Technology* 98, 2170–2177.
- Horii, T., Hase, H., Ueki, I., and Masumoto, Y. 2006. Oceanic precondition and evolution of the Indian Ocean dipole *Geophysical Research Letters*, 35, L03607.
- Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q., Xiong, L. 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 35, 12987– 12992.

- Jaleel, CA., Sankar, B., Murali, PV. Gomathinayagam, M., Lakshmanan, GMA. and Panneerselvam, R. 2007. Water deficit stress effects on reactive oxygen metabolism in *Catharanthus roseus*; impacts on ajmalicine accumulation. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 62: 105–111
- Jaleel, CA., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H J., Somasundaram, R., and Panneerselvam R. 2008. Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition *International Journal Of Agriculture and Biology*, 11(1),100–105.
- Janda, S., Trocchia, PJ., and Gwinner, KP. 2002. Customer perceptions of internet retail service quality. *International Journal of Service Industry Management*, 13 (5), 412-31.
- Janda, T., Szalai, G. Tari, I., Paldi. E. 1999 Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208, 175±180
- Janda, T., Szalai, G., Rios-Gonzales, K., Veisa, O., Paldi, E., 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science* 164, 301–306.
- Javadian, N., Karimzadeh. G., Mahfoozi, S., Ghanati. F., 2010. Cold-induced changes of enzymes, Proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57(4),540-547.
- Joshia, N., Hamdanb, AM., Fakhouric, WD. 2014. Skeletal Malocclusion: A Developmental Disorder With a Life-Long Morbidity *Journal of Clinical Medicine Research*, 6(6),399-408.
- Kanbur, H. 2016. Benzoik Asidinin Soğuk Stresine Maruz Bırakılan Farklı Buğdaylar (*Triticum Aestivum* L.) Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Trabzon.
- Kaur, G and Asthir, B. 2017. Molecular responses to drought stress in plants. *Biologia Plantarum*, 61(2), 201-209.
- Kim, J., Bortz, E., Zhong, H., Leeuw, T., Leberer, E., Vershon, AK., and Hirsch, JP. 2000. Localization and Signaling of Gb Subunit Ste4p Are Controlled by a-factor Receptor and the a-Specific Protein Asg7p *Molecular And Cellular Biology* (20)23, 8826–8835.
- Kocsy, G, von Ballmoos, P., Ruegsegger, A., Szalai, G., Galiba, G., Brunold, C. 2001. Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling-induced injury. *Plant Physiology* 127, 1147–1156.
- Kocsy, G., Ballmoos, P., Ruegsegger, A., Szalai, G., Galiba, G., Brunold C. 1999. Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling-induced injury. *Plant Physiology* 127, 1147–1156.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., Scharf, KD., 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 310–316.
- Kuk, Y. I., J. S. Shin, N. R. Burgos, T. E. Hwang, O. Han, B. H. Cho, et al. 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Science*, 43,2109– 2117.
- Kumar, S., Dhankhar, S., Arya, VP., Yadav, S., and Yadav, JP. 2011. Antimicrobial

