



**SOĞUK STRESİNE MARUZ KALMIŞ SARIÇAM TOHUMLARINDA
SALİSİLİK ASİTİN ĐİMLENME ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nilgün ARSLAN

**Yüksek Lisans Tezi
Orman Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet DEMİRALAY**

2019

Artvin

**T.C.
ARTVİN ÇORUH ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ORMAN MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**SOĞUK STRESİNE MARUZ KALMIŞ SARIÇAM TOHUMLARINDA SALİSİLİK
ASİTİN ÇİMLENME ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nilgün ARSLAN

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet DEMİRALAY**

Artvin-2019

TEZ BEYANNAMESİ

Artvin oruh Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum ‘‘Soğuk Stresine Maruz Kalmış Sarıçam Tohumlarında Salisilik Asitin imlenme zerine Etkilerinin Araştırılması’’ başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Demiralay’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırıldığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 27/09/2019

Nilgün ARSLAN

İmza

T.C.
ARTVİN ÇORUH ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ORMAN MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**SOĞUK STRESİNE MARUZ KALMIŞ SARIÇAM TOHUMLARINDA
SALİSİLİK ASİTİN ÇİMLENME ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nilgün ARSLAN

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 27/09/2019

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 25/10/2019

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet DEMİRALAY

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Melahat ÖZCAN

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Fuat YETİŞSİN

ONAY:

Bu Yüksek Lisans Tezi, Artvin Çoruh Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından .../.../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../..... tarih vesayılı kararıyla kabul edilmiştir.

.../.../.....

Doç. Dr. Hilal TURGUT
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Soğuk Stresine Maruz Kalmış Sarıçam Tohumlarında Salisilik Asitin Çimlenme Üzerine Etkilerinin Araştırılması” konusunda yapılan bu çalışma; Artvin Çoruh Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Orman Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu araştırma için beni yönlendiren, literatür araştırmalarımnda yardımcı, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet DEMİRALAY’a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımnda ve tezimin yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocalarım Öğr. Gör. Kamil ÖZTÜRK, Arş. Gör. Burak KILIÇ ve Arş. Gör. Mustafa ACAR’a teşekkür ederim.

Son olarak tez çalışmalarım boyunca maddi ve manevi her türlü desteğini sunan değerli eşim Aykan ARSLAN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmanın bilimsel ve teknik açıdan uygulayıcılara faydalı olmasını dilerim.

Nilgün ARSLAN
Artvin 2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEZ BEYANNAMESİ	I
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	IV
SUMMARY	V
TABLolar DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Bitkiler ve Stres.....	2
1.2.1. Bitkilerin Strese Karşı Geliştirdikleri Yanıt Mekanizmaları	4
1.2.2. Soğuk Stresi	5
1.2.2.1. Soğuk Stresinin Bitkiler Üzerindeki Etkileri	7
1.2.2.2. Soğuk Stresinin Hücresel Düzeyde Etkileri.....	8
1.3. Sarıçam (<i>Pinus sylvestris</i> L.)	10
1.4. Salisilik Asit.....	13
1.4.1. Salisilik Asit Biyosentezi	14
1.4.2. Bitkilerde Salisilik Asit Biyosentezinin Metabolik Yolu	15
2. MATERYAL VE YÖNTEM	18
2.1. Bitki Materyalinin Hazırlanması ve Deney Tasarımı	18
2.2. Çimlenme ile İlgili Parametreler.....	19
2.3. Lipid Peroksidasyonu Tayini (MDA)	20
2.4. Pigment Tayini.....	20
2.5. Kök Boyu Uzunlukları	21
2.6. Prolin.....	21
2.7. Çimlenen Tohumlarda Toplam Protein Miktarı Tayini	21
2.8. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	22
2.9. İçsel H ₂ O ₂ Tayini	22
2.10. Guaikol Peroksidaz	22

2.11.	İstatistik Analizler.....	23
3.	BULGULAR.....	24
3.1.	Çimlenme Oranı.....	24
3.2.	Kök Boyu Uzunlukları.....	24
3.3.	Nisbi Su İçeriği.....	25
3.4.	Toplam Klorofil İçeriği.....	26
3.5.	Toplam Karotenoid İçeriği.....	26
3.6.	Lipid Peroksidasyonu (MDA).....	27
3.7.	İçsel H ₂ O ₂ Tayini.....	28
3.8.	Prolin İçeriği.....	28
3.9.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi.....	29
3.10.	Guaikol Peroksidaz (GPX).....	30
4.	TARTIŞMA.....	31
5.	SONUÇ.....	37
6.	ÖNERİLER.....	38
	KAYNAKLAR.....	38
	ÖZGEÇMİŞ.....	47

ÖZET

SOĞUK STRESİNE MARUZ KALMIŞ SARIÇAM TOHUMLARINDA SALİSİLİK ASİTİN ÇİMLENME ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Salisilik asit bitkiler tarafından sentezlenen hormon benzeri yapıda olan ve hem biyotik hem de abiyotik stres etkenlerine karşı tolerans yanıtı oluşturan ve sinyal bileşiği olarak görev yapan organik bir molekül olarak tanımlanır. Yaptığımız çalışmada farklı konsantrasyonlarda (1, 25, 50, 100, 500, 1000, 5000 μM) uygulanan salisilik asitin, soğuk stresine karşı verdikleri çimlenme yanıtları araştırılmıştır. Sarıçam tohumları belirli konsantrasyonlarda (1, 25, 50, 100, 500, 1000, 5000 μM) salisilik asit içeren suda 24 saat inkübe edilip petri kabı içerisine ekimi yapılmıştır. Sonrasında ise belirlenmiş sıcaklıkta (16 °C) iklim dolabında (büyütme kabini) çimlenmeye bırakılmıştır. Sarıçam tohumları iki günde bir kontrol edilerek 4-5 ml su ilavesi yapılmıştır. Tohumların ekilmesinden 20 gün sonra çimlenen örneklerde; çimlenme oranı, toplam klorofil miktarı, toplam karotenoid miktarı, lipit peroksidasyonu, kök boyu uzunlukları, prolin, hidrojen peroksit, süperoksit dismutaz ve guaikol peroksidaz ölçümleri yapılmıştır. Çalışma bulguları incelendiğinde belirli konsantrasyonlarda (50 ve 100 μM) uygulanan salisilik asitin, düşük sıcaklığa karşı bitkide yanıt oluşmasına yardımcı olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Salisilik asit, soğuk stresi, sarıçam, tohum çimlenmesi, tolerans

SUMMARY

EVALUATING EFFECTS OF SALICYLIC ACID ON SEEDS GERMINATION OF THE SCOTS PINE UNDER COLD STRESS

Salicylic acid can be defined as an organic molecule that is synthesized by plants and which acts as a signaling compound and has a tolerance response to both biotic and abiotic stressors. In our study, germination responses of salicylic acid treated at different concentration (1, 25, 50, 100, 500, 1000, 5000 μM) against cold stress of seeds were investigated. Scots pine seeds were incubated in water containing salicylic acid concentrations (1, 25, 50, 100, 500, 1000, 5000 μM) for 24 hours and planted in a petri dishes. Then seeds were allowed to germinate in the climate cabinet at the specified temperature (16°C). Scots pine seeds were monitored every two days and 4-5 ml of water was added. End of the 20th days later on the germinated seeds germination rate, total chlorophyll content, total carotenoid content, lipid peroxidation, root length lengths, proline, hydrogen peroxide, superoxide dismutase and guaikol peroxidase were measured. According to the result of the study, it was found that salicylic acid treatment at particular concentrations (50 and 100 μM) promoted the plant to respond to low temperature.

Keywords: Salicylic acid, cold stress, scots pine, seed germination, tolerance

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Deney grupları	19
-------------------------------	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Bitkilerde meydana gelen stres çeşitleri	4
Şekil 2. Sarıçam'ın bugünkü yayılışı	10
Şekil 3. Bitkilerde salisilik asit biyosentezinin metabolik yolu	15
Şekil 4. Petri içerisine ekilmiş sarıçam tohumları	18
Şekil 5. Çimlenen tohum örnekleri	19
Şekil 6. Çimlenme sayıları	24
Şekil 7. Kök boyu uzunlukları	25
Şekil 8. Nisbi su içeriği	25
Şekil 9. Toplam klorofil içeriği	26
Şekil 10. Toplam karotenoid içeriği	27
Şekil 11. MDA içeriği	27
Şekil 12. Hidrojen peroksit içeriği	28
Şekil 13. Prolin içeriği	29
Şekil 14. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi	29
Şekil 15. Guaikol peroksidaz enzim aktivitesi.....	30

KISALTMALAR DİZİNİ

μ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
M	Molar
mM	Milimolar
$^{\circ}$ C	Santigrad derece
ha	Hektar



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bitkiler doğada karşılıklarına çıkan pek çok biyotik (virüsler, bakteriler, antropojenik kaynaklı tahribatlar, tür içi ve tür dışı rekabet, av-avcı ilişkisi gibi) ve abiyotik (düşük sıcaklık, yüksek sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, ışık, kimyasallar gibi...) stres faktörlerinden çeşitli seviyelerde olumsuz olarak etkilenir ve bundan dolayı bitkilerde stres kaynaklı hasar meydana gelir. Bitkiler bu tür stres faktörleriyle karşılaştıkları zaman bitkilerin metabolizma fonksiyonlarında düzensizlikler meydana gelir ve sonuç olarak bitkisel verim önemli ölçüde azalır. Dünya genelinde, verim azalmasına neden olan etkenlerin başında yer alan abiyotik stres etkenleri, bitkisel üretim kayıplarının %50'si ya da daha fazla oranında bir oranda kayıp meydana getirirler (Bray ve ark., 2000). Soğuk stresi özellikle yarı tropik ve tropik bölgelerde yaşayan bitkilerde verim miktarını ve kalitesini etkileyen ve aynı zamanda kısıtlayan abiyotik stresler arasında yer almaktadır (Yang ve ark., 2005). Buna rağmen bazı bitkilerin düşük fakat donma derecesinde olmayan sıcaklıklara belirli bir süre maruz kaldığında oluşan soğuk karşısında tolerans gösterdiği bilinmektedir. Bu olaya soğuk uyumu adı verilir ve bu uyum düşük sıcaklığın neden olduğu zararı azaltır (Thomashow, 1999). Bu sebeple, bitkilerde soğuğa karşı toleransın artırılması ve aynı zamanda soğuk uyumunu sağlayan fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaların aydınlatılması, ileride uyumsal kabiliyetleri ve ürün kalitesinin yüksek bitkilerin geliştirilmesi açısından çok önemlidir.

Salisilik asit yüksek bitkilerin tamamında ve bazı mikroorganizmalarda rastlanılan sekonder bir metabolittir. Salisilik asitin metabolizmada birçok rol üstlendiği bilinmektedir. Örneğin Arum bitkisinde meydana gelen metabolik ısıyı düzenlediği ve bitkinin çiçeklerinde üretilen böcekçil kimyasal sentezini artırdığı ve bitkide patojenlere karşı sistemik kazanılmış direnci (SAR) uyardığı rapor edilmiştir (White, 1979; Ward ve ark., 1991). Aynı zamanda bazı bitkilerde oluşan kuru madde miktarınının artışına katkı sağladığından (Kling ve Meyer, 1983) ve nitrat redüktaz etkinliğini pozitif yönde düzenlemesinden dolayı (Jain ve Srivastava, 1981) son

zamanlarda bitki hormonu ya da hormon benzeri yapı olarak kabul görmektedir (Raskin, 1992). Salisilik asitin bitki metabolizması üzerindeki fizyolojik ve biyokimyasal etkileri birçok araştırmaya konu olmuştur (Raskin, 1992; Raskin, 1995). Bitkilerde oluşan bu fizyolojik etkiler arasında iyonların bitki bünyesine alınması ve taşınması, membran geçirgenliğinin ve mitokondriyal solunum etkinliği üzerinde görev üstlendiği belirtilmektedir (Barkosky ve Einhellig, 1993). Ramanujam ve ark. (1998) tarafından da belirtildiği gibi salisilik asitin bitkiler üzerinde çiçeklenmeyi uyardığı aynı zamanda armut bitkisinin süspanse edilmiş hücre kültürlerinde etilen hormonu biyosentezini engellediği, arpa köklerinde kifosfat emilimini ve yulaf köklerinde potasyum emilimini inhibe ettiği, indol asetik asit ile beraber köklenmeyi teşvik ettiği, absisik asit teşvikli yaprak absisyonunu tersine çevirebildiği ve mung fasulyesinde ise verimde artış meydana getirdiği bilinmektedir. Salisilik asit, başka bir ifadeyle bitkilerin stres faktörüne karşı verdikleri tepkide kendini gösteren önemli bir sinyal molekül olarak bilinmektedir (Senaratna ve ark., 2000). Salisilik asitin bitkilerin maruz kaldığı biyotik stres, oksidatif stres ve diğer pek çok çevresel stres faktörüne karşı yanıt oluşturduğu rapor edilmiştir (Cristea ve ark., 1987; Sangwan, 2001). Aynı zamanda salisilik asitin stres koşulları altındaki bitkilerde fotosentez mekanizmasını ve bitki büyümesini de olumlu şekilde etkilediği bilinmektedir (Gomez ve ark., 1993; Rajasekaran ve ark, 1999).

Sarıçam bitkisi, ılıman-nemli iklim ve çok soğuk iklimlerde yaşamını sürdüren ve bakıldığı zaman özellikle yüksek enlemlerde sıcaklığın -60 °C'ye kadar düştüğü yerlerde bile hayatını devam ettirebilen bir türdür (Atalay ve Efe, 2012).

Bu çalışmada, salisilik asitin, soğuğa maruz bırakılmış *Pinus sylvestris* L. (Sarıçam) tohumlarına uygulanıp çimlenme üzerindeki etkilerinin ortaya konması amaçlanmaktadır.

1.2. Bitkiler ve Stres

Canlılar doğalarından dolayı dış ortam ve birbirleriyle sürekli etkileşim içindedir. Yaşadığı çevre içinde uygunsuz koşullarla karşılaştıkları zaman adaptasyon eksikliğinden kaynaklı olarak bitkilerde stres durumu ortaya çıkar. Dış ortamdaki kaynaklı etkenlerin, bitkinin büyüme ve gelişmesini engellemesi ya da olumsuz bir

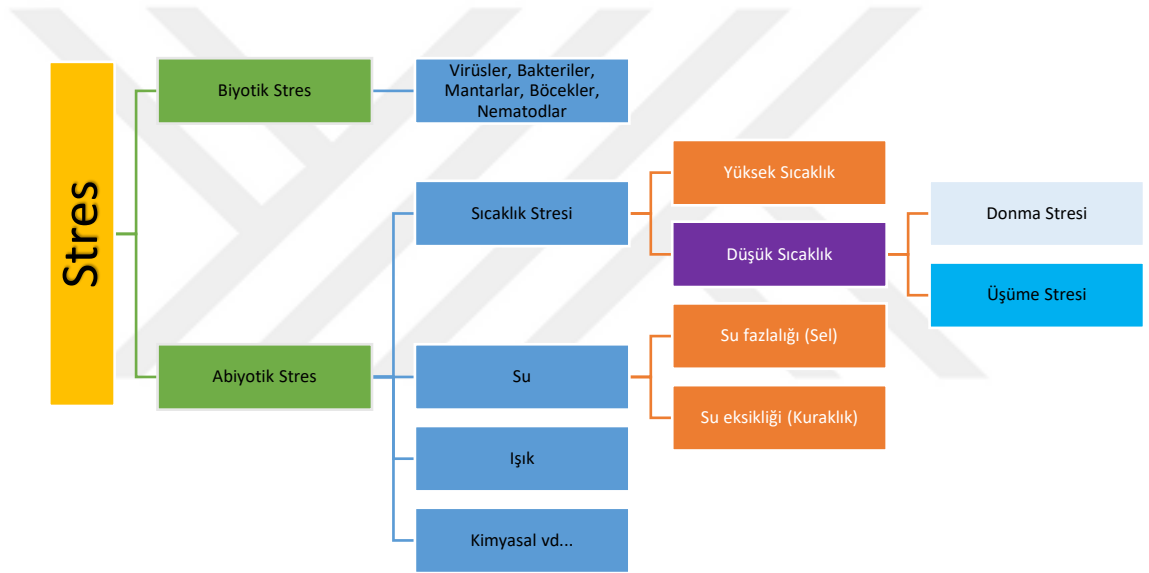
şekilde etkilemesi sonucunda bitkilerde oluşan bu durum stres olarak tanımlanır. Bitkinin gelişimini negatif yönde etkileyen çeşitli çevresel faktörlerdir. Bitkilerdeki stres canlılarda normal olan sistemin fonksiyonlarını aza indirme eğilimindeki olumsuz etkiler veya kuvvetler şeklinde tanımlanabilir (Kadıoğlu, 2011). Çoğu bitki, çevresel stres sırasında fonksiyonlarını korumak için sayısız sistem geliştirmiştir. Örneğin, üşüme kaynaklı hasarı en aza indirmek için bitkiler, enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan metabolitler gibi farklı temizleyici sistemleri düzenleyebilir (Gill ve Tuteja 2010). Ayrıca, bitkiler çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerini (salisilik asit (SA)) ve ozmoprotektanları (prolin) sentezleyebilir (Gautam ve Singh 2009; Abdelgawad ve ark. 2016; Tabassum ve ark. 2017).

Stres hücresel yapıları bozduğu gibi bitki için hayati değere sahip önemli fizyolojik fonksiyonlarda zarar oluşturur (Kransenssky ve Jonak, 2012). Kuraklık, tuzluluk, düşük sıcaklık gibi çevresel birçok faktör; bitkilerde osmotik stresi tetikler ve bu durum turgor kaybına neden olur. Aynı zamanda strese maruz kalmış bitkilerde hücre zarının yapısal bütünlüğü bozulur, protein aktivitelerinde azalmalar meydana gelir ve oksidatif hasara neden olan reaktif oksijen türlerinde aşırı artışlar meydana gelir. Bunun sonucunda fotosentez mekanizmasında inhibisyon oluşabilir. Ek olarak metabolizma fonksiyon bozuklukları, büyüme ve gelişim problemleri, üremede indirgenme ve erken senesens ortaya çıkar (Kransesky ve Jonak, 2012). Bitkilerin maruz kaldığı başlıca stres faktörleri ikiye ayrılmaktadır. Bitkilerin maruz kaldığı abiyotik stres faktörleri: Sıcaklık, yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, üşüme, donma, su, su eksikliği (kuraklık stresi), su fazlalığı (sel stresi), ışık, infrared, görünür ışık (yüksek ışık şiddeti), ultraviyole, iyonize, kimyasal, ph, tuz, gazlar, herbisitler, kirleticiler, rüzgâr, basınç, manyetizma gibi. Biyotik strese neden olan faktörler arasında virüsler, bakteriler ve mantarlar gibi patojenler, parazit böcekler ve otçul hayvanlar sayılabilir (Yılmaz ve ark., 2011). Meydana gelen stres faktörleri, bitkinin normal gelişimini ve hayatta kalma şansını aynı zamanda biyokütle üretimini, ürün kalitesini olumsuz bir şekilde etkiler (Agarwal ve ark., 2006).

Moleküler biyoloji ve genetik çalışmaların strese tolerans konusunda kat ettiği mesafe göz önünde bulundurulursa; stres teşvikli genetik mekanizmaların anlaşılması hem bilimsel hem de insani (besin yetersizliğinden kaynaklanan hastalıklar, savaşlar ve diğer problemler) için çok önemlidir. Genellikle bitkiler strese maruz kaldığında, stres

sinyali hızlı bir şekilde ortaya çıkar. Strese karşı yanıt verme ve savunma genlerine ait ifade seviyeleri ilk yarım saat içinde başlar ve altı saat sonunda en yüksek seviyeye ulaşır. Bundan da anlaşılıyor ki bitkiler stresle başa çıkmak için oldukça hızlı bir şekilde yanıt sistemi oluştururlar (Swindell, 2006).

Raporlara göre dünya üzerinde toprakların yaklaşık %12'si tarıma elverişlidir. Bu nedenle aşırı olumsuzluklardan kaynaklanan streslere karşı dayanıklılık gösterebilen ya da bu stresleri tolere edebilen bitkiler yetiştirilmesi gerekmektedir. Strese karşı daha güçlü ve toleranslı bitkiler elde etmek için; tolerans mekanizmalarıyla birlikte stres etkenine karşı dayanma güçlerinin bilinmesi önemlidir (Bidwell, 1974).



Şekil 1. Bitkilerde meydana gelen stres çeşitleri (Taiz ve Zeiger, 2002).

1.2.1. Bitkilerin Strese Karşı Geliştirdikleri Yanıt Mekanizmaları

Kaçış; çevre şartlarının uygun olduğu zamanlarda bitkinin normal büyüme ve gelişmesini stresli dönemden önce tamamlamış olmasıdır. Örneğin, kurak dönem gelmeden önce yağışlı mevsimlerde yaşam döngüsünü erkenden tamamlayan bitki davranışı olarak tanımlanır (Taiz ve Zeiger, 2002).

Sakınım; bitkilerin çevre şartlarından dolayı meydana gelen stres faktörlerinin neden olduğu olumsuz etkileri en aza indirmesi ya da engellemesi anlamına gelir. Dış çevre şartlarında strese neden olabilecek koşullar oluşmasına rağmen bitki hücreleri kendi

içerisinde stres faktöründen uzak bir ortam oluşturmayı başarmasıdır (Taiz ve Zeiger, 2002).

Tolerans veya direnç; genel olarak bakıldığında “stres toleransı” ve “stres direnci” birlikte gösterilir. Bir bitkinin kendisi için öldürücü olmayan bir stres durumuna maruz kalması durumunda biyokimyasal ve moleküler düzenlemeler ile bu stres faktörüyle başa çıkması olarak tanımlanabilir. Başka bir ifadeyle, stres faktörlerinin sahip olduğu bu öldürücü etkinin bitki tarafından elimine edilmesi, azaltılması ya da onarılması şeklinde tanımlanır.

Alışma (aklimasyon); bir bitkinin strese önceden maruz kalması sonucu toleransı artmış ise bitkinin bulunduğu ortama alışmış olduğu ifade edilir. Adaptasyon (uyum) ise pek çok nesil boyunca seçilim sonucu kazanılan genetiksel olarak belirlenmiş direncin düzeyidir. Adaptasyon ve alışma, anatomik veya morfolojik seviyeden başlayarak hücresel, biyokimyasal ve moleküler seviyelere uzanan uyumsal mekanizmalardır (Taiz ve Zeiger, 2002). Bitki türleri çevrelerinde meydana gelen stres faktörüyle karşılaştıkları zaman hemen hücresel metabolizmalarını yeniden düzenleyerek kendilerine göre savunma mekanizması geliştirerek cevap verir. Jasmonik asit, etilen, poliaminler, kalsiyum, absisik asit ve salisilik asit gibi molekül türleri bitkilerde haberci ve/veya sinyal aktarıcı molekül olarak görev yapmaktadır (Klessig ve Malamy, 1994).

1.2.2. Soğuk Stresi

Kuraklık, su, ışık, kimyasallar gibi diğer çevresel koşulların neden olduğu stres etkilerinden farklı bir şekilde soğuk, bir bitkinin bütün hücrelerinde aynı zamanda meydana gelen değişiklikleri göstermektedir (Kratsch ve Wise, 2000). Tüm bitkilerin büyüme ve gelişmesini olağan bir şekilde gerçekleştirebilmesi için gerekli bir sıcaklık aralığı vardır. Bitkilerin normal büyüme ve gelişimini tamamlaması için gerekli olan sıcaklık derecesinin altında bulunan sıcaklıklar soğuk stresi şeklinde tanımlanmaktadır. Düşük sıcaklık ya da soğuk stresi bitki hücrelerinde su ve besin alımını azaltır, membran akışkanlığını düşürür ve hem protein hem de nükleik asit konformasyonunu etkiler. Bu aşırı durumların sonucunda biyokimyasal reaksiyonlarda bozulmalar meydana gelir. Buna yanıt olarak diğer stres etkenlerinde

olduğu gibi soğuk stresi altında da antioksidan sistem aktive olur ve bitkiyi hayatta tutmaya çalışır (Kratsch ve Wise 2000; Einset ve ark., 2007; Zhao ve ark., 2013; Ruelland 2017).

Soğuk (<20 °C) ve / veya donma (<0 °C) sıcaklıkları içeren soğuk stresi bitkilerin büyümesini ve gelişimini olumsuz yönde etkiler. Ayrıca bitkilerin çevresel yayılışını ve tarımsal verimliliği de önemli ölçüde kısıtlar. Soğuk stresi, metabolik reaksiyonların doğrudan inhibe edebilir ya da dolaylı olarak ozmotik düzenlemeyi bozabilir (su alımının soğuma ile engellenmesi ve donma kaynaklı hücresel dehidrasyon). Ek olarak soğuk stresi diğer stres etkenleri ile kombine bir Şekilde etki edebilir ve bunun sonucunda oksidatif stres meydana gelir. Bunun sonucunda bitkinin verimli bir Şekilde genetik ekspresyon mekanizması da inhibe olur. Çoğu ılıman bitki, soğuk aklimasyon adı verilen bir işlemlle donma toleransı kazanır. Aynı zamanda, bazı bitkiler için sıcaklık koşulları optimum olurken, başka bir bitki türünde stres faktörü oluşturabilmektedir. Soğuk stresine karşı çeşitli seviyelerde duyarlı olan bitkiler yaşam biçimlerine göre 3 grupta sınıflandırılabilir (Mahajan ve Tuteja, 2005).

1-Soğuk stresine karşı duyarlı olanlar (12 °C'nin altında olan ortam sıcaklıklarında strese uğramış olurlar).

2-Soğuk stresine karşı toleranslı fakat donma stresine karşı duyarlı olanlar (12 °C'nin altında seyreden ortam sıcaklıklarına dayanabilirler lakin sıcaklığın donma seviyelerine düştüğü zamanlarda yaşamlarını sürdüremezler).

3-Donma stresine karşı dayanıklı olanlar (donma sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda hayatlarını devam ettirebilirler. Buna ek olarak donma sıcaklığı seviyelerine karşı toleranslıdırlar ve uyum sağlayabilirler).

Hem soğuk stresi hem de donma stresi benzer olsa da gerçekte birbirlerinden oldukça farklı olaylardır. Soğuk stresini hücreler üzerinde meydana gelen düşük sıcaklığın doğrudan etkisi olarak tanımlamak mümkündür. Donma olayı ise dolaylı bir Şekilde meydana gelir ve hücrelerde buz oluşumuna neden olarak zarara uğratır (Pearce, 1999). Soğuk aklimasyon, düşük donma sıcaklıklarına maruz kalmadan önce bitkilerin donma toleransı kazandığı bir süreçtir. Çoğu ılıman bitki soğuğa alışabilir ve vejetatif dokularında hücre dışı buz oluşumuna tolerans kazanabilir. Kış alışkanlığı olan

bitkilerde (kışlık buğday, arpa, yulaf, çavdar, yağlı tohum vb.), kışın donma stresi döneminden önce üreme evresine erken geçişi önleyen bir vernalizasyon engeli vardır. Bu sayede, bu tür bitkiler kış periyodunu fide olarak geçirirler.

Soğuk stres sinyali

Hücrel membranlar sıvı yapılardır ve bitki hücreleri düşük sıcaklıkta membran akışkanlığında azalmalar meydana gelir. Ayrıca zar proteinlerinde, diğer hücre proteinlerinde ve nükleik asit konformasyonlarında fonksiyonel azalmalar meydana gelir. Buna karşın soğuk sinyali algılandığında hücre zarı katılaşmaya başlamadan önce COR (Cold Responsive) genlerinin indüklendiği ve böylece soğuk aklımasyonunun sağlandığı yonca ve *Brassica napus*'ta gösterilmiştir (Sangwan ve ark., 2001). Bu sonuçlar, bitki hücrelerinin membran ile soğuk stresi algıladığı fikrini desteklemektedir. Reaktif oksijen türleri diğer stres tiplerinde olduğu gibi soğuk stresine maruz kalan bitki hücrelerinde de aşırı oranda birikir ve buna karşın soğuk stresine yanıt olarak gen ifadesi seviyesinde düzenlemeler gerçekleşir. Örnek vermek gerekirse Arabidopsis türünde *frol* mutanlığı (frostbite1) hem soğuk hem de donma stresine karşı aşırı duyarlıdır ve bu genin yabani tipine (FRO1) oranla aşırı ROS biriktirirler (Lee ve ark., 2002). Ek olarak soğuk aklımasyonu bitki transkriptomunda önemli değişiklikler meydana getirir. *Arabidopsis*'te, soğuk-yanıtlı genlerin toplam genomun %4'ü ile %20'sini oluşturduğu tahmin edilmektedir (Hannah ve ark., 2005; Lee ve ark., 2005).

1.2.2.1. Soğuk Stresinin Bitkiler Üzerindeki Etkileri

Bitkiler, maruz kaldıkları soğuk stresinin etkilerini azaltabilmek için kendi içlerinde farklı stratejiler geliştirirler. Ancak sıcaklık dayanabilecekleri seviyenin altına düştüğünde sahip oldukları stratejiler yeterli gelmeyebilir. Bu durumda bitkide soğuk stresi kaynaklı hasar ortaya çıkar. Çok düşük sıcaklıklarda oluşan soğuk zararı, bitkinin soğukla karşılaşması sonucunda bitkide meydana gelen olumsuz fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklerdir. Fizyolojik değişimleri birincil (primer) hasar ve ikincil (sekonder) hasar olarak isimlendirmek mümkündür. Birincil hasar, bitkinin yapısında fonksiyon bozukluğu olduğu zaman meydana gelen hızlı ilk tepkidir. Ancak, bu tür fonksiyon bozuklukları sıcaklık normal derecesine ulaştığı zaman hızlı bir şekilde

düzelir. İkincil hasar ise birincil hasarın sonucunda oluşur ve her zaman geri dönüşümlü olmayabilir. Aynı zamanda, soğuk zararının meydana getirdiği görsel belirtiler, ikincil soğuk zararının oluşturduğu bir durumdur (Rab ve Saltveit, 1996). Bitki türlerinde soğuk stresinin oluşturduğu hasar belirtileri; sıcaklık değerine, soğuk etkisi altında kaldığı süreye, bitkiye, bitkinin gelişim evresine, soğuk stresine maruz kalmış olan dokuya ve diğer çevresel koşullara (rüzgara maruz kalma, suya maruz kalma, yeterli besin alınımına ve ışık gibi...) bağlı olarak farklılık gösterir (Saltveit ve Morris, 1990). Bu faktörlerin soğuk stresi şiddetini etkilemesine bağlı olarak; bitki büyüme hızının yavaşlaması, yaprak boyutlarında indirgenme, senesensin hızlanması ve buna bağlı olarak programlanmış hücre ölümünün başlaması, klorofil yıkımı, hücre zarı bütünlüğünün bozulması ve bunların sonucunda hücre içi dengenin bozulması, protoplazmadaki sirkülasyon ve rotasyon hareketlerinin yavaşlaması ve nihayetinde ölüm durumları ortaya çıkar (Saltveit ve Morris, 1990; Kratsch ve Wise, 2000; Mahajan ve Tuteja, 2005; Bertamini vd., 2007; Rymen vd., 2007).

1.2.2.2. Soğuk Stresinin Hücresel Düzeyde Etkileri

Soğuk Stresinin Hücre Zarı Üzerine Etkisi

Düşük sıcaklıkların bitkiler üzerinde oluşturduğu en olumsuz etki hücre zararının yapısını olumsuz olarak etkilemesidir. Bu zararın büyük çoğunluğu dehidrasyon nedeniyle oluşur. Hücre zarındaki lipidlerin içeriği bitkinin soğuğa karşı duyarlılığında veya tolerans göstermesinde büyük öneme sahiptir. (Mahajan ve Tuteja, 2005). Hücre zararının doğal yapısında yüksek miktarda fosfolipid, serbest ve glikozlanmış sterol ve serebrosidler bulunmaktadır. Bütün hücre zarlarında aynı lipid çeşidi olsa da farklı bitki türleri arasında fosfolipid, sterol ve serebrosid oranları oldukça değişiklik gösterebilir. Düşük sıcaklığa maruz kalan bitkinin hücre zararının yapısında bulunan lipid içeriğinde önemli değişimler yaşanır. Öncelikle, birçok bitki türünde ortak olarak, hücre zarındaki fosfolipid oranında artış meydana gelir. Soğuk stresinin artması ya da devam etmesiyle birlikte, soğuğa toleransın maksimum olduğu noktada, hücre zarındaki serebrosidlerin oranında azalış meydana gelir, ancak azalmanın miktarı çoğu bitki türüne göre çeşitlilik gösterir (Uemura ve Steponkus, 1999). Aynı zamanda, bitkilerde hücre zararının yağ asidi doygunluk seviyesi ile bitkinin soğuğa karşı duyarlılığı arasında bir negatif korelasyon vardır. Hücre zarı lipidlerinin faz ve

akışkanlık özellikleri yağ asidi doyumluk derecesinden oldukça etkilenir. Zar lipidleri doymamış yağ asidi ve doymuş yağ asidi olmak üzere iki çeşit yağ asidinden meydana gelir. Doymamış yağ asitleri iki karbon atomu arasında bir ya da daha fazla çift bağ içerirler (-CH=CH), doymuş yağ asitlerinin ise karbon atomları tamamen "H" atomlarıyla doyurulmuştur (-CH₂-CH₂-). Doymuş yağ asidi içeren yağlar, doymamış yağ asidi içeren yağlara göre daha yüksek sıcaklıklarda katılaşma özelliği gösterir. Bundan dolayı, hücre zarındaki doymamış yağ asitlerinin bağıl oranı zar akışkanlığını önemli ölçüde etkiler. Hücre zarının yarı kristal yani sıvı-mozaik fazdan jel fazına geçtiği sıcaklık "geçiş sıcaklığı" olarak tanımlanır. Soğuğa karşı duyarlı olan bitkiler, daha fazla doymuş yağ asidi oranına sahip olduğu için daha yüksek geçiş sıcaklığına sahiptir. Geçiş sıcaklığının yüksek olması, soğuğa karşı duyarlı olan bitkilerin hücre zarı yapısının sıvı mozaik fazdan katı jel fazına geçme eğilimini artırır ve bundan dolayı hücre zarında iyon sızıntısı oluşumuna neden olur. Diğer taraftan bakıldığında, soğuğa karşı toleranslı türler daha fazla doymamış yağ asidi oranıyla karakterizedirler ve aynı zamanda daha düşük geçiş sıcaklığına sahiptirler (Mahajan ve Tuteja, 2005; Bakht ve ark, 2006; Uemura ve ark. 2006; Wang ve ark. 2006). Bitki türlerinin maruz kaldığı soğuk, hücre zarı yapısındaki fosfolipid moleküllerinin açıl kuyukları tarafından algılanır ve sonrasında fosfolipidlerin polar başları birbirine yaklaşır. Bu şekilde, sıvı mozaik fazdaki bölgeler (domain) jel fazı domainlerine çevrilir. Jel fazı domainleri sıkı ve düşük kinetik lipidleri ve sert paketlenmiş açıl zincirlerini içerirler. Hücre zarı çift tabakasında bir jel faz domaininin bulunması dahi, integral zar proteinlerinin doğru fonksiyon göstermesini engeller ve hücre zarı sahip olduğu etkili geçirgenlik özelliğini devam ettiremez (Lyons, 1973; Vigh ve ark., 1998; Bakht ve ark., 2006). Soğukun zar lipidlerinin faz özellikleri üzerine bu etkisi yüzünden turgor kaybı ve sitoplazmik sıvı sızıntısı oluşur ve hücre bütünlüğü bu şekilde bozulmuş olur (Vigh ve ark., 1998; Martz ve ark., 2006; Morsy ve ark., 2007). Bitki türünün maruz kaldığı soğuk stresinin süresi kısa olduğunda oluşan bu gibi olumsuz etkiler giderilebilmektedir. Ancak stresin uzun süreli olması durumunda enerji metabolizmasının eksikliği, fotosistemlerin bozulması, hücre otolizi ve ölüm gibi çeşitli hasarların meydana gelmesine neden olmaktadır.