- activity of *Salvadora oleoides* Decne. against some microorganisms *Journal of Medicinal Plants Research* , 6(14), 2754-2760.
- Kumar, T., Uzma., Khan, MR., Abbas, Z., Muhammad., G. 2014. Genetic Improvement of Sugarcane for Drought and Salinity Stress Tolerance Using *Arabidopsis* Vacuolar Pyrophosphatase (AVP1) Gene. *Molecular Biotechnology*, 56,199–209.
- Kunicki, TJ., Williams, SA., Nugent, DJ. and Yeager, M. 2010. Mean platelet volume and integrin alleles correlate with levels of integrins (IIb) (3) and (2) (1) in acute coronary syndrome patients and normal subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32,147–152.
- Kurbanoglu, EB. 2004. Enhancement of citric acid production with ram horn hydrolysate by *Aspergillus niger*. *Bioresearch Technology*, 92. 97-101.
- Kurbanoglu, EB., Algur, ÖF., Zulkadir, A. 2004. Submerged production of edible mushroom *Agaricus bisporus* mycelium in ram horn hydrolysate. *Industrial Crops and Products* Volume 19, Issue 3, May 2004, Pages 225-230.
- Kuru, Hİ., 2007. Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Kuzu, İ., 2015. İki Farklı Biryofit Türünün Fotosentetik Pigment İçeriği Ve Antioksidan Mekanizması Üzerine Ağır Metallerin (Bakır Ve Kurşun) Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Laemmli, UK., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Heat of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lee, SD., Kang, SO. and Hah, YC. 2000. *Hongia* gen. nov., a new genus of the order Actinomycetales. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 191–199
- Lee, YB., and Lee, SM. 2000. Effect of S-Adenosylmethionine on Hepatic Injury from Sequential Cold and Warm Ischemia. *Pharmacological Research*, 23, 495-500.
- Li, C., Jiang, D., Wollenweber, B., Li, Y., Dai, T., Cao, W., 2011. Waterlogging pretreatment during vegetative growth improves tolerance to waterlogging after anthesis in wheat. *Plant Science*, 180, 672e678.
- Li, Y., Zhang, W., Zheng, D., Zhou, Z., Yu, W., Zhang, L., Feng, L., Liang, X., Guan, W., Zhou, J., Chen, J. and Lin, Z., 2014. Genomic Evolution of *Saccharomyces cerevisiae* under Chinese Rice Wine Fermentation. *Genome Biology Evolution*, 6(9), 2516–2526.
- Lisiecka, J., Knaflewski, M., Spizewski, T., Fraszczak, B., Kaluzewicz, A., and Krzesinski, W. 2011. The effect of animal protein hydrolysate on quantity and quality of strawberry daughter plants cv. 'Elsanta'. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 10, 31–40.
- Liu, AR., Chen, SC., Lin, XM., Wu, SY., Xu, T., Cai, FM., Raesh, J. 2010. Endophytic *Pestalotiopsis* species spp. associated with plants of *Palmae*, *Rhizophoraceae*, *Planchonellae* and *Podocarpaceae* in Hainan, China. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 2661-2669
- Liu, E.H., 1973. A Simple Method for Determining the Relative Activities of Individual Peroxidase Isoenzymes in A Tissue Extract, *Analytical Biochemistry*, (56), 149-154.
- Low, PA., Caskey, PE., Tuck, R., Fealey, DRD. and Dyck, PJ. Quantitative Sudomotor Axon Reflex Test in Normal and Neuropathic Subjects *Ann Neurol* 14:573-580, 1983.

- Lukatkin, AS., Brazaitytė, A., Bobinas, Č., Duchovskis, P., 2001. Chilling injury in chilling-sensitive plants: a review *Žemdirbystė=Agriculture* 99(2), 111–124.
- Lynn, DG. and Chang, M. (1990) Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41, 497–526
- Mahajan, S. and Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry Biophysics* 15,444(2),139-58.
- Davey, MW., Montagu, MV., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, NB, IJJ., Strain, JJ., Favell, D. and John Fletcher. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 825-860.
- Memarpoor-Yazdi, M., Mahaki, H., Zare-Zardini, Hadi. 2013. Antioxidant activity of protein hydrolysates and purified peptides from *Zizyphus jujuba* fruits. *Journal Of Functional Foods*, 5, 62–70.
- Milazzo, M., Badalamenti, F., Ceccherelli, G. 1999. Renato Chemello Boat anchoring on *Posidonia oceanica* beds in a marine protected area (Italy, western Mediterranean): effect of anchor types in different anchoring stages *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 299 (2004) 51 – 62.
- Minibaeva, FV., and Gordon, LK., 2003. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russ. Journal Plant Physiology*, 50, 411–416.
- Mukesh Kumar, DJ., Priya, P., Nithya Balasundari, S., Nandhini Devi, GSD., Immaculate Nancy Rebecca, A. and Kalaichelvan, PT. 2012. Production and Optimization of Feather Protein Hydrolysate from *Bacillus* Sp. MPTK6 and Its Antioxidant Potential. *Middle-East Journal of Scientific Research* 11 (7), 900-907.
- Nakano, Y. and Asada, Y., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, *Plant Cell Physiol.*, (22), 867-880.
- Nandhitha, GK., Sivakumar, R., Vishnuveni, M. 2016. Impact Of Seed Treatment With Plant Growth Regulators And Nutrients On Alleviation Of Salinity Stress In Tomato Under In Vitro Conditions. *Applied Biological Research*, 18(2), 203-207.
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshida, Y., K. Wada, Tsukaya, H., Kakaubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 1999. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 18, 185-193.
- Nejadsadeghi, L., Amiri, AR., Zeinali, H., Ramezanzpour, S., Sadeghzade, B. 2014. Comparative Analysis of Physio-Biochemical Responses to Cold Stress in Tetraploid and Hexaploid Wheat Cell *Biochemistry Biophysics* 70 (1), 399-408. 9.
- Neumann, G., and Römheld, V. 2007. The release of root exudates as affected by the plant physiological status,” in *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, 2nd Edn., eds R. Pinton, Z. Varanini, and P. Nannipieri Boca Raton, FL: CRC Press, 23–72
- Nishiyama, H., Danno, S., Kaneko, Y., Itoh, K., Yokoi, H., Fukumoto, M., Okuno, H., Millán, JL., Matsuda, T., Yoshida, O., Fujita, J. 1998. Decreased expression of

- cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) in male germ cells at elevated temperature. *American Journal of Pathology* 152(1), 289–296.
- Olenichenko, NA. and Zagoskina, NV., 2005. Response of winter wheat to cold: Production of phenolic compounds and L-phenylalanine ammonia lyase activity. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(6), 600-603.
- Onifade, AA., Al-Sane, NA., Al-Musallam, AA. And Al-Zarban, S. 1998. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology*, 66, 1–11.
- Pasupuleti and Steven Braun. 2010. State of the Art Manufacturing of Protein Hydrolysates Protein Hydrolysates in Biotechnology, DOI 10.1007/978-1-4020-6674-0_2.
- Pearce, RB. 1999. Forest products biotechnology *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74,(5), 473–474.
- Plazek, A., Zur, I. 2003. Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability, *Plant Science* 164, 1019/1028
- Popko, M., Wilk R., Górecka, H., Chojnacka, K., Górecki H. 2015. Assessment of New NKSMg Fertilizer Based on Protein Hydrolysate of Keratin in Pot Experiments. *Polish Journal of Environmental Studies* 24(4), 1765-1772.
- Posmyk, M. M., Bałabusta, M., Wieczorek, M., Sliwinska, E., and Janas, K. M. 2009. Melatonin applied to cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds improves germination during chilling stress. *Journal of Pineal Research* 46, 214–223.
- Ranieri, A., Castagna, A., Scebba, F., Careri, M., Zagnoni, I., Predieri, G., Pagliari M., and Toppi, LS. 2005. Oxidative stress and phytochelatin characterization in bread wheat exposed to cadmium excess, *Plant Physiology Biochemistry* 43, 45-54.
- Robertson, MM. 2004. The neoliberalization of ecosystem services: wetland mitigation banking and problems in environmental governance *Geoforum*, 35(3), 361-373.
- Rout, MP., Aitchison, JD., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., Chait, BT. 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *Journal Cell Biology*, 148(4),635-51.
- Sairam, RK., and Srivastava, GC., 2000. Induction of Oxidative Stress and Antioxidant Activity by Hydrogen Peroxide Treatment in Tolerant and Susceptible Wheat Genotypes. *Biologia Plantarum*, 43(3), 381–386.
- Sala. JM. 1998. Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarin fruits. *Postharvest Biology and Technology* 13, 255–261.
- Saltveit, ME. and Morris, LL. 1990. Overview of chilling injury of horticultural crops. In: Chien Yi Wang (Ed.), *Chilling Injury of Horticultural Crops*. CRC Press, Boca Ratom, FL, pp. 3–15
- Scandalios, JG. 1994. Regulation and properties of plant catalases. In *causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense System in Plants* , Boca Raton. CRC Press.
- Scebba, F., Sebastiani, L., Vitagliano, C. 1998. Antioxidative enzyme activity changes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation, *Physiologia Plantarum* 104, 747-752.