1.3. Sariçam (*Pinus sylvestris* L.)

Sarıçam (*Pinus sylvestris* L.) dünyada en geniş yayılış alanına sahip konifer türüdür (Boratynski, 1991). Sarıçam, Norveç sahillerinde 70° kuzey enlemine kadar yükselip, güneyde ise İspanya Sierra Nevada'ya 37° kuzey enlemine kadar iniş göstermektedir. Boylam olarak belirtilirse; İspanya'da 8° Batı boylamından Sibiry'a da 141° Doğu boylamına kadar uzanan ve 14.000 km uzunluğunda bir alanda yayılışını göstermektedir (Şekil 2.). Sarıçamın bu kadar geniş yayılış alanına sahip olması türün farklı iklim ve toprak tiplerine uyum sağlamasına neden olmuştur. Sarıçam popülasyonları daha farklı lokal alanlara uyum sağlayabilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Sarıçam'ın bugünkü yayılışı. 1- Türün ana yayılış alanı 2- İzole meşcereleri 3- Kuzey kutup dairesi

Örnek vermek gerekirse; Finlandiya'nın sahip olduğu ormanlarının %65'ini, İngiltere'nin sahip olduğu koru ormanlarının %20'sini ve Fransa'da bulunan koru ormanlarının %9'unu, Sarıçam meşcereleri oluşturmaktadır. Türkiye'de ise 1.479.648 hektarı normal iken, 728.588 hektarı bozuk olmak üzere toplam 2.208.236 hektar sarıçam ormanı mevcuttur. Bu da Türkiye'nin sahip olduğu ormanlarının yaklaşık %7'sinin sarıçam meşcerelerinden oluştuğunu göstermektedir (OGM, 2012).

Sarıçam, dünyada en geniş yayılışı olan çam türüdür. Derine giden kazık kök sistemine sahiptir ve kış soğuklarına dayanıklıdır. Tipik ışık ağacıdır. Türkiye'deki doğal yayılışı Kuzeydoğu Anadolu'da 2700 metrelere kadar çıkar. Trabzon'un Of ve Sürmene

ilçeleri arasında, adını verdiği Çamburnu Mevkiindeki yayılışına ilave olarak Artvin-Arhavi-Sugören ile yine adını verdiği Çamlı köyleri arasında da sahile inen iki ayrı doğal toplu yayılışı bulunur. Çoruh Vadisinde de, Borçka'dan Artvin'e giderken (Taraklı, Ambarlı, Avcılar ile İbrikli ve Adagül köyleri arasında) 200-250 metrelere kadar inen doğal yayılışı vardır (Dağdaş ve Doğan, 2018).

Sarıçamın dünyadaki güney yayılışı sınırı olarak Kayseri-Pınarbaşı-Melikgazi yayılışı bilinmekteydi. Buna karşın bu yayılış sınırının daha alt enlemlere indiği günümüzde tespit edilmiştir (Akkemik, 2014). Güncel bilgilere göre sarıçamın dünyadaki güney yayılış sınırı, İspanya'nın güneyindeki Endülüs eyaletinde yer alan Sierra de Baza ile Sierra Nevada arasındaki 37. enlemde yer alan Betikas Dağı'dır. Burada 1800-2100 m rakım aralığında yayılış gösterir. Sarıçamın Türkiye'deki en güney enlemlerinden biri olan Kayseri-Pınarbaşı'ndaki doğal yayılışı 300-350 ha olsa da yapılan sarıçam ağaçlandırmaları ile Melikgazi yayılışı toplam 1192 ha'a ulaşmış durumdadır (Dağdaş ve ark., 2005).

Sarıçam, ekolojik ve ekonomik yönlerden değerlendirildiğinde çok kıymetli bir ağaç türü olarak kendini gösterir. Ekolojik açıdan ise tüm Kuzey Avrupa'da yayılışını devam ettiren tek ağaç türüdür. Akdeniz'deki dağlık ormanlarında, Sibirya'daki Tayga ormanlarında, İskoçya'daki Kaledonya ormanlarında olduğu gibi çok farklı ekosistemlerde bulunur ve birçok liken, yosun, mantar ve böcek türünün yaşamını devam ettirebileceği uygun ortamlar oluşturur. Sarıçam ormanlarının korunması demek aynı zamanda NATURA 2000 içerisinde tanımlanan, en az 64 adet habitatın korunması da demektir. Ekonomik açıdan bakıldığında ise sarıçam, tüm Avrupa Birliği ülkelerinde yayılış göstermekte ve bu ülkelerde ticari orman alanının yaklaşık %20'sini kaplamaktadır. Özellikle Kuzey ülkelerinde kereste üretim açısından önemli bir kısmını oluşturur. Sarıçam bu ekolojik ve ekonomik değerinin öneminden dolayı 2002 ve 2011 yılları arasında, üzerinde en fazla araştırma yapılan ağaç türü olarak yer almış ve 12000'den fazla yayına konu olmuştur (Matias ve Jump, 2012). Sarıçam Güney Avrupa'da ise 500 m'den başlar ve 2600 m yükseltiye kadar uzanır (Atalay ve Efe, 2012). Ülkemize baktığımızda ise Karadeniz Bölgesi'nde deniz seviyesine doğru iner (Sürmene-Çamburnu), Doğu Anadolu Bölgesinde ise 2700 metre yükseltide (Sarıkamış-Ziyarettepe) normal kapalı meşcereler olarak kendini gösteririr (Aksoy, 1994). İklim açısından değerlendirildiğinde sarıçam, yıllık ortalama sıcaklığın 2-8 °C

ve yıllık olarak ortalama yağışın 500 mm'nin üzerine çıktığı nemli ılıman bölgeler ile kış aylarında sıcaklığın -10 °C'nin altına kadar düştüğü, yazın 30 °C'ye yaklaştığı, yıllık ortalama yağışın 400 mm'ye kadar indiği karasal yarı kurak iklimden; kuzeyde subpolar (kutup altı) iklime kadar olan bölgelerde yayılış gösterir. Başka bir deyimle sarıçam, ılıman-nemli iklim ve çok soğuk iklimlerde yaşamını sürdürdüğü özellikle yüksek enlemlerde sıcaklığın -60 °C'ye kadar düştüğü yerlerde kendini gösterir (Atalay ve Efe, 2012). Ek olarak Nilsson ve Walfridsson (1995) görsel olarak yaptıkları zarar tespitleri sonucunda 17 yaşındaki sarıçam klonlarında ibrelerin -70 ile -80 °C soğuklara dayanabildiklerini göstermişlerdir.

Repo ve arkadaşları (1996) ise 25 yaşlı sarıçamlardan topladıkları ibreleri iklim dolabında dondurarak yaptıkları laboratuvar çalışmalarında, türün -60 ile -70 °C düşük sıcaklıklara kadar zarar görmeden dayanabildiğini, bu çalışmayla açıklamışlardır. Diğer bir taraftan Sarıçam Rusya'nın iç bölgelerinde 250 mm yağış alan yerde dahi yayılışını göstermiştir. (Creg ve Zhang, 2001). Ülkemizi değerlendirdiğimizde saf sarıçam ormanlarının yayılışına sahip alanlarda yıllık ortalama yağış daima 400 mm'nin üzerinde olmuştur. Genellikle Sarıçam, yıllık olarak ortalama yağışın 500 mm'nin üzerine çıktığı Karadeniz ardındaki çöküntü alanların yüksek kesimleri ile Kuzeydoğu Anadolu ve Kuzey Anadolu kıyı dağlarının güney yamaçlarında yayılışını sürdürür. Buradan da anlaşılacağı üzere sarıçamın yarıkurak/yarı nemli ve nemli alanlara kadar yayılış gösterebilmektedir. Bununla beraber sarıçam meşçerelerinin optimum yayılışı, 600 mm yağıştan fazla olan, Anadolu'nun kuzey kesiminde görülür (Atalay ve Efe, 2012). Sarıçam ormanlarının normal yetiştiği ortamlarda, yıllık olarak yağışın 400-600 mm olduğu, kurak devrenin ise temmuz ve ağustos'ta bulunduğu ve kuraklığa karşı dayanıklı olduğu için fazla yağış istemediği bilinmektedir. Buna karşın Karadeniz makro iklim tipinde 628-1371 mm, İç Anadolu Step makro iklim tipi'nde 500-878 mm ve Doğu Anadolu makro iklim tipi'nde ise 556-620 mm yıllık ortalama yağış meydana geldiği de görülmektedir. Bu değerlerden yola çıkılarak, Batı Karadeniz yöresinde yağışların mevsimsel olarak değişmesinden dolayı az ya da çok yaz kuraklığından bahsedilebilir. Yıllık ortalama sıcaklığın çok düşük olmasına rağmen, yağışların çoğunun yaz başına ve yaza gelmesi nedeniyle, Doğu Anadolu Bölgesinde meydana gelen yağışların yeterli düzeyde olduğu kabul edilmiştir. Doğu Anadolu Bölgesinde vejetasyon süresinin sınırını, öncelikli olarak sıcaklık, diğer

yörelere ise, yağış belirlemektedir. (Çepel ve ark., 1977). Türkiye’de sarıçam, nemli ılıman denizel iklimle yarıkurak karasal iklim arasındaki geçiş kuşağında yetişmekte olup saf ve karışık ormanlar halinde yayılış gösterir. Başka bir ifadeyle, sarıçam ülkemizde nemli ve yarı nemli koşullardan yarıkurak iklim koşullarına kadar olan alanlarda varlık gösterir. Ülkemizde sarıçam’ın yetiştiği alanların karasal kesimlerinde ekstrem sıcaklıklar, ortalama bir değer olarak -40 °C ile 40 °C arasında farklılık meydana getirir (Atalay ve Efe, 2012). Sarıçamın kuzeydeki yayılışını sınırlayan birinci faktör düşük sıcaklık iken güneydeki yayılışını sınırlayan birinci faktör ise yüksek sıcaklık ile yaz kuraklığının birleşimidir. (Carlisle ve Brown, 1968; Castro ve ark., 2004; Mendozave ark., 2009). Ayrıca, Magnani ve ark., (2009) sarıçamın Avrupa’da yayılış gösterdiği alanlarda yaptıkları çalışmalarda büyümenin %50 oranında düşük sıcaklıklar ve %37 oranında su stresi nedeniyle azaldığını bildirmişlerdir.

1.4. Salisilik Asit

Salisilik asit (SA) birçok bitki tarafından üretilen aynı zamanda çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı tolerans sağlayan ve strese yanıt mekanizmasında sinyal görevi üstlenen bir molekül olarak tanımlanır. Bu bileşik aynı zamanda önemli bir metabolittir ve bitki hücresinde fizyolojik olarak düzenleyici işlevler gerçekleştirebilen özelliklere sahiptir. Biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı gelişme ve reaksiyon gösterir. Salisilik asit veya türev aldığı ortohidroksibenzoik asit birçok bitki türünde fazlaca tanınan önemli fenolik bileşik grubudur. SA bikilerde serbet fenolik asit olarak ve/veya konjugat formunda bulunur.

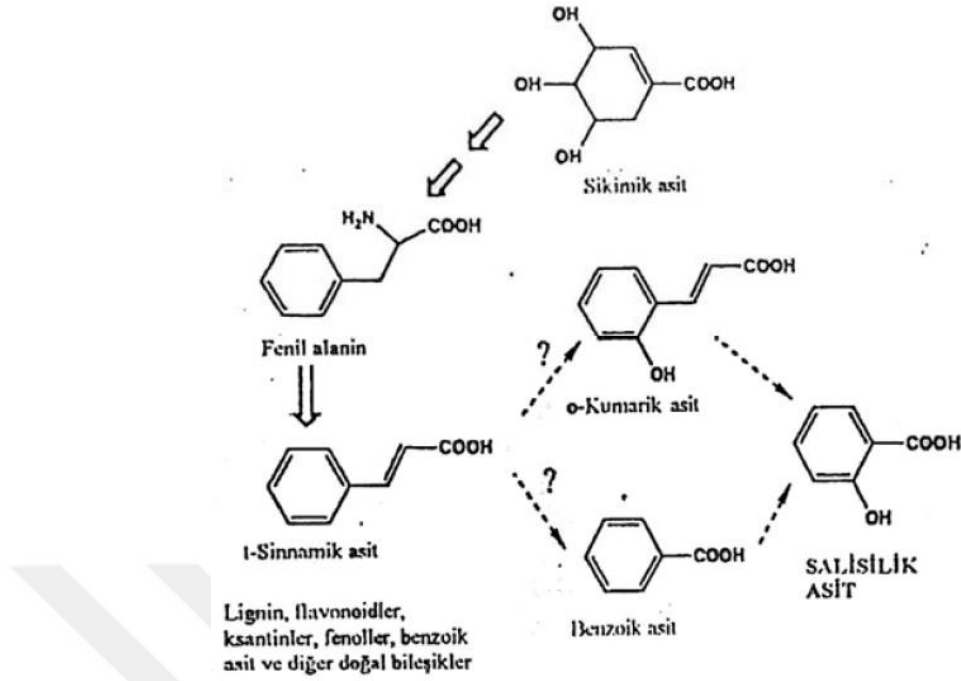
En iyi bilinen doğal salisilik asit türevi *Salix alba* (ak söğüt)’da ortaya çıkan salisilin, *S. purpurea*, *S. daphnoides* ve *S. fragilis* dâhil diğer söğüt türlerinde de görülmüştür. Bu bitkide en yüksek salisilin içeriği, İlkbahar ve yaz aylarında görülür. Kışın en düşük olduğu (Foster ve Tyler, 1999). SA’nın en yüksek içeriği *S. laponum* kabuğunda bulunmuştur. Salisilik asit söğüt ağacı (*Salix*) için Latince kelimesinden türetilmiştir. Johan Buchner 1828’de az miktarda salisin izole etmiştir (Raskin, 1992).

On dokuzuncu yüzyılın sonlarında, 1899’da Bayer şirketi yeni bir ilaç geliştirdi, asetilsalisilik asit ve asetilspirik asit (*Spiraea*’dan) ve sonrasında da aspirin üretildi

(Ansari ve Misra, 2007). Salisilatlar *Salix* cinsi dışında önemli miktarda keklik üzümü (*Gaultheria procumbens*) dokularında da tespit edilmiştir. Birçok enflamatuar hastalığın tedavisinde koroner kalp hastalığının ve kalp krizlerinin önlenmesinde kullanılır. Ağrıyı, ateşi azaltır. Son zamanlarda, salisilatların aynı zamanda tümör baskılanmasını da etkilediği gösterilmiştir (Brummelkamp ve ark., 2003; Ansari ve Misra, 2007; Elwood ve ark., 2009). İnsanlar için terapötik olarak kullanılan bu bileşik aynı zamanda bitkiler aleminde de oldukça önemli roller üstlenmektedir. SA bitki hücrelerindeki düzenleyici işlevleri, metabolik ve fizyolojik rolleri ve son olarak strese yanıt mekanizmasındaki iyileştirici etkileri nedeniyle 20 yıldan fazla bir süredir bilimsel araştırmalara konu olmuş bir moleküldür (Horváthve ark., 2007; San-Vincente ve Plasencia, 2011).

1.4.1. Salisilik Asit Biyosentezi

Bitkilerde salisilik asit (orto-hidroksibenzoik asit) oluşumu için iki adet metabolik yoldan bahsedilmektedir (Davies, 1995). Bu bahsedilen yollarda, salisilik asidin β -oksidasyon ile orto-hidroksilasyon reaksiyonlarının oluşum önceliğinin birbirinden farklı olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Bu yönüne bakıldığında, sağlıklı ve virüs inoküle edilmiş tütün bitkisinde bulunan salisilik asidin aslında benzoik asit sayesinde sinnamik asitten tüvelendiği ortaya konmuştur (Yalpani ve ark., 1993). Ayrıca, *Agrobacterium tumefaciens* ile enfekte olmuş genç domates fidelerinde bulunan sinnamik asitin orto-kumarik aside orto- 215 hidroksilasyonunun arttığı ve ardından kumarik asitin β -oksidasyonu ile salisilik asit oluştuğu bilinmektedir. Sağlıklı bitkilerde ise, salisilik asidin yaygın biyosentez yolunun, “Şikimik asit→Sinnamik asit→Benzoik asit→Salisilik asit” şeklinde gerçekleştiği öne sürülmektedir.



Şekil 3. Bitkilerde salisilik asit biyosentezinin metabolik yolu

1.4.2. Bitkilerde Salisilik Asit Biyosentezinin Metabolik Yolu

Bitkilerde salisilik asit, aktif formda bulunduğu gibi, glukozidler ve esterler olarak bağlı form şeklinde de bulunabilir. Salisilik asit çoğu bitkilerde genellikle, şeker bileşiği şeklinde olan “salisilik asit- β -glukozit” (SAG) olarak, yani inaktif (depo formu) şekilde bulunur. B-glukozidaz enzimi, bitkilerde oluşan fitohormonların sinyal aktivasyonlarını kontrol eder ve aynı zamanda salisilik asidin bağlı formdan serbest forma geçişini katalize ederek bitkide oluşan serbest salisilik asit seviyesini düzenler (Raskin, 1995). Tütün bitkisi üzerinde yapılmış bir çalışmada, tütün bitkisinin yapraklarına dışarıdan salisilik asit uygulanmış ve sonucunda yaprakların hücrelerarası boşluklarında SA- β -glukozidaz enziminin aktivitesinin meydana geldiği gözlemlenmiştir (Davies, 1995). Salisilik asit- β -glukozit’in büyük çoğunluğu hücrelerarası boşluklarda bulunurken; salisilik asidin büyük çoğunluğunun ise hücrelerin içinde olduğu görülmüştür. Çünkü salisilik asit- β -glukozit’in SA’dan meydana gelmesi, hücrelerin içinde meydana gelmektedir. Bunun sonucunda dışarıdan uygulanan salisilik asidin direkt olarak hücrelerin içine girdiğini göstermektedir. Sonuç olarak, salisilik asit- β -glukozit’in hücrelerarası boşluklar yoluyla uzak dokulara kadar taşınan ve aynı zamanda bir sinyal rolü oynayabileceği görüşü ortaya

konulmuştur. Salisilik asidin uzun mesafeli taşınımı için uygun şeklinin salisilikasit- β -glukozit olduğu görüşü öne sürülmektedir. Çünkü; salisilikasit- β -glukozit hem salisilik asite göre daha fazla çözünebilir, hem de daha az toksik etkisi gösterir (Seo ve ark., 1995).

Salisilik asit, bitkide sinyal molekülü olarak hareket eder ve kloroplastların (Uzunova ve Popova, 2000), fotosentetik aktivitenin (Fariduddin ve ark., 2003), gravitropizmanın (Medvedev ve Markova, 1991) oluşumunu düzenler. SA'nın Arabidopsis'te yaprak yaşlanması sırasında gen ekspresyonu sinyalizasyonuna ve düzenlenmesine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Morris ve ark. 2000).

Ekzogenik olarak uygulanan SA'nın fotosentez ve bitki-su ilişkileri üzerine etkisi, potansiyel olarak bitkilerde çok çeşitli metabolik süreçlere katıldığı ve ayrıca bu süreçleri etkilediği fazlaca çalışılmıştır (Ghai ve ark., 2002). Moharekar ve ark. (2003) salisilik asidin karotenoidlerin ve ksantofillerin sentezini aktive ettiğini bildirmiştir. SA'nın ekzogenik uygulamasının, *B. juncea*'da net fotosentetik oranını, dahili CO₂ konsantrasyonunu, su verimini, stoma iletkenliğini ve terleme oranını arttırdığı rapor edilmiştir (Fariduddin ve ark. 2003).

Salisilik asidin çeşitli enzim aktivitelerini de etkilediği bilinmektedir. Örnek vermek gerekirse; düşük konsantrasyonda foliar olarak uygulanan SA (10^{-5} M) *Brassica* yapraklarındaki karbonik anhidraz aktivitesini önemli derecede arttırmıştır, (Fariduddin ve ark., 2003). Bir başka çalışmada ise ekzogenik olarak tohum dikimine uygulandığında karbonik anhidraz aktivitesi belirgin şekilde artmıştır (Hayat ve ark., 2005). Bununla birlikte, daha yüksek SA konsantrasyonları uygulaması, söz konusu enzimin aktivitesini azaltmıştır. Benzer bir şekilde enzim aktivitesinde böyle bir düşüş, Pancheva ve arkadaşları (1996) tarafından da gözlenmiştir, burada arpadaki reaktivifribuloz-1,5-bifosfatekarboksilaz/oksijenaz (RuBPCO), artan SA konsantrasyonu ile azalmıştır (Fariduddin ve ark., 2003; Hayat ve ark.,2005).

Tohma (2007), Camarosa çilek çeşidi ile yaptığı çalışmasında, farklı yoğunluklara sahip tuz (kontrol, 2, 4 ve 6 mS cm⁻¹) uygulanan bitki türlerine farklı salisilik asit dozları (0, 0; 0,1; 0,25; 0,5 ve 1,0 mM) uygulamasının ardından oluşan fizyolojik parametreler (membran geçirgenliği, protein, klorofil ve prolin), bitki besin elementi açısından (N, P, K, Ca, Mg, Na, Cl, Fe, Cu, Mn ve Zn) ve bitki gelişimi üzerine

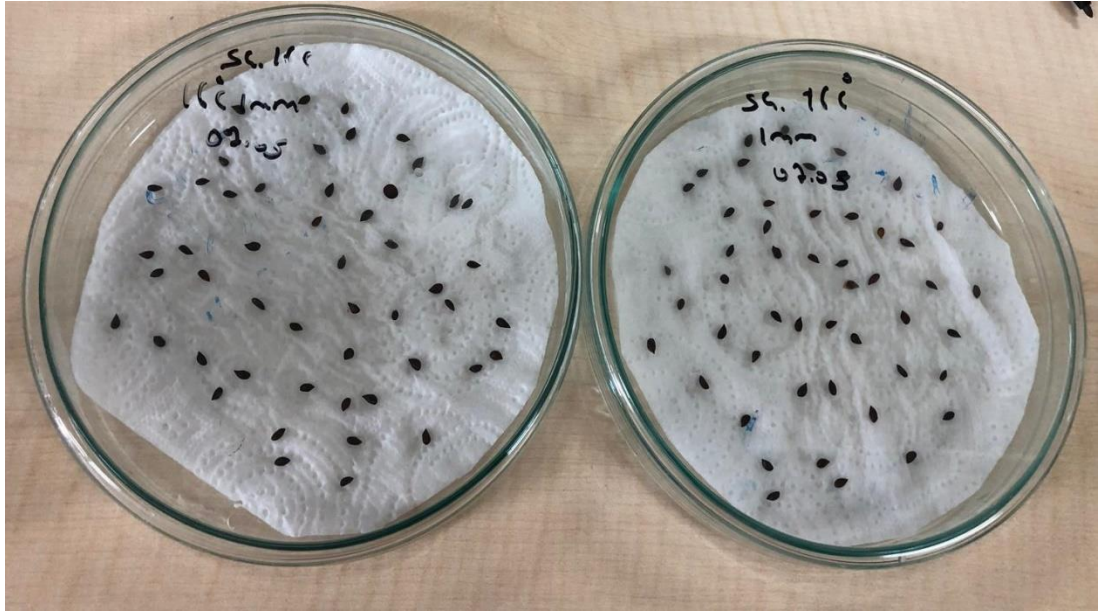
etkilerini incelemiştir. Deneyde tuzlu şartlarda salisilik asit uygulamasının membran geçirgenliğini azalttığı ve protein, prolin, klorofil b ve toplam klorofil miktarını artırdığını gözlemlemiştir. Tuzlu şartlarda yapılan salisilik asit uygulamalarının bitki türlerinin gelişmesini olumlu yönde etkilediği ve salisilik asit'in tuzun toksik etkilerinin oluşmasını geciktirdiği görülmüştür.

Hamid ve ark. (2008) kum kültürü deneyinde salisilik asidin iki buğday hattının (S24 ve İnqlab) tuzlu koşullar altında büyümesinin bazı biyokimyasal özellik ve tohum çıkışının etkileri üzerine çalışma yapmışlardır. Buğday hatlarının filiz ve kök uzunluğu, sürgün ve kök kuru ağırlığına bakılan çalışmada; tuz stresinin büyüme parametrelerini azalttığını fakat salisilik asit uygulandığında tuzluluğun buğday hatlarının gelişmesi üzerindeki olumsuz etkilerini daha da azalttığı sonucuna varılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyalinin Hazırlanması ve Deney Tasarımı

Mevcut çalışmada deney materyali olarak Sarıçam (*Pinus sylvestris* L.) tohumları kullanıldı. Trabzon-Of fidanlığında temin edilen Vakfikebir orjinli tohumlar ilgili fidanlık tarafından 2018 tarihinde toplanmıştır. Gruplara ayrılan tohumlar, ekim öncesinde ayrı ayrı olacak şekilde 1, 25, 50, 100, 500, 1000 ve 5000 μM 'lık konsantrasyonlardaki salisilik asit çözeltisi içerisinde 24 saat süreyle inkübe edildi. Kontrol grubu tohumları ise çeşme suyunda 24 saat bekletildi. İnkübasyon süresinin bitiminde, tohumlar her petriye 50'şer adet ve üç tekerrürlü olmak üzere ekildi. Sonrasında içerisine 5 ml çeşme suyu ilave edilerek, 16 °C iklimlendirme kabinde çimlenmeye bırakıldı. (Tablo 1) Tohumlar iki günde bir takip edilerek 5 ml su ilavesi yapıldı. Çimlenme çalışmalarının tamamında steril koşullar oluşturmaya özen gösterildi.



Şekil 4. Petri içerisine ekilmiş sarıçam tohumları

Tablo 1. Deney grupları

Gruplar	
Uygulama Grupları	16°C (Çimlenme Sıcaklığı)
Kontrol (Ön uygulama yok)	50 tohum
1 µM SA	50 tohum
25 µM SA	50 tohum
50 µM SA	50 tohum
100 µM SA	50 tohum
500 µM SA	50 tohum
1000 µM SA	50 tohum
5000 µM SA	50 tohum

2.2. Çimlenme ile İlgili Parametreler

Nisbi Su İçeriği (RWC)

Mevcut çalışmada soğuk stresinin çimlenen tohumlardaki su içeriğine etkisini incelemek için nisbi su içeriği (RWC) belirlendi. Bu amaçla, 16°C iklim kabinde gerçekleştirilen çimlenme sürecinin 20'nci günde örnekler RWC için hasat edildi. Çimlenmeyen tohumlar analize dahil edilmedi.



Şekil 5. Çimlenen tohum örnekleri

Her bir gruptan 0,1 gr alınan tohumların kök uzunlukları ile taze ağırlık belirlendi. Daha sonra turgorlu ağırlığını belirlemek için eşit miktarda saf suya konuldu ve 16 saat bekletildi. Saf suda bekletilen tohumlar tekrar tartılarak turgid ağırlıkları belirlendi.

Turgid ağırlıkları belirlenen tohumlar fırında 70 °C 72 saat bekletilerek tüm su içeriklerinin uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra ise tohumların kuru ağırlıkları tartıldı.

Bu veriler doğrultusunda Yaprak nisbi su içeriğini (RWC) hesaplayan formül Smart ve Bingham (1974)'e göre % olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Yaprakta Nisbi Su İçeriği (RWC) \% : [(TA-KA)/(TA-KA)] \times 100$$

2.3. Lipid Peroksidasyonu Tayini (MDA)

Sarıçam tohumlarında çimlenme sürecinde soğuk stresinin hücre zarı düzeyindeki etkilerini analiz etmek amacıyla Heath ve Packer (1968)'e göre lipidperoksidasyonu tayini yapıldı. Çimlenen tohumlardan alınan 0,1 gr doku örnekleri, sıvı azot içerisinde homojenize edildi. Sonrasında homojenize edilen örneklere 1,8 ml %0,1 trikloro asetik asit (TCA) eklenerek homojenizasyon işlemi tekrarlandı. Homojenat 10 dakika süre boyunca +4 °C ve 15,000 g'de santrifüj işlemine tabi tutuldu. Süpernatanttan 1 ml alınıp içerisine %0,5 tiobarbiturik asit içeren %20 TCA solüsyonundan 4 ml eklendi. Bu karışım vortekslendikten sonra 95°C sıcaklıkta 30 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda reaksiyonun durdurmak için örnekler hızlı bir şekilde buz banyosuna transfer edildi. Örneklerin spektrofotometre ile 532 (spesiifk) ve 600 (spesifik olmayan) nm dalga boylarında absorbanları ölçüldü. Delta absornas (spesifik–spesifik olmayan absorban) değerleri, $\Delta = \epsilon \cdot c \cdot l$ formülünde yerine konularak TBARS konsantrasyonu hesaplandı ($\Delta = A_{532} - A_{600}$, ϵ : Absorbsiyon katsayısı, 155 $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, c: konsantrasyon).

2.4. Pigment Tayini

Soğuk stresinin çimlenen sarıçam tohumlarında klorofil miktarı üzerine etkilerini araştırmak için yaygın olarak kullanılan pigment tayini yapıldı (klorofil tayini Arnon, 1949; karotenoid tayini Witham ve ark., 1971). Bu amaçla çimlenen tohumların hipokotillerinden 0,1 gr taze numune tartıldı ve sıvı azot ile homojenize edildi. Sonrasında üzerine 5 ml soğuk aseton (%80) eklendi. Homojenat 10 dakika süre ile 3,000 rpm'de ve +4 °C'de santrifüj edildi. Daha sonra homojenattan alınan süpernatant 1/5 oranında sulandırıldı ve spektrofotometre ile 450, 645 ve 663 nm dalga boylarında

absorbans değerleri ölçüldü. Ölçüm verileri aşağıdaki formülden yerlerine konularak klorofil ve karotenoid miktarları belirlendi.

$$\text{Klorofil}_a \text{ (gL}^{-1}\text{)} = 12,7 A663 - 2,69 A645$$

$$\text{Klorofil}_b \text{ (gL}^{-1}\text{)} = 22,9 A645 - 4,68 A663$$

$$\text{Toplam Klorofil (gL}^{-1}\text{)} = 20,2 A645 + 8,02 A663$$

$$\text{Toplam Karotenoid (gL}^{-1}\text{)} = 4,07 A450 - (0,0435 K1_a \text{ miktarı} + 0,3367 K1_b \text{ miktarı})$$

2.5. Kök Boyu Uzunlukları

Tohumlarının çimlenen kısımlarının boyları dijital kumpas yardımı ile 20'inci günde ölçüldü. Radikula gelişimin 2 mm altında olduğu tohumlar hesaplamaya dahil edilmedi.

2.6. Prolin

Sarıçam tohumlarının soğuk stresine karşı gösterdikleri tolerans seviyesini belirlemek için çimlenen tohumlarda prolin ölçümü yapıldı (Bates vd., 1973). Bu amaçla çimlenen tohumlardan 0,1 gr örnek alındı ve sıvı azot ile homojenize edildi. Sonrasında 1,8 ml %3 süfosalisilik asit eklendi. Örnekler 15000 g de 10 dakika ve +4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatantın 1 ml'lik kısmı alındı ve 1 ml asit ninhidrin çözeltisi eklendi. Örnekler 100 °C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında reaksiyonu durdurmak için örnekler buzlu su ortamına transfer edildi. Sonrasında örneklere 3 ml tolüen eklendi ve karışım vortekslendi. Oluşan karışımın üst fazı spektrofotometrede 520 nm dalga boyundaki absorbans değerleri cihaza girilmiş standartlara göre mgml⁻¹taze ağırlık⁻¹ olarak belirlendi.