- Schiavon, M., Ertani, A., Nardi, S. 2008. Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L. *Journal Agric Food Chemistry* 24;56(24):11800-8.
- Senthilkumar, M., Ganesh, S., Srinivas, K., Panneerselvam, P., Kasinath, BL. 2016. Combining fertigation and consortium of bio-fertilizers for enhancing growth and yield of banana cv. Robusta (AAA), *Indian Journal of Horticulture*, 73(1), 36-41.
- Shahryar, N. and Maali-Amiri, R. 2016. Metabolic acclimation of tetraploid and hexaploid wheats by cold stress-induced carbohydrate accumulation. *Journal Plant Physiology*, 1,204, 44-53.
- Shao, HB., Chen, XY., Chu, LY., Zhao, XN., Wu, G., Yuan, YB., Zhao, CX., Hu, ZM. 2006. Investigation on the relationship of Proline with wheat anti-drought under soil water deficits. *Colloids Surf B* 53 (2),113-119.
- Sharma, P., Jha, AB., Dubey, RS. and Pessarakli, M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions *Journal of Botany* ID 217037, 26 pages.
- Shinozaki, K., Rabbani, MA., Maruyama, K., Abe, H., Khan, MA., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA get-blot analyses. *Plant Physiology*, 133(4), 1755-1767.
- Shu, X., Ram, Deerinck, TJ., Qi1, Yingchuan., Ramko, EB. Davidson, MW., Jin, Yishi MH., Ellisman, RY., Tsien, A. 2011. Genetically Encoded Tag for Correlated Light and Electron Microscopy of Intact Cells, Tissues, and Organisms. *PLoS Biology* 9 | Issue 4
- Slesak, RA., Schoenholtz, SH., Harrington, TB. 2011. Soil carbon and nutrient pools in Douglas-fir plantations 5 years after manipulating biomass and competing vegetation in the Pacific Northwest *Forest Ecology and Management* 262, 1722–1728. .
- Stahl, W., and Sies, H. 2002. Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiology*, 15(5), 291-6.
- Streb, P., Michael-Knauf, A., Feierabend, J., 1993. Preferential Photoinactivation of Catalase and Photoinhibition of Photosystem II are Common Early Symptoms under Various Osmotic and Chemical Stress Conditions. *Plant Physiology* 88, 590-598.
- Sun, XC., Hu, CX., Tan, QL. 2006. Effects of molybdenum on antioxidative defense system and membrane lipid peroxidation in winter wheat under low temperature stress. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao*. 32,175–182.
- Taiz and Zeiger., 2005, *Plant Physiology.*, Palme yayınevi, Ankara.
- Tambussi, EA., Bartoli, CG., Guiamet, JJ., Beltrano, J., Araus, JL. 2004. Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves. *Plant Science* 167, 19-26
- Tasgın, E., Atıcı, Ö., Nalbantoglu, B., 2006. Losanka Petrova Popova. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry* 67, 710–715

- Tasgin E, Atici O, Nalbantoghu B (2003). Effect of salicylic acid and cold on freezing tolerance in wheat leaves. *Plant Growth Regulation*, 41, 231-236.
- Taskin, M., Ozkan, B., Atıcı, O., Aydoğan, MN. 2012b. Utilization of chicken feather hydrolysate as a novel fermentation substrate for production of exopolysaccharide and mycelial biomass from edible mushroom *Morchella esculenta*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(5), 597–602.
- Taskin, M. 2012c. A new strategy for improved glutathione production from *Saccharomyces cerevisiae*: use of cysteine- and glycine-rich chicken feather protein hydrolysate as a new cheap substrate *Journal of the Science of Food Agriculture*, 93, 535–541.
- Taskin, M. and Kurbanoglu EB. 2011. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. *Journal of Applied Microbiology* 111(4),826-834.
- Taskin, M., and Kurbanoglu, EB. 2011. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. *Journal Applied Microbiology*, 111(4),826-34.
- Taskin, M., Esim, N., Ortucu, S. 2012a. Efficient production of l-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61. *Food and Bioproducts Processing* 90, 773–779.
- Thomas, NJT. 1999. Are Theories of Imagery Theories of Imagination? An Active Perception Approach to Conscious Mental Content. *Cognitive Science Society* 23 (2), 207–245.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science*, 76(9), 4350-4354.
- Türküsay, H., Tosun, N., ve Saygılı, H., 2005. Hidrojen Peroksit Uygulamalarında Domates Bakteriyel Solgunluk ve Kanser Hastalığı (*Clavibacter michiganensis* ssp.michiganensis (Smith) Davis et al)’na Etkileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, Cilt:42, No:2. 1018-8851, 45-56s.
- Vasileva-Tonkova, E., Nustorova, M., Gushterova, A. 2007. New protein hydrolysates from collagen wastes used as peptone for bacterial growth. *Curr Microbiology* 54:54–57
- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151, 59–66.
- Venema, J., Harmjan, Rv., Faber Aw., Walther Jvj And Hendrik A. Raué 2000. Yeast Rrp9p is an evolutionarily conserved U3 snoRNP protein essential for early pre-rRNA processing cleavages and requires box C for its association *Get Access*, 6 (11), 1660-1671.
- Vernieri P, Lenzi A, Figaro M, Tognoni F, Pardossi A. 2001. How roots contribute to the ability of *Phaseolus vulgaris* L. to cope with chilling-induced water stress. *Journal of Experimental Botany* 52, 2199–2206.
- Visconti, F., Miguel de Paza, J., Bonetb, L., Jordàb, M., Quinonesc, A., Intriglioloa, DS.2015. Effects of a commercial calcium protein hydrolysate on the salttolerance of *Diospyros kaki* L. cv. “Rojo Brillante” graftedon *Diospyros lotus* L. *Scientia Horticulturae* 185, 129–138.