2.7. Çimlenen Tohumlarda Toplam Protein Miktarı Tayini

Sarıçam tohumlarında toplam protein miktarı tayini Bradford (1976) yöntemine göre spektrofotometrik olarak yapıldı. Enzim aktivitesi analizlerinde kullanılmak üzere ekstrakte edilen gruplardan tekerrür başına 30 µl örnek alındı ve 170 µl distile su ile 200 µl son hacme tamamlandı. Son olarak örneklere 1000 µl protein boyası eklendi.

Önceden spektrofotometrede hazırlanmış standartlara göre spektrofotometrede 595 nm absorbans değerleri kaydedildi Protein miktarı değerleri mgml^{-1} birim üzerinden hesaplandı.

2.8. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

Süperoksit dismutaz yani SOD (EC 1.15.1.1) ölçümü, Beauchamp ve Fridovich, (1971) metodu kullanılarak ölçüldü. 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 13 mM metiyonin, 75 μM nitrobluetetrazolyum ve 50 μl ekstrakt içeren 1 ml reaksiyon ortamına 2 μM riboflavin eklenerek reaksiyon oluşturuldu ve daha sonra bu karışım 10 dakika süre 375 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ şiddetinde beyaz ışık altında bekelemesinin ardından 560 nm’de absorbans değerleri ortaya kondu.

2.9. İçsel H_2O_2 Tayini

Hidrojen Peroksit ölçümü Velikova vd., (2000) yöntemi ile gerçekleştirildi. Tohumların çimlenen kısımlarından alınan 0,25 g örneklerin 0,1 g aktif kömür ile birlikte 5 ml % 0,1 TCA çözeltisi ile homojenize edildi. Homojenat 15000 g’de +4 °C’de 15 dk süre ile santrifüj edildi. Süpernatanttan 1000 μl alınarak üzerine 1000 μl 10 mM potasyum fosfat tamponu ve 1500 μl 1 M KI ilave edildikten sonra oluşan sarı renk 390 nm’de spektrofotometredeki kayıtlı standart grafikten hesaplandı.

2.10. Guaikol Peroksidaz

Sarıçam tohumlarında soğuk stresine karşı verilen yanıtları incelemek için Guaikol peroksidaz (EC 1.11.1.7) aktivitesi belirlendi (Urbanek vd., 1991). Bu amaçla enzim aktivitesi, 50 μl enzim ekstraktının eklendiği reaksiyon ortamında (potasyum fosfat tamponu 100 mM, pH 7; EDTA 0,1 mM; guaiakol 5 mM; H_2O_2 15 mM) son hacim 1 ml olacak şekilde 470 nm dalga boyunda bir dakika süreyle ölçüldü. GPX etkinliği $\epsilon=26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ tükeniş katsayısının kullanılarak hesaplandı.

2.11. İstatistik Analizler

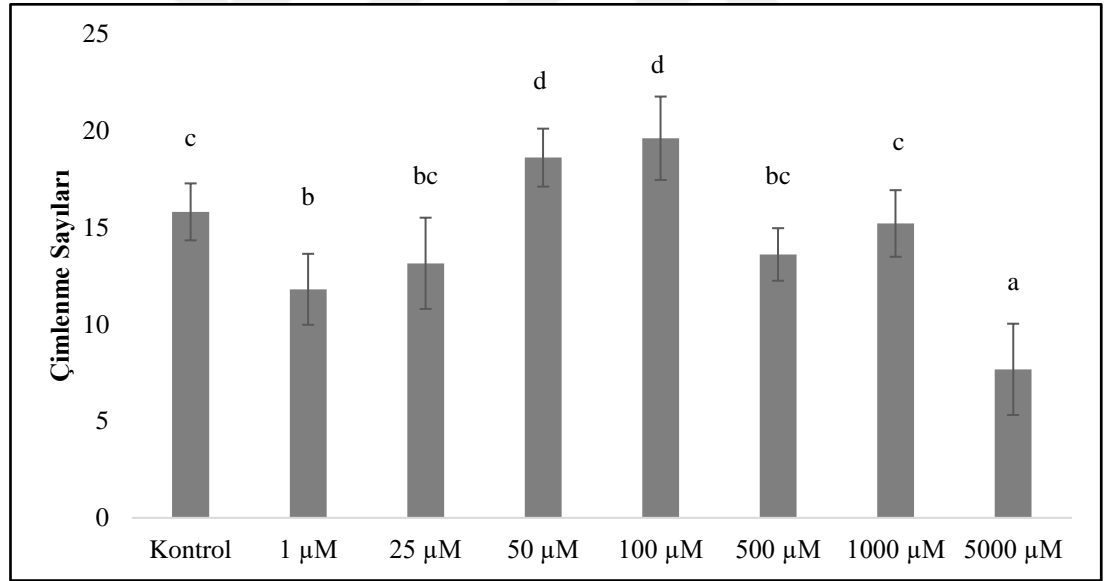
Üç tekrarlı olarak oluşturulan analizlerle belirlenen ortalamalar SPSS 22.0 paket istatistik programı ile OneWayAnova testi ve gruplar arasındaki farkı belirleyebilmek için Duncan testi kullanıldı ($p < 0.05$).



3. BULGULAR

3.1. Çimlenme Oranı

Mevcut çalışma bulgularına göre, kontrol ve uygulama gruplarında toplam çimlenme sayıları gözlemlendi (Şekil 6). Buna göre tüm gruplarda en yüksek çimlenme oranının 50 ve 100 μM salisilik asit uygulamasında olduğu tespit edildi. Sayısal olarak 100 μM uygulama grubu 50 μM uygulama grubuna göre daha yüksek bir çimlenme oranına sahip çıksa da aralarında istatistiki açıdan anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi. En düşük çimlenme sayısı ise 5000 μM grubunda olduğu görüldü. Salisilik asit ön uygulaması yapılmayan fakat kontrol grubunda ise çimlenme oranının 50 ve 100 μM uygulama gruplarına göre düşük kaldığı tespit edildi.

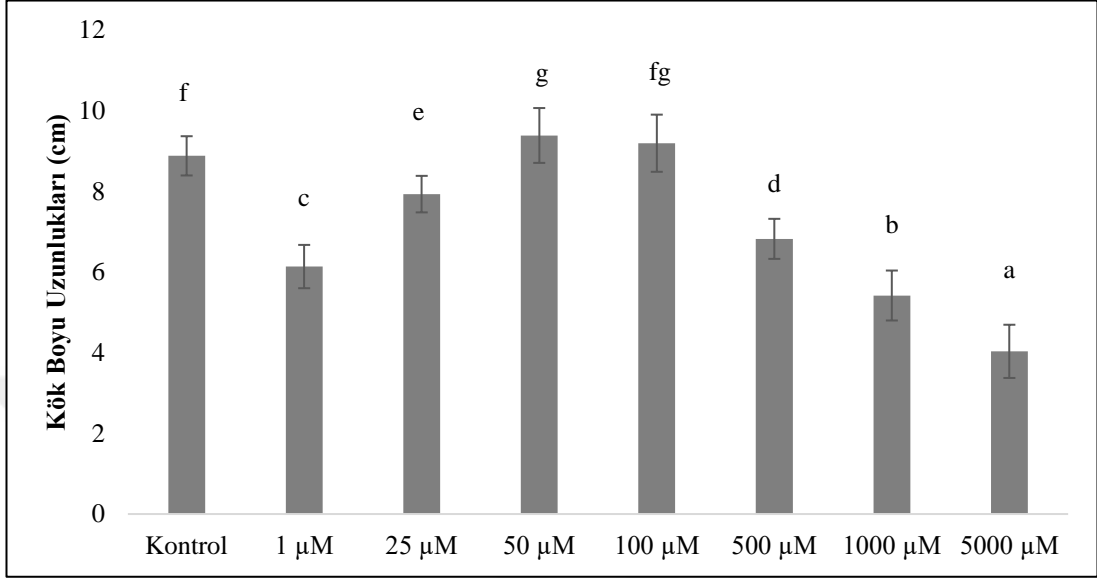


Şekil 6. Çimlenme sayıları

3.2. Kök Boyu Uzunlukları

Mevcut çalışmada kontrol ve uygulama gruplarında çimlenen tohumların ortalama kök boyları ölçüldü (Şekil 7). Buna göre kontrol, 50 ve 100 μM salisilik asit ön uygulama gruplarında kök boyu ortalamasının diğer gruplara göre daha yüksek çıktığı belirlendi. Analiz sonuçlarına daha detaylı bakıldığında ise 50 μM ön uygulama grubunun kontrol grubundan anlamlı oranda farklı ve yüksek çıktığı gözlemlendi. Ayrıca söz konusu grubun

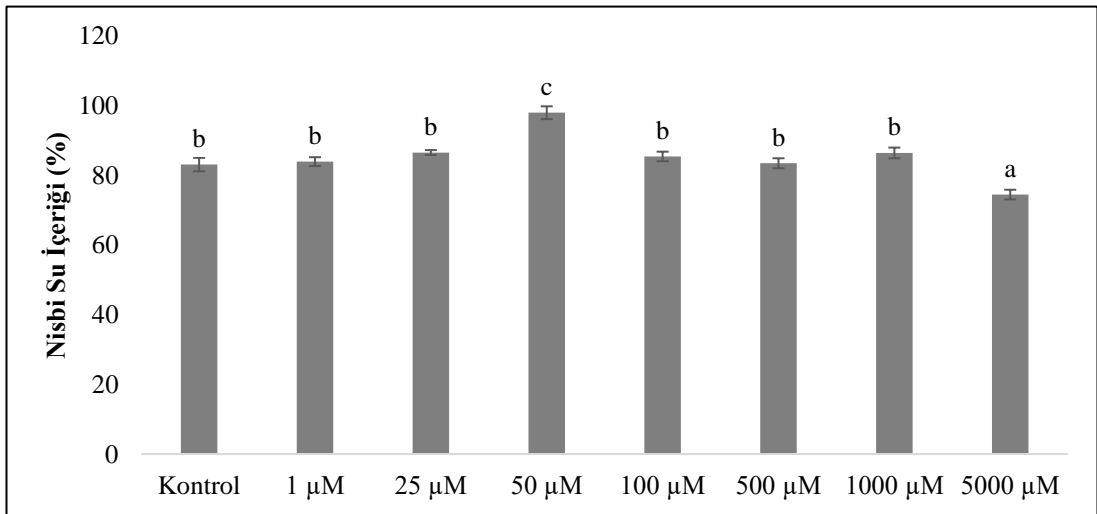
100 μM grubundan daha yüksek bir kök boyu ortalamasına sahip olmasına karşın istatisti olarak iç içe bir değer sergilediği tespit edildi. Ek olarak en düşük kök boyu ortalamasına ise 5000 μM salisilik asit ön uygulama grubunda rastlandı.



Şekil 7. Kök boyu uzunlukları

3.3. Nisbi Su İçeriği

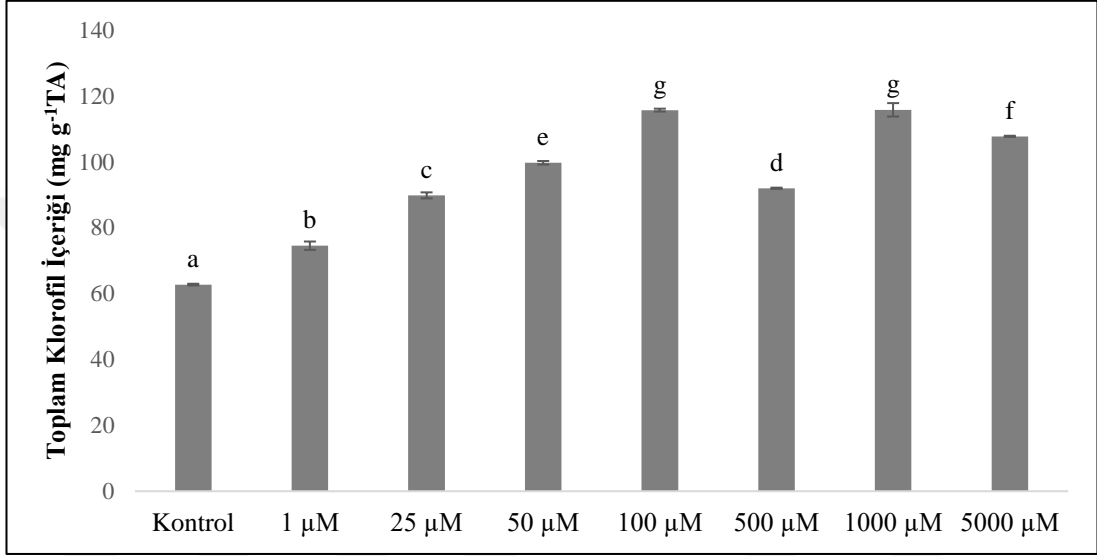
Mevcut çalışmada çimlenen tohumlarda nisbi su içeriği (RWC) analizi gerçekleştirildi ve sonuçlar şekil 8’de sunuldu. Buna göre soğuk stresi koşullarında 50 μM salisilik asit ön uygulamasında en fazla su içeriği gözlemlendi. Bununla beraber en düşük su içeriğinin 5000 μM salisilik asit uygulamasında olduğu belirlendi.



Şekil 8. Nisbi su içeriği

3.4. Toplam Klorofil İçeriği

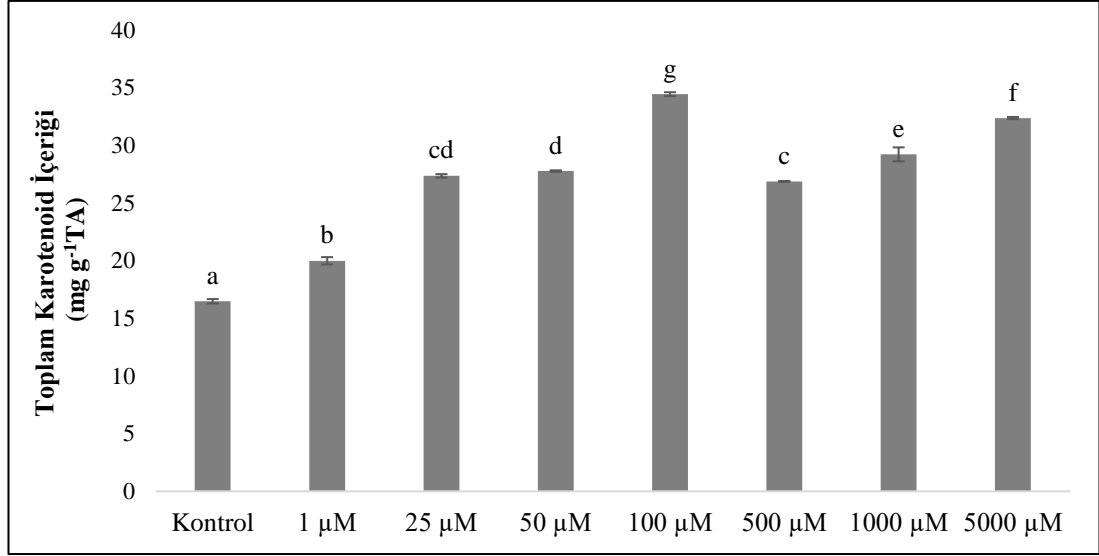
Mevcut çalışma bulgularına göre kontrol ve uygulama gruplarında çimlenen tohumların hipokotillerinde toplam klorofil içeriği belirlendi. Buna göre en yüksek klorofil içeriği 100, 1000 μM salisilik asit ön uygulama gruplarında görüldü. Buna karşın en düşük klorofil içeriği, salisilik asit ön uygulaması yapılmayan kontrol grubunda görüldü (Şekil 9).



Şekil 9. Toplam klorofil içeriği

3.5. Toplam Karotenoid İçeriği

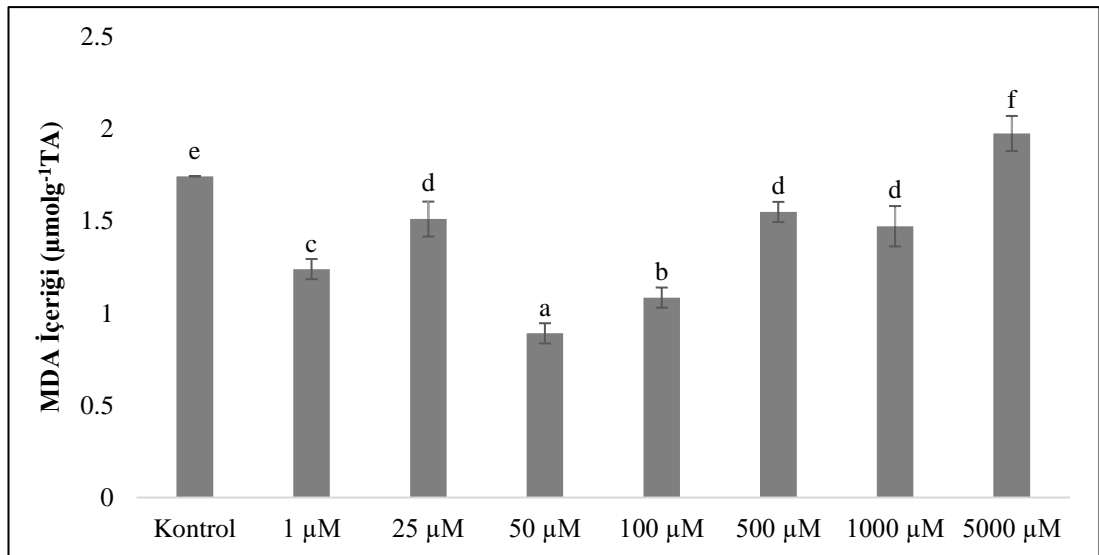
Mevcut çalışmada kontrol ve uygulama gruplarında çimlenen tohum hipokotillerinde toplam karotenoid içeriği belirlendi. Analiz sonuçlarına bakıldığında en yüksek karotenoid içeriğine 100 μM salisilik asit ön uygulamasında rastlandı. Bununla beraber en düşük karotenoid içeriğinin ise kontrol grubunda olduğu gözlemlendi (Şekil 10).



Şekil 10. Toplam karotenoid içeriği

3.6. Lipid Peroksidasyonu (MDA)

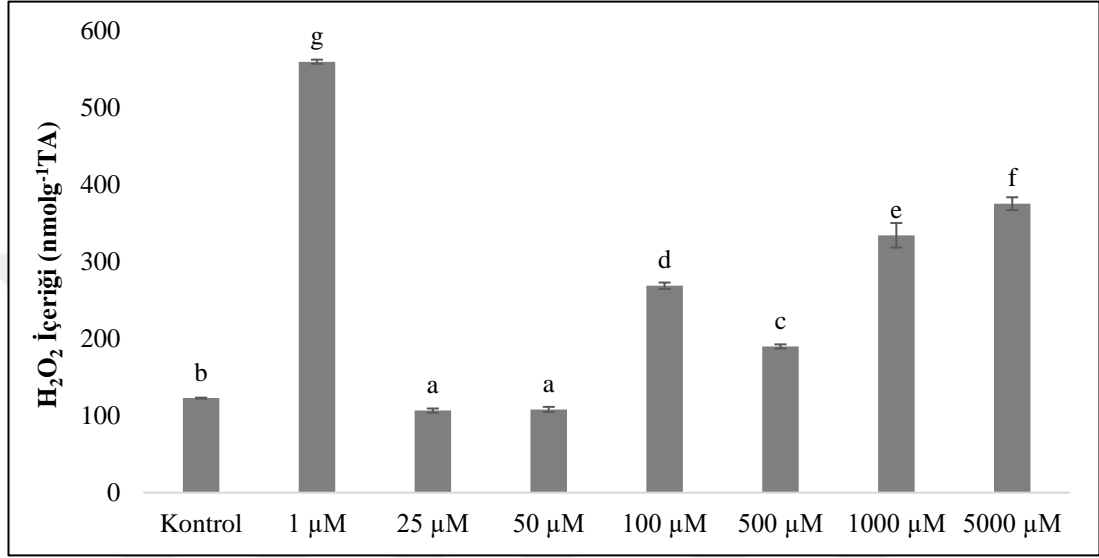
Çalışma bulgularına bakıldığında hücre zarındaki oksidatif hasar nedeniyle oluşan lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA seviyelerinin en düşük olarak 50 ve 100 µM salisilik asit ön uygulamalarında oluştuğu gözlemlendi. Bununla beraber en yüksek lipid peroksidasyonun yani hücre zarı hasarının kontrol grubu ve 5000 µM salisilik asit ön uygulama grubunda olduğu gözlemlendi (Şekil 11).



Şekil 11. MDA içeriği

3.7. İçsel H₂O₂ Tayini

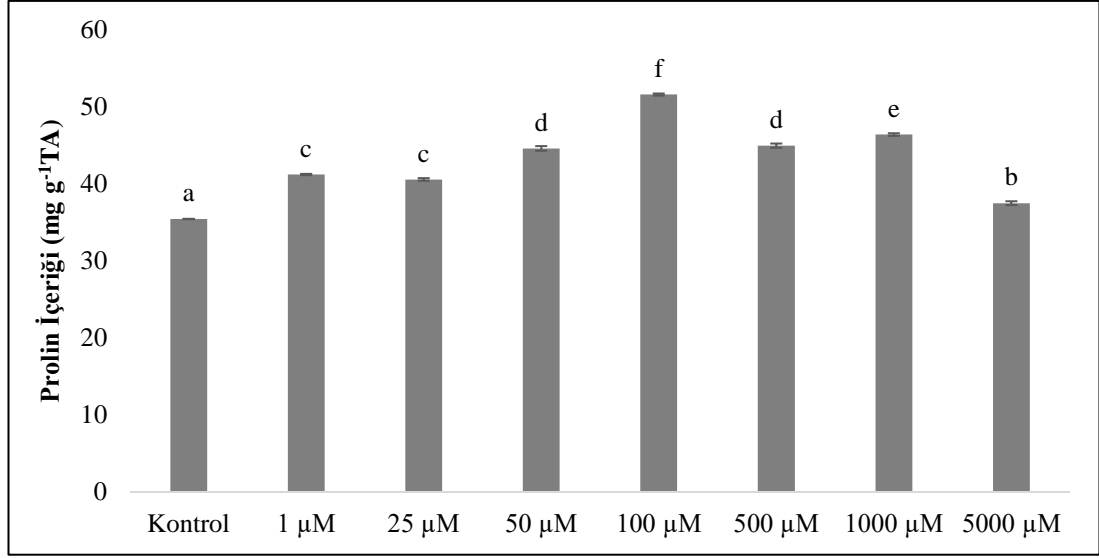
Çalışmanın bu aşamasında deney gruplarında H₂O₂ içeriği ölçüldü. Gruplar arasında en yüksek içeriğin 1 µM salisilik asit ön uygulamasında olduğu belirlendi. Bununla beraber en düşük H₂O₂ içeriğine aralarında istatistiki bir fark olmayan ise 25 ve 50 µM gruplarında rastlandı (Şekil 12).



Şekil 12. Hidrojen peroksit içeriği

3.8. Prolin İçeriği

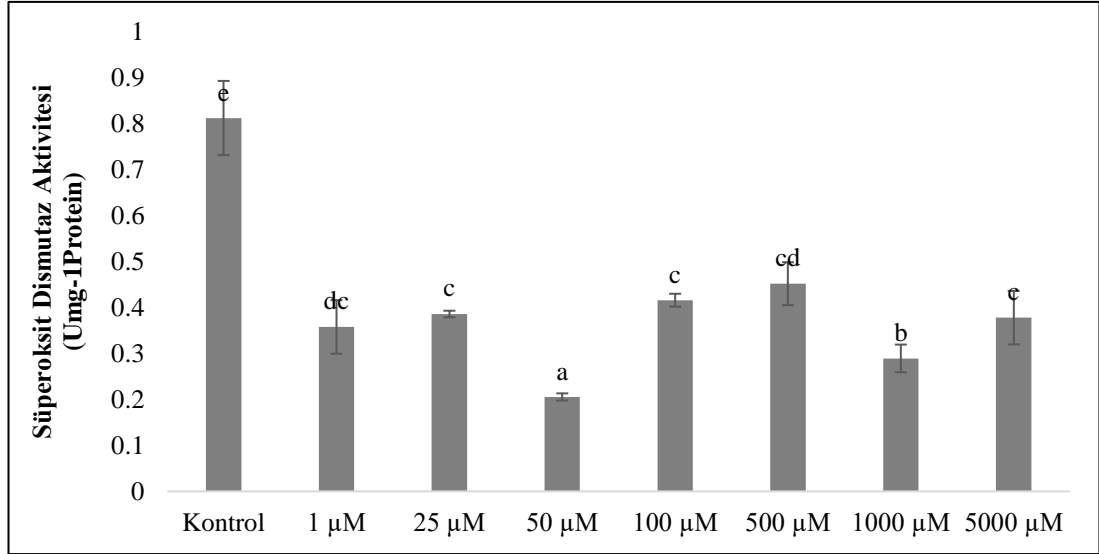
Mevcut çalışma bulgularına bakıldığında kontrol ve salisilik asit ön uygulama gruplarında içsel prolin en yüksek olduğu grup ise 100 µM salisilik asit ön uygulama grubu olduğu belirlendi. Ek olarak 50 µM grubu ise prolin içeriği açısından mevcut analizin en yüksek ikinci grubu oldu. En düşük prolin içeriği ise kontrol grubunda belirlendi (Şekil 13).



Şekil 13. Prolin içeriği

3.9. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

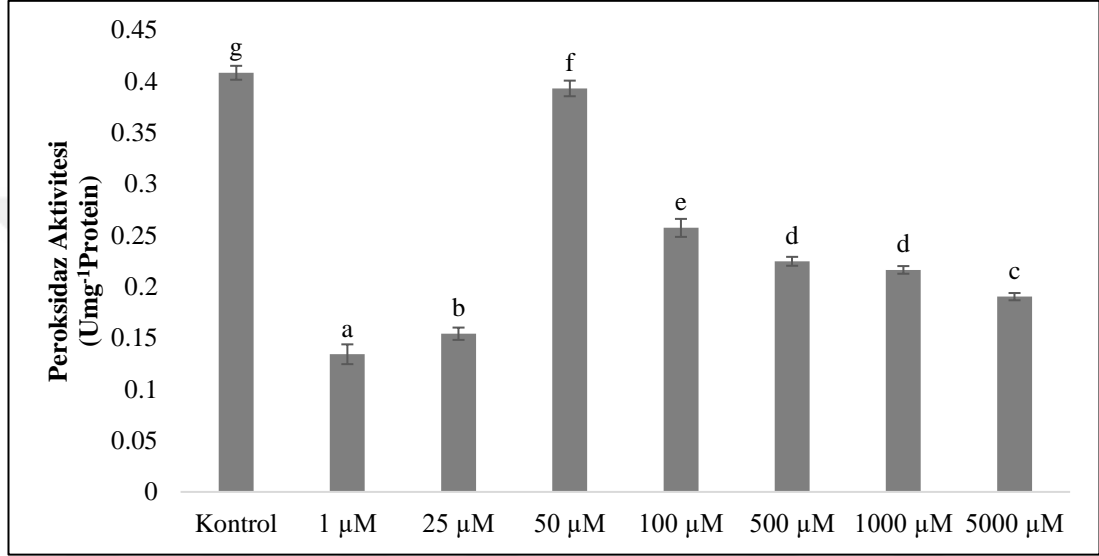
Çalışmanın bu aşamasında deney gruplarında süperoksit dismutaz aktivitesi ölçüldü. Sonuçlara bakıldığında kontrol grubundaki SOD aktivitesi diğer gruplara kıyasla daha yüksek çıktı. Analizdeki en düşük aktivite ise 50 µM deney gruplarında gözlemlendi (Şekil 14).



Şekil 14. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi

3.10. Guaikol Peroksidaz (GPX)

Çalışmanın bu aşamasında deney gruplarında guaikol peroksidaz aktivitesi ölçüldü. Gruplar arasında en yüksek aktivitenin salisilik asit uygulanmayan kontrol grubunda olduğu görülürken 1 μ M da peroksidaz aktivitesinin en az olduğu görüldü. Çalışma bulgularına göre ikinci en yüksek GPX aktivitesi 50 μ M salisilik asit ön uygulama grubunda olduğu tespit edildi (Şekil 15).



Şekil 15. Guaikol peroksidaz enzim aktivitesi

4. TARTIŞMA

Mevcut çalışmada düşük sıcaklık koşullarının sarıçam tohumlarında çimlenme üzerine etkileri ve dışarıdan uygulanan salisilik asitin soğuk stresine karşı tolerans artırıcı rolü araştırıldı. Bu amaç doğrultusunda söz konusu tohumlar laboratuvar ortamında iklimlendirilmiş kabinde çimlendirildi. Elde edilen örneklerde; çimlenme oranı, kök boyu uzunlukları, toplam klorofil miktarı, toplam karotenoid miktarı, lipit peroksidasyonu, prolin içeriği, hidrojen peroksit içeriği, süperoksit dismutaz ve guaikol peroksidaz gibi antioksidan enzim aktivitesi analizleri yapılarak salisilik asitin iyileştirici etkileri gözlemlendi.

Mevcut çalışmada soğuk stresinin sarıçam tohumlarında çimlenme üzerine etkileri ve salisilik asit ön uygulamasının soğuk stresine karşı iyileştirici etkileri araştırıldı. Bu amaçla salisilik asit ön uygulaması yapılmış sarıçam tohumları 16 °C'lik soğuk stresi koşullarında çimlendirildi. Çimlenme sonrasında ise ilk ölçülen parametreler çimlenen tohum sayısının belirlenmesi ve çimlenen tohumlardaki kök gelişimin ölçülmesi oldu. Bu parametreler ışığında soğuk stresi koşullarında 50 ve 100 µM salisilik asit ön uygulamasının çimlenme sayısını ve kök uzamasını diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlendi. Bu artışın herhangi bir salilik asit konsantrasyonu uygulanmamış kontrol grubuna göre fazla olması, salisilik asitin tohum çimlenmesini soğuk stresi koşullarında arttırdığını göstermektedir. Sarıçam tohumlarının soğuk stresi koşullarında çimlenmesi üzerine haricen salisilik asit uygulaması ile ilgili bir literatür çalışmasına rastlanılmamış olması; mevcut çalışmanın önemini göstermektedir.

Literatürde dışarıdan uygulanan salisilik asitin birçok stres faktörüne karşı koruyucu etkiler gösterdiğini belirten çalışmalar mevcuttur. Örneğin Senaratna ve ark., (2000) tarafından yapılmış bir çalışmada bitkilere dışarıdan 0; 0,05; 0,1; 0,5 ve 1 mM konsantrasyonlarda asetil salisilik asit (aspirin) ve salisilik asit uygulanmış ve sonuç olarak salisilik asitin düşük sıcaklık (3 °C) stresine karşı tolerans artışı tespit edilmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında etkin konsantrasyonların 100 µM ve 500 µM olduğunu kaydetmişlerdir. Ayrıca mısır fidesi yapraklarına dışarıdan uygulanan 500 µM salisilik

asitin fideleri soğuk stresine (5 °C) karşı koruduğunu belirtmişlerdir (Szalai ve ark., 2000). Korkmaz (2005) salisilik asitin biber tohumlarının düşük sıcaklıktaki (15 °C) çimlenme dereceleri üzerine etkisini incelediği bir çalışmada, priming ortamına ilave edilen 0,1 mM salisilik asit uygulanan tohumların %91 çimlenme oranına sahip olduğunu salisilik asit uygulanmayan kontrol tohumlarının ise çimlenme oranlarının %44 düzeylerinde kaldığını bildirmiştir. Literatür bilgilerini destekler biçimde mevcut çalışmada da salisilik asitin belirli konsantrasyonlarda uygulanması durumunda, düşük sıcaklık koşullarında (16 °C) sarıçam tohum çimlenmesini ve çimlenen tohumlarda kök boylarını arttırdığı tespit edildi. Mevcut çalışmanın bulgularına göre etkin salisilik asit konsantrasyonlarının 50 ve 100 µM olduğunu söylemek mümkündür.

Bitki su durumu genel olarak iyi bir stres belirteci olarak kabul edilir ve bitkilerde birden fazla yöntemlerle belirlenir. Nisbi su içeriği (RWC) genel olarak iyi sonuç verebilen ve düşük maliyetli bir çözümdür. Mevcut çalışmada soğuk stresi koşullarında sarıçam tohumları çimlenirken bitki su durumları RWC yöntemi ile belirlendi. Bulgular incelendiğinde en yüksek su içeriğinin 50 µM salisilik asit uygulamasında bulunduğu tespit edildi. Çimlenme sayıları ve kök boyu uzunluklarının 50 ve 100 µM salisilik asit uygulamasında en yüksek seviyede olduğu dikkate alındığında, RWC seviyesinin de bu 50 µM konsantrasyon uygulamasında yüksek çıkması bulguların korelasyon içinde olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda RWC hesaplanmasını bitkideki kuru madde miktarında doğrudan etkilediği düşünülürse 50 µM salisilik asit uygulamasının soğuk stresi koşullarında sarıçam tohum çimlenmesini teşvik ettiği, kuru madde miktarını arttırdığını ve böyle koruyucu etki gösterdiğini söylemek mümkün olabilir.

Bitkilerde klorofil ve karotenoid içeriği maruz kalınan stresin çeşidine ve şiddetine bağlı olarak azalmalar göstermektedir. Bu nedenle mevcut çalışmada soğuk stresi koşullarında çimlenen sarıçam tohumlarında toplam klorofil içeriği belirlendi. Çalışma bulguları incelendiğinde en yüksek klorofil ve karotenoid içeriğine 100 µM salisilik asit uygulamasında rastlandı. Çalışma bulgularını destekler nitelikte; Uzunlu (2006) çalışmasında, kuraklık, üşüme ve tuz streslerine maruz bıraktığı kavun fidelerine, tohumdan ve yapraktan uyguladığı 0; 100; 250; 500 ve 1000 µM aspirinin (asetil salisilik asit) etkilerini incelemiştir. Aspirin uygulanmış bitkilerin kontrol bitkilerine göre daha düşük görsel hasar içerdiği ve daha yüksek klorofil, stoma iletkenliği, yaprak

ve kök yaş ve kuru ağırlık ve karbonhidrat içeriğine sahip olduğunu bildirmiştir. Aspirin konsantrasyonları arasında ise 250 ve 500 μM konsantrasyonlarının en iyi sonucu verdiği ve kullanılan en yüksek aspirin konsantrasyonu olan 1000 μM SA'in ise stres faktörlerine karşı toleransı arttırmada daha düşük konsantrasyonlara kıyasla daha az etkili olduğunu belirtmiştir. Sonuç olarak aspirin uygulamasının kavun fidelerinde uygulanan stres faktörlerine karşı toleransı arttırdığını deklare etmiştir.