- Azevedo, WSL., Júnior, JAS., Eduardo de Araújo, A., Perez-Marin, AM., Sousa Medeiros, S. 2015. Organic fertiliser and the use of mulch in cowpea production under semiarid conditions. *Revista Ciência Agronômica*, 46(4), 689-696.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, MR., 2007. Heat tolerance in plants: An overview *Environmental and Experimental Botany*, 61, 199–223.
- Whetten, RW., MacKay, JJ., and Sederoff, RR. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 49, 585–609.
- Wise RR. 1995. Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynthesis Research* 45, 79–97.
- Witham, FH., Blaydes, BF., Devlin, RM. 1971. *Experiments in plant physiology*, Van Nostrand Reinhold, New York, USA, 167-200.
- Woodbury, W., Spencer, AK. and Stahmann, MA. (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzymes. *Analytical Biochemistry* 44, 301-305.
- Wu, G., Fang, YZ., Yang, S., Lupton, JR., Turner, ND. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004 Mar; 134(3), 489-92.
- Wu, T., Hsu, Y., Lee, T., 2009. Effects of cadmium on the regulation of antioxidant enzyme activity, gene expression, and antioxidant defenses in the marine macroalga *Ulva fasciata*. *Botanical Studies*, 50, 25-34.
- Xiangyang, L., Guangxi, R., Yan, S., 2011. The effect of organic manure and chemical fertilizer on growth and development of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Energy Procedia* 5 (2011) 1200–1204
- Yadeghari, LZ., Heidari, R. and Carapetian, J. 2008. The influence of cold acclimation on proline, malondialdehyde (MAD), total protein and pigments contents in soybean (*Glycine max*) seedlings, *Research Journal of Biology Science*, 3(1), 74-79.
- Yannarelli, GG., Fernández-Alvarez, AJ., Santa-Cruz, DM., Tomaro, ML. 2007. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry*, 68:, 505–512.
- Yee, Y., Tam, NFY., Wong, YS., Lu, CY., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguira gymnorrhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environmental and Experimental Botany*, 1-13.
- Yılmaz, C. 2017 . Ağır Metallerin *Pinus brutia* Ten. İğne Yapraklarında, Glutatyon S-Transferaz Enzimleri Üzerindeki Tekil ve Bazı Bütünleşik İnhibisyonları. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi
- Yong, Z., Hao-Ru T. and Ya L. 2008. Variation in Antioxidant Enzyme Activities of Two Strawberry Cultivars with Short-term Low Temperature Stress. *World Journal of Agricultural Sciences* 4 (4): 458-462.
- Yordanova, R.Y., Christov, K.N., Popova L.P., 2004. Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, 51, 93-101
- Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nowak, D., Nagata, Y., Yamamoto, R., Sato, Y., Sato-Otsubo, A., Kon, A., Nagasaki, M., Chalkidis, G., Suzuki, Y., Shiosaka, M., Kawahata, R., Yamaguchi, T., Otsu, M., Obara, N., Sakata-Yanagimoto, M., Ishiyama, K., Mori, H., Nolte, F., Hofmann, WK., Miyawaki, S., Sugano, S.,

- Haferlach, C., Koefler, HP., Shih, LY., Haferlach, T., Chiba, S., Nakauchi, H., Miyano, S., Ogawa, S. 2011. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, 478(7367), 64-9.
- Zinn, KE., Tunc-Ozdemir, M., Harper JF., 2010. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links, *Journal of Experimental Botany*, 61(7), 1959–1968.



ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2009 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2013 yılında mezun oldu. 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı ve halen öğrenimine devam etmektedir.