MDA lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve iyi bir oksidatif hasar belirtecidir (Kaya ve İnan, 2017). Oksidatif hasar ise hemen hemen tüm stres çeşitlerinin sonunda meydana gelir ve bitkinin strese maruz kaldığını gösteren önemli bir parametre olarak kabul edilir. Bu nedenle mevcut çalışmada soğuk stresi koşullarında çimlendirilmiş tohumlarda MDA seviyeleri belirlendi. Buna göre bulgular incelendiğinde, 50 ve 100 μM salisilik asit uygulamasının tohumlardaki MDA seviyesini diğer gruplara göre daha düşük bir seviyeye indirdiği görüldü. Buna karşın kontrol grubunda ise daha düşük bir MDA seviyesinin oluştuğu da gözlemlendi. Bu durumun salisilik asitin belirli bir oranda kontrol grubuna göre MDA seviyesini arttırdığını, buna karşın çalışmanın geneline bakıldığında ise soğuk stresine karşı koruyucu bir yanıt oluşturduğu söylemek mümkündür.

Hidrojen peroksit, bitkilerin çeşitli stres koşullarına (kuraklık, üşüme, yüksek sıcaklık ve ışık gibi) maruz kaldıklarında fazlaca üretilen reaktif oksijen türlerinden (ROS) birisidir (Das ve Roychoudhury, 2014). Bu nedenle mevcut çalışmada soğuk stresi koşullarında çimlendirilen sarıçam tohumlarında salisilik asitin iyileştirici etkisinin olup olmadığını anlamak için hidrojen peroksit içeriğine bakıldı. Bulgular incelendiğinde 50 μM salisilik asit uygulamasında en düşük hidrojen peroksit içeriği tespit edildi. Önceki analiz sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde 50 μM salisilik asit uygulamasının soğuk stresinin olası hasarlarına karşı koruyucu etki gösterdiği ve bu nedenle hem çimlenme sayısını hem de kök boyu uzunluklarını arttırdığını söylemek mümkündür. Dahası diğer bir stres indikatörü olan MDA seviyelerinin de 50 μM salisilik asit uygulamasında düşük seviyelerde seyretmesi, düşük oranda üretilen hidrojen peroksidin hücre zarı hasarının düşük tuttuğunu göstermektedir. Bu da 50 μM salisilik asit uygulamasının soğuk stresine karşı iyileştirici-koruyucu etki gösterdiğini belirtmektedir. Diğer yandan, reaktif oksijen türleri bitkilerde büyüme ve gelişmenin kontrolü, biyotik ve abiyotik stres etkenlerine karşı yanıt oluşturma ve

programlanmış hücre ölümü gibi süreçlerde sinyal molekülü olarak da görev yapar (Bailey-Serres ve Mittler 2006; Waszczak ve ark., 2018).

Yapılan çalışmalar bitkilerde prolinin strese direnç gelişiminde rol oynadığını ve birçok stres koşullarında biriktiğini bildirmektedir (Parvanova ve ark. 2004; Demiral ve Turkan 2005; Awasthi ve ark. 2015). Bu bilgileri destekler şekilde mevcut çalışmada soğuk stresine koşullarında çimlenen sarıçam tohumlarında en fazla prolin içeriğinin 100 μ M salisilik asit uygulamasında olduğu belirlendi. Dahası mevcut çalışma bulguları 50 ve 100 μ M salisilik asit uygulamalarının sarıçam tohumlarında soğuk stresine karşı toleransı arttırdığını göstermektedir. Prolin içeriğinin bu uygulamalarda yüksek çıkması ve yine MDA seviyelerinin de düşük çıkması önerilen konsantrasyonların soğuk stresine karşı tolerans artırıcı bir etki yaptığını göstermektedir. Kendisi de hem osmolit hem de antioksidan olan ve özellikle 50 μ M salisilik asit konsantrasyonu uygulamasında hücrede oluşan hidrojen peroksidin temizlenmesine katkıda bulunduğunu söylemek mümkündür. Çalışma bulgularını destekler biçimde birçok araştırmada strese karşı toleranslı çeşitlerdeki prolin içeriğinin duyarlı olan çeşitlere göre daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Ashraf, 2007). Bu durum önerilen hipotezi birçok açıdan desteklemektedir.

Salisilik asitin antioksidan sistem etkinliği üzerindeki teşvik edici birçok araştırmada gösterilmiştir. Mevcut çalışmada da soğuk stresi koşullarında çimlenen tohumlara çeşitli konsantrasyonlarda salisilik asit uygulaması yapılmış ve örneklerden süperoksit dismutaz (SOD) ve guaikol peroksidaz (GPX) enzimlerinin aktivitesine bakılmıştır. Çalışmada ilginç bir şekilde her iki antioksidan enzim etkinliğide en fazla olarak kontrol grubunda görüldü. Genel olarak literatür bilgisi stres koşullarında antioksidan enzim aktivitelerinde artışlar meydana geldiğinden bahsetmektedir (Bowler ve ark., 1992; Fu ve Huang, 2001; Zhao ve ark., 2010). Salisilik asitin donma stresine karşı etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, kışlık buğday yapraklarında donma koşullarında yüksek miktarda salisilik asit tespit edilmiştir (Taşgın ve ark., 2003). Aynı çalışmada yapraklara dışarıdan uygulanan 100 μ M salisilik asitin donmaya karşı toleransın arttırdığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar söz konusu tolerans artışını antioksidan enzim etkinliğindeki artışa bağlamışlardır. Mevcut çalışmada SOD ve GPX enzim aktivitelerinin kontrol grubunda en yüksek çıkmasının nedeni, mevcut çalışmada iyileştirici konsantrasyon olarak önerilen konsantrasyonların (50 ve 100 μ M) bitkide

koruyucu-iyileştirici bir etki gösterdiği ve bu nedenle başta hidrojen peroksit olmak üzere reaktif oksijen türleri temizlemesi olabilir. Çalışmada hem hidrojen peroksit hem de MDA seviyelerinin söz konusu bu konsantrasyonlarda düşük çıkması buna bir kanıt olabilir. Dahası aynı konsantrasyonlarda prolin seviyesinin de yüksek olması reaktif oksijen türlerinin temizlenmesine ve dolayısıyla soğuk stresinin olumsuz etkilerinin azalmasına neden olmuş olabilir. Literatür bilgileri hem prolinin hem de salisilik asidin aynı zamanda antioksidan bileşikler olduğunu da bildirmektedir. Bu nedenle hücrede stres kaynaklı biriken reaktif oksijen türlerinin hem salisilik asit hem de prolin tarafından temizlendiğini söylemek kuvvetle muhtemeldir.

Salisilik asitin bitkilerde yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, su eksikliği gibi birçok çevresel stres etkenine karşı tolerans artırıcı etkilerinin olduğu bilinmektedir (Bergmann vd., 1994; Senaratna ve ark., 2000). Bu çalışma bir antioksidan molekül olan salisilik asidin soğuk stresi koşullarında tohum çimlenmesi üzerine olan etkileri araştırmaya odaklanmıştır. Bu amaçla sarıçam tohumlarına çeşitli konsantrasyonlarda ön uygulamalar şeklinde salisilik tatbik edildi. Çalışma sonuçları analiz edildiğinde ve uygulama grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, salisilik asidin sadece belirli konsantrasyonlarda etkili olduğu ortaya çıktı. Bu değerler çalışma bulgularına göre 50 ve 100 μM olarak kabul edildi. Bu değerlerin dışında kalan konsantrasyonlar genellikle ya etkisiz ya da toksik etki olarak değerlendirildi. Mevcut çalışmayı destekler şekilde; Çanakçı ve Munzuroğlu (2007) kontrollü şartlarda yetiştirilen 3 günlük mısır fidelerinde farklı konsantrasyonlardaki (0, 20, 200 ve 2000 ppm) asetil salisilik asitin (ASA) taze ağırlık değişimi, pigment ve protein miktarı üzerine etkilerini araştırmaya koymuşlardır. ASA'in çözeltileri fidelerin köklerine dört gün süreyle kapalı bir sistem yoluyla uygulanmaya başlanmıştır. 20 ppm ASA'in fidelerin taze ağırlık artışını, pigment ve protein miktarını etkilemediği, 200 ve 2000 ppm ASA uygulamasının fidelerde taze ağırlık artışını engellediğini, ayrıca bu iki konsantrasyonun fidelerin klorofil a, klorofil b, total klorofil ve protein miktarlarını önemli oranlarda azalttığı fakat karotenoid miktarını etkilemediği çalışmalar sonucunda görülmüştür. ASA'in yüksek konsantrasyonlarının mısır fidelerinde osmotik ve toksik stres yaratarak taze ağırlık artışını engellediği, pigment ve protein miktarını azalttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Özetle çalışma bulgularının tamamına bakıldığında soğuk stresi koşullarında çimlenen sarıçam tohumları üzerinde optimum koruyucu-iyileştirici etki gösteren salisilik asit konsantrasyonunun 50 ve 100 μ M olduğunu önermek mümkündür. İlerleyen aşamalarda bu çalışma verileri kullanılarak yeni önermeler geliştirilebilir.



5. SONUÇ

Yapılan deneyler sonucunda;

1. Soğuk stresi koşullarında çimlendirilen sarıçam tohumlarında en fazla çimlenen tohum sayısı 50 ve 100 μM uygulamalarında gerçekleşmiştir.
2. Çalışmada çimlenen tohumların kök boyu uzunlukları ölçüldüğünde çimlenme sayısı ile paralel bir biçimde 50 ve 100 μM salisilik asit uygulamalarının diğer gruplara göre kök boyu uzunluğunu anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir.
3. Çalışmada gerçekleştirilen nisbi su içeriği analizine göre 50 μM salisilik asit uygulaması bitki su durumunun korunmasına yardımcı olmuş ve daha yüksek su tutmasını sağlamıştır.
4. Toplam klorofil ve karotenoid içeriği açısından 100 μM salisilik asit uygulama grubu diğer gruplara göre daha yüksek bir pigment içeriğine sahiptir.
5. Çalışmada, doğrudan hücre zarındaki stres kaynaklı hasarı gösteren lipid peroksidasyonu analiz sonuçlarına göre en düşük MDA içeriği 50 ve 100 μM uygulama gruplarında tespit edilmiştir.
6. Çalışmada bir diğer önemli stres belirteci olan hidrojen peroksit içeriği de tespit edilmiştir. Buna göre en düşük hidrojen peroksit düzeyine 50 μM salisilik asit uygulama grubunda rastlanmıştır.
7. Çalışmada gerçekleştirilen prolin analizine göre en yüksek prolin içeriğine 100 μM salisilik asit grubunda rastlandı.
8. Çalışmada yaygın antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD) ve guaikol peroksidaz (GPX) enzim aktiviteleri belirlendi. Buna göre en yüksek SOD ve GPX aktivitelerine kontrol grubunda rastlandı.

6. ÖNERİLER

Bitki türleri düşük sıcaklıklarla karşılaştıkları zaman hayatlarını devam ettirebilmeleri için birçok adaptasyon (uyum) mekanizmaları geliştirirler. Bu durumda düşük sıcaklıklara karşı tolerans sağlarlar ya da sakınma mekanizması kullanarak kendilerini korurlar ve hayatlarını devam ettirirler. Bu tolerans kazanma ve stresli koşullarla başa çıkma durumu sadece bitkiler için değil tüm canlılar için de önemlidir. Çünkü gezegendeki tüm canlı yaşamı doğrudan ya da dolaylı olarak bitkilere bağlıdır. Bu durum ekonomik bitkiler için daha önemlidir. İnsanlığın devam edebilmesi için bitki yaşamının da devam etmesi gereklidir. Küresel iklim değişikliğinin hızlandığı ve iklimsel belirsizliklerin yavaş yavaş ortaya çıkmaya başladığı günümüzde bitkilerin stresle başa çıkma mekanizmalarının aydınlatılması daha da önem kazanmıştır. Ülkemiz de küresel iklim değişikliğinden önemli derecede etkilenecek kuşaktadır ve bu değişiklikler arasında soğuk stresi önemli bir yer teşkil etmektedir. Anlık gelen ve ön görülemeyen don ya da üşüme olaylarında bitkilerin çimlenme cevaplarının iyi aydınlatılması ve geliştirilmesi gerekmektedir.

Mevcut çalışmada ülkemiz ormanlarının önemli bir kısmını oluşturan sarıçam tohumları kullanılmıştır. Tohumlar salisilik asit ön uygulamasına tabi tutulmuş ve soğuk koşullarda çimlendirilmiştir. Çimlenme parametreleri ve diğer stres parametreleri, salisilik asitin belirli konsantrasyonlarda ciddi şekilde iyileştirici etkiler yaptığını göstermiştir. Yapılan analizler büyüme, fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ortaya çıkan sonuçlar çalışmanın daha ileriye taşınması gerekliliğini göstermektedir. Özellikle salisilik asitin soğuk stresine karşı teşvik ettiği mekanizmaların aydınlatılması için moleküler ve proteomik yaklaşımlara ihtiyaç duyulabilir. Bu nedenle söz konusu bu çalışma bir TÜBİTAK projesi ile daha ileri bir seviyeye taşınmalı ve ortaya çıkan bilgiler bilim dünyasına kazandırılmalıdır. Bu sayede elde edilen veriler ile özellikle ekonomik bitkilerde soğuk stresine karşı başarı arttırılabilir ve olası ürün kayıplarının önüne geçilebilir.

KAYNAKLAR

- AbdElgawad, H., Zinta G, Hegab MM., 2016. High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs. *Frontiers in Plant Science*, 7, 276.
- Agarwal, P. K., Agarwal, P., Sudhir, M. K. R. ve Sopory, K., 2006. Role of DREB Transcription Factors in Abiotic and Biotic Stress Tolerance in Plants, *Plant Cell Reports*, 25, 1263-1274.
- Akkemik, Ü., 2014. "Türkiye'nin Doğal-Ekzotik Ağaç ve Çalıkları-I (Gymnospermler-Angiospermler) (A-G)". Orman Genel Müdürlüğü Yayını, Yapım: CTA Ltd. s.736.
- Aksoy, C., 1994. Sarıçam El Kitabı, Sarıçamın Ekolojisi, Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayını, Muhtelif yayınlar serisi: 67, Ankara, 39-67 s.
- Ansari, S. M. ve Misra, N., 2007. Miraculous role of salicylic acid in plant and animal system, *American Journal of Plant Physiology*, 2, 51-58.
- Arnon, D.I., 1949. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts, Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiology*, 24, 1-15.
- Ashraf, M. ve Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance, *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206-216.
- Atalay, İ. Ve Efe, R., 2012. Ecology of Scots pine (*Pinus sylvestris* var. *syvestris*) Ormanlarının Ekolojisi ve Tohum Nakli Açısından Bölgelere Ayrılması, Orman ağaçları ve tohumları ıslah araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Çeşitli Yayınlar serisi No: 5, Ankara, 320 s.
- Awasthi, R., Bhandari K, Nayyar H., 2015. Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. *Front Environ Sci*.
- Bailey-Serres, J., Mittler, R., 2006. The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol*. 141, 311
- Bakht, J., Bano, A. ve Dominy, P., 2006. The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (*Cicer arietinum*) cold tolerance. II. Effects on plasma membrane structure and function, *Journal of Experimental Botany*, 57: 3707-3715.
- Barkosky, R. R. ve Einhellig, F. A., 1993. Effects of Salicylic Acid on Plant Water Relationship, *Journal of Chemical Ecology*, 19(2): 237-247.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. ve Teare, I. D., 1973. Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies, *Plant and Soil*, 39: 205-207.

- Beauchamp, C. ve Fridovich, I., 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and An Assay Applicable to Acrylamide Gels, *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.
- Bergmann, H. L. V., Maachelett, B. ve Geibel, M., 1994. Increase of stress resistance in crop plants by using phenolic compounds, *Acta Horticulture*, 381: 390-397.
- Bertamini, M., Zulini, L., Muthuchelian, K. ve Nedunchezian, N., 2007. Low night temperature effects on photosynthetic performance on two grapevine genotypes, *Biologia Plantarum*, 51: 381-385.
- Bidwell, R. G. S., 1974. *Plant Physiology*, Giles, McMillan Co., New York.
- Boratynski, A., 1991. Range and natural distribution, In: Giertych, M., Matyas, C. (eds), *Genetics of Scots pine*, Elsevier, Amsterdam, 19-30.
- Bowler, C., Van Maontague, M. ve Inze, D., 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43, 83-116.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J. ve Weretilnyk, E., 2000. *Responses to a biotic stresses*. Biochemistry and Molecular Biology of Plants, In: Gruissem W., Buchanan B., Jones R. (ed.), American Society of Plant Biologists, Rockville, 158-1249.
- Brummelkamp, T. R., Nijman, S. M. B., Dirac, A. M. G. ve Bernards, R., 2003. Loss of the cylindromatosis tumor suppressor inhibits apoptosis by activating NF – kB, *Nature*, 424: 797–801.
- Carlisle, A., Brown, A. H. F., 1968. *Pinus sylvestris*, *Journal of Ecology* 56, 269-307.
- Castro, J., Zamora, R., Hódar, J. A., Gómez, J. M., 2004. Seedling establishment of a boreal tree species (*Pinus sylvestris*) at its southern most distribution limit : consequences of being in a marginal Mediterranean habitat, *Journal of Ecology* 92, 266-277.
- Creg, B. M. ve Zhang, J. W., 2001. Physiology and Morphology of *Pinus sylvestris* Seedlings from Diverse Sources Under Cyclic drought Stress, *Forest Ecology and Management*, 154: 131-139.
- Cristea, M., ve Drochioue, G., 1987. Possibilities to Stimulate Germination of Thermally Treated Wheat and Maize Seeds, *Cercetari agronomice in Moldova (Romania)*, 4: 49-55.
- Çanakçı, S. ve Munzuroğlu, Ö., 2007. Asetilsalisilikasitin mısır (*Zea mays* L.) fidelerinin taze ağırlık değişimi, pigment ve protein miktarları üzerine etkileri, *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 19(3): 259-264.

- Çepel, N., Dündar, M., Günel, A., 1977. Türkiye'nin Önemli Yetiştirme Bölgelerinde Saf Sarıçam Ormanlarının Gelişimi ile Bazı Edafik ve Fizyografik Etkenler Arasındaki İlişkiler, Tübitak Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu. Proje No: TOAG, s. 154.
- Dağdaş, S. Turan, İ. ve Kırış, R., 2005. "Anadolu'da Sarıçamın (Pinussylvestris L.) İki Yeni Yayılış Alanı". Tabiat ve İnsan Dergisi, Yıl: 39, Mart 2005, Sayı: 1, s. 48: 3-21, Türkiye Tabiatını Koruma Derneği
- Dağdaş, S. ve Doğan, R. R., 2018. "Sarıçamın (Pinussylvestris L.) İç Anadolu Antropojenik Stebinde Belirlenen Kalıntı Ormanları ve Alınacak Önlemler". Orman ve Av Dergisi, Yıl: 2018, Temmuz-Ağustos, Sayı: 4, Cilt: 96, ISSN 1302-040X, s. 50: 27-37, Ankara.
- Das K, Roychoudhury A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. 2, 53.
- Davies, P. J., 1995. Salicylic Acid, Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Acad. Pub., London, 833 s.
- Demiral T, Turkan I (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environ Exp Bot* 53:247–257.
- Einset J, Winge P, Bones A. 2007. ROS signaling pathways in chilling stress. *Plant Signal Behav* 2:365–367
- Elwood, P. C., Gallagher, A. M., Duthie, G. G., Mur, L. A. J. ve Morgan, G., 2009. Aspirin, salicylates, and cancer, *Lancet*, 373: 1301–1309.
- Fariduddin, Q., Hayat, S. ve Ahmad, A., 2003. Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity and seed yield in Brassica juncea, *Photosynthetica*, 41: 281–284.
- Fu, J. ve Huang, B., 2001. Involvement of Antioxidants and Lipid Peroxidation in the Adaptation of Two Cool-Season Grasses to Localized Drought Stress, *Environmental and Experimental Botany*, 45, 105-114.
- Gautam, S., Singh PK., 2009. Salicylic acid-induced salinity tolerance in corn grown under NaCl stress. *Acta Physiol Plant* 31:1185.
- Ghai, N., Setia, R. C. ve Setia, N., 2002. Effects of paclobutrazol and salicylic acid on chlorophyll content, hill activity and yield components in *Brassica napus* L. (cv. GSL-1). *Phytomorphology*, 52: 83–87.
- Gill, SS., ve Tuteja N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in cropplants. *Plant Physiol Biochem* 48:909–930.

- Gomez, L., Blanca, L. ve Antonio, C. S., 1993. Evidence of the Beneficent Action of the Salicylic Acid on Wheat Genotypes Yield under Restricted Irrigation. *In Proc. Scientific Meeting on Forestry, Livestock and Agriculture*, Mexico., 112 s.
- Hamid, M., Ashraf, M. Y., Rehman, K. U. ve Arshad, M., 2008. Influence of salicylic acid seed priming on growth and some biochemical attributes in wheat grown under saline conditions, *Pakistan Journal of Botany*, 40(1): 361-367.
- Hannah, M. A., Heyer, A. G. ve Hinch, D. K., 2005. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*, *PLoS Genetics*, 1(2): e26
- Hayat, S., Fariduddin, Q., Ali, B. ve Ahmad, A., 2005. Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings, *Acta Agronomica Hungarica*, 53: 433–437.
- Heath, R. L. ve Packer, L., 1968. Photoperoxidation in Isolated Chloroplast. I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125: 189-198.
- Horváth, E., Szalai, G. ve Janda, T., 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling, *Journal of Plant Growth Regulation*, 26: 290–300.
- Jain, A. ve Srivastava, H. S., 1981. Effect of Salicylic Acid on Nitrate Reductase Activity in Maize Seedlings, *Physiologia Plantarum*, 51: 339-342.
- Kadıoğlu, A., 2011. Bitki Fizyolojisi, ISBN: 978-605-4361-06-9
- Kaya, A. İnan, M. 2017. Tuz (NaCl) stresine maruz kalan reyhan (*Ocimum basilicum* L.) bitkisinde bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine salisilik asidin etkileri. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21 (3): 332-342.
- Klessig, D. F. ve Malamy, J., 1994. The Salicylic Acid Signal Plants, *Plant Molecular Biology*, 26: 1439-1458.
- Kling, G. J. ve Meyer, M. M., 1983. Effect of Phenolic Compounds and Indoleacetic Acid on Adventitious Root Initiation in Cuttings of *Phaseolus aureus*, *Acer saccharinum*, and *Acer ariseum*, *Horticultural Science*, 18(3): 352-354.
- Korkmaz, A., 2005. Inclusion of acetyl salicylic acid and methyl jasmonate into the priming solution improves low-temperature germination and emergence of sweet pepper, *Horticultural Science*, 40(1): 197-200.
- Krasensky, J. ve Jonak, C., 2012. Drought, Salt, and Temperature Stress-induced Metabolic Rearrangements and Regulatory Networks, *Journal of Experimental Botany*, 63(4): 1493-1608.

- Kratsch, H. A. ve Wise, R. R., 2000. The ultrastructure of chilling stress, *Plant, Cell and Environment*, 23(4): 337-350.
- Lee, B. H., Henderson, D. A. ve Zhu, J. K., 2005. The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1, *The Plant Cell*, 17(11): 3155-3175.
- Lee, B-H., Lee, H., Xiong, L. ve Zhu, J. K., 2002. A mitochondrial complex I defect impairs coldregulated nuclear gene expression, *The Plant Cell*, 14: 1235-1251.
- Lyons, J. M., 1973. Chilling injury in plants. *Annual review of plant physiology*, 24: 445-466.
- Mahajan, S., Tuteja N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: an over- view. *Arch Biochem Biophys* 444:139–158.
- Magnani, F., Nole, A., Ripullone, F., Grace, J., 2009. Growth pattern of *Pinus sylvestris* across Europe: a functional analysis using the hydraulic model, *iForest* 2: 162-171.
- Martz, F., Kiviniemi, S., Palva, T. E. ve Sutinen, M. L., 2006. Contribution of omega-3 fatty acid desaturase and 3-ketoacyl-ACP synthase II (KASII) genes in the modulation of glycerolipid fatty acid composition during cold acclimation in birch leaves, *Journal of Experimental Botany*, 57(4): 897-909.
- Matias, L. ve Jump, A. S., 2012. Interactions between growth, demography and biotic interactions in determining species range limits in a warming World: The case of *Pinus sylvestris*, *Forest Ecology and Management*, 282: 10-22.
- Medvedev, S.S. and Markova, I.V. (1991) Participation of salicylic acid in gravitropism in plants. *Doklady Akademii Nauk SSSR.*, 316, 1014-1016.
- Mendoza, I., Gomez-Aparicio, L., Zamora, R., Matias L., 2009. Recruitment limitation of forest communities in a degraded Mediterranean landscape, *J. Veg. Sci.* 20, 367-376.
- Moharekar, S. T., Lokhande, S. D., Hara, T., Tanaka, R., Tanaka, A. ve Chavan, P. D., 2003. Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings, *Photosynthetica*, 41: 315–317.
- Morris, K., Mackerness, S. A. H., Page, T., John, C. F., Murphy, A. M., Carr, J. P. ve Buchanan Wollaston, V., 2000. Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence, *The Plant Journal*, 23: 677–685.
- Morsy, M. R., Jouve, L., Hausman, J-F., Hoffmann, L. ve Stewart, J. McD., 2007. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in twice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 164: 157-167.
- Nilsson, J. E. ve Walfridsson, E. A., 1995. Phenological variation among plus-tree clones of *Pinus sylvestris* (L.) clones in northern Sweden, *Silvae Genetica*, 44: 20-28.

- Orman Genel Müdürlüğü, 2012. Türkiye Orman Varlığı-2012, Orman İdaresi ve Planlama Dairesi Başkanlığı Yayın No: 85, Envanter Serisi No: 12, Ankara.
- Pancheva, T. V., Popova, L. P. ve Uzunova, A. M., 1996. Effect of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants, *Journal of Plant Physiology*, 149: 57–63.
- Parvanova, D., Ivanov S., Konstantinova T., 2004. Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. *PlantPhysiolBiochem PPB* 42:57–63.
- Pearce, R. S., 1999. Molecular analysis of acclimation to cold, *Plant Growth Regulation*, 29: 47-76.
- Rab, A. ve Saltveit, M. E., 1996. Differential chilling sensitivity in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 96: 375-382.
- Rajasekaran, L. R. ve Blake, T. J., 1999. New Plant Growth Regulators Protect Photosynthesis and Enhance Growth under Drought of Jack Pine Seedlings, *Journal Plant Growth Regulation*, 18: 175-181.
- Ramanujam, M. P., Jaleel, V. A. ve Kumaravelu, G., 1998. Effect of Salicylic Acid on Nodulation, Nitrogenous Compounds and Related Enzymes of *Vigna mungo*, *Biologia Plantarum*, 41(2): 307-311.
- Raskin, I., 1995. *Salicylic acid*. In: Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, In: Davies P. J. (ed.), Kluwer Acad. Pub., London, 188-205.
- Raskin, I., 1992. Salicylate, A New Plant Hormone, *Plant Physiology*, 99: 799-803.
- Repo, T., Hanninen, H. ve Kellomaki, S., 1996. The effects of long-term elevation of air temperature and CO₂ on the frost hardiness of Scots pine, *Plant Cell Environment*, 19: 209-216.
- Ruelland, Eric. 2017. Plant responses to chilling temperatures. İkinci baskı, Cabi, USA.
- Rymen, B., Fiorani, F., Kartal, F., Vandepoele, K., Inzé, D. ve Beemster, G.T.S., 2007. Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes, *Plant Physiology*, 143: 1429-1438.
- Saltveit, M. E. ve Morris, L. L., 1990. Overview on chilling injury of horticultural crops, *Chilling injury of horticultural crops*, 3-15.
- Sangwan, V., Foulds, I., Singh, J. ve Dhindsa, R. S., 2001. Cold-activation of Brassica napus BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx, *The Plant Journal*, 27: 1–12.
- San-Vincente, M. ve Plasencia, J., 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development, *Journal of Experimental Botany*, 62: 3321-3338.

- Senaratna, T., Touchell, D., Bunn E. ve Dixon, K., 2000. Acetyl Salicylic Acid Induce Multiple Stress Tolerance in Bean and Tomato Plants, *Plant Growth Regulation*, 30: 157-161.
- Seo, S., Ishizuka, K. ve Ohashi, Y., 1995. Induction of Salicylic Acid β -Glucosidase in Tobacco Leaves by Exogenous Salicylic Acid, *Plant Cell Physiology*, 36 (3): 447-453.
- Smart, R. E. ve Bingham, G. E., 1974. Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiology*, 53: 258-260.
- Swindel, W. R., 2006. The Association Among Gene Expression Responses to Nine Abiotic Stress Treatments in *Arabidopsis thaliana*, *Genetics*, 174(4): 1811-24.
- Szalai, G., Tari, I., Janda, T., Pestenacz, A. ve Paldi, E., 2000. Effects of cold acclimation and salicylic acid on changes in 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and malonyl 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid contents in maize during chilling, *Biologia Plantarum*, 43(4): 637-640.
- Tabassum, T., Farooq M, Ahmad R et al., 2017. Seed priming and trans generational drought memory improves tolerance against salt stress in breadwheat. *Plant Physiol Biochem* 118:362–369.
- Taiz, L. ve Zeiger, E., 2002. *Plant Physiology*, Sinauer Associates, Inc. 3th Edition, 602-611 s.
- Taşgın, E., Atıcı, Ö. ve Nalbantoğlu, B., 2003. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves, *Plant Growth Regulation*, 41: 231-236.
- Thomashow, M. F., 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms, *Annual review of plant biology*, 50: 571-599.
- Tohma, Ö., 2007. Çilekte salisilik asit uygulamasının tuz stresine dayanıklılık üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Uemura, M. ve Steponkus, P. L., 1999. Cold acclimation in plants: relation between lipid composition and cryostability of the plasma membrane, *Journal of Plant Research*, 112: 245-254.
- Uemura, M., Tominaga, Y., Nakagawara, C., Shigematsu, S., Minami, A. ve Kawamura, Y., 2006. Responses of the plasma membrane to low temperatures, *Physiologia Plantarum*, 126: 81-89.
- Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E. ve Herka, K., 1991. Elicitation of Defense Responses in Bean Leave By *Botrytis cinerea* Polygalacturanase, *Acta Physiologiae Plantarum*, 13: 43-50.
- Uzunlu, M., 2006. Aspirinin kavun fidelerinin değişik abiyotik stres koşullarına karşı toleranslarının artırılması üzerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.

- Uzunova, A. N. ve Popova, L. P., 2000. Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants, *Photosynthetica*, 38: 243–250.
- Velikova, V., Yordanov, I. ve Edreva, A., 2000, Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain-treated Bean Plants: Protective Roles of Exogenous Polyamines, *Plant Science*, 151, 59-66.
- Vigh, L., Maresca, B. ve Harwood, J. L., 1998. Does the membrane's physical state control the expression of heatshock and other genes?, *Trends in biochemical sciences*, 23: 369-374.
- Wang, X., Li, W., Li, M. ve Welti, R., 2006. Profiling lipid changes in plant response to low temperatures, *Physiologia Plantarum*, 126: 90-96.
- Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahi-Goy, P., Metraux J. ve Ryals, J. A., 1991. Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance, *Plant Cell*, 3(10): 1085-1094.
- Waszczak, C., Carmody M, Kangasjärvi J., 2018. Reactive Oxygen Species in *Plant Signaling*. *Annu Rev Plant Biol.* 29; 69: 209-236.
- White, RF., 1979. Acetylsalicylic Acid (Aspirin) Induces Resistance to Tobacco Mosaic Virus in Tobacco, *Virology*, 99(2): 410-412.
- Witham, F. H., Blaydes B. F. ve Devlin R. M., 1971. *Experiments in Plant Physiology*.
- Yalpani, N., León, J., Lawton, M. A. ve Raskin, I., 1993. Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco, *Plant physiology*, 103(2): 315-321.
- Yang, M. T., Chen, S. L., Lin, C. Y. ve Chen, Y. M., 2005. Chilling stress suppresses chloroplast development and nuclear gene expression in leaves of mung bean seedlings, *Planta*, 221(3): 374-385.
- Yılmaz, E., Tuna, L.A. ve Bürün, B., 2011. Bitkilerin Tuz Stresi Etkilerine Karşı Geliştirdikleri Tolerans Stratejileri, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, ISSN 1305-1385, 7.1, 47-66.
- Zhao, S., Liu, Q., Qi, Y. ve Duo, L., 2010. Responses of root growth and protective enzymes to copper stress in Turfgrass. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 52, 7-11.
- Zhao, XQ., Wang WS, Zhang F, Zhang T, Zhao W, Fu BY, Li ZK., 2013. Temporal profiling of primary metabolites under chilling stress and its association with seedling chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). *Rice*, 6, 23.

ÖZGEÇMİŞ

Fotoğraf

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ARSLAN, NİLGÜN
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 21/12/1988
Medeni hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 05321763757
Faks :
e-posta : nilgunaydogan_08@hotmail.com

Eğitim

<u>Derece</u>	<u>Eğitim Birimi</u>	<u>Mezuniyet Tarihi</u>
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2012