



**YEM BEZELYESİ (*Pisum sativum arvense* L.)
GENOTİPLERİNİN, PROLİN İÇERİĞİNE VE
ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTESİNE BAĞLI
OLARAK SOĞUĞA KARŞI DİRENCİNİN
BELİRLENMESİ**

Onur Recep YİĞİT

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU**

**2019
Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

YEM BEZELYESİ (*Pisum sativum arvense* L.) GENOTİPLERİNİN, PROLİN İÇERİĞİNE VE ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTESİNE BAĞLI OLARAK SOĞUĞA KARŞI DİRENCİNİN BELİRLENMESİ

Onur Recep YİĞİT

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

**Erzurum
2019
Her hakkı saklıdır**

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

YEM BEZELYESİ (*Pisum sativum arvense* L.) GENOTİPLERİNİN, PROLİN İÇERİĞİNE VE ANTIOKSİDAN ENZİM AKTİVİTESİNE BAĞLI OLARAK SOĞUĞA KARŞI DİRENCİNİN BELİRLENMESİ

Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU danışmanlığında, Onur Recep YİĞİT tarafından hazırlanan bu çalışma 28/05/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ *İmza* :
Üye : Doç. Dr. Harun BUDAK *İmza* :
Üye : Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU *İmza* :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ
Enstitü Müdürü

Bu tez çalışması BAP tarafından 2015/10 nolu proje ile desteklenmiştir.

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

28 / 05 / 2019

İmzası

Adı-SOYADI

Onur Recep YİĞİT

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YEM BEZELYESİ (*Pisum sativum arvense* L.) GENOTİPLERİNİN, PROLİN İÇERİĞİNE VE ANTIOKSİDAN ENZİM AKTİVİTESİNE BAĞLI OLARAK SOĞUĞA KARŞI DİRENCİNİN BELİRLENMESİ

Onur Recep YİĞİT

Erzurum Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU

Bezelye (*Pisum sativum arvense* L.), dünya çapında başlıca ticari yem bitkilerinden biridir ancak verimi soğuk stres nedeniyle soğuğa karşı direnci ile sınırlıdır. Bu çalışmada, farklı 31 bezelye genotipinin soğuğa direnç tepkisini, soğuk stres altında test edilmiştir. Bezelye bitkileri, deneylerden 10 gün önce sıcaklık kontrollü bir serada (25/15 °C) tohumlardan yetiştirilmiştir. Soğuğa dirençli ve soğuğa duyarlı hatlar, çeşitler farklı termal analiz değerleri kullanılarak seçilmiştir. Ayrıca antioksidan enzimlerinin (askorbat peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz) aktivitesindeki değişimlerin, serbest prolin içeriğindeki değişimlerin ve soğuğa direncin % 50 oranında yapraklarda ölüme neden olan öldürücü sıcaklık (LT₅₀) ile ilişkisi araştırılmıştır. Soğuk aklimasyon ve aklimasyon olmayan koşullarda üç ıslah hattı seçilmiştir. Proline içeriği, aklimasyon olmayan koşullara kıyasla, soğuk aklimasyonda bulunan yapraklarda kademeli olarak artmıştır. Soğuk aklimasyon Askorbat Peroksidaz (APX), Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) aktivitelerini geliştirmiştir. Enzim aktiviteleri ile soğuğa karşı direnci arasındaki en yüksek korelasyon 19 ıslah hattının yaprak örneklerinde SOD, APX ve CAT durumunda gözlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, LT₅₀'nin soğuk aklimasyonda prolin içeriği ve antioksidan enzim aktiviteleriyle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir.

2018, 48 sayfa

Anahtar Kelime: Bezelye, Soğuğa Dayanıklılık, Ölümcül Sıcaklık, Enzim Aktivitesi

ABSTRACT

MASTER THESIS

DETERMINATION COLD STRESS RESISTANCE AND THE ANTIOXIDANT ENZYME SYSTEM IN *PISUM SATIVUM ARVENSE* L.

Onur Recep YİĞİT

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

Pea (*Pisum sativum arvense* L.) is one of the major commercial forage all over the world, but its yield is restricted by cold stress due to cold sensitivity. In this study, the response of 31 pea genotypes with different cold resistance was tested under cold stress. Pea plants were cultivated from seeds in a temperature-controlled greenhouse (25/15 °C) for 10 days prior to experiments. Cold-resistant and cold-sensitive lines and cultivars were selected using values of different thermal analysis. In addition, alterations in the activity of antioxidant enzymes (Ascorbate peroxidase, catalase and superoxide dismutase), free proline content and their relation to LT₅₀ (lethal temperature causing fifty percent damage) with cold resistance were investigated, and three breeding lines were selected at cold acclimation and non-acclimation conditions. Proline content gradually increased at cold acclimation compared to those leaves at non-acclimated. Cold acclimation improved the activities of APX, SOD and CAT. The highest correlation between enzyme activities and cold resistance was observed in the case of SOD, APX and CAT of 19 breeding lines' leaves. Our results indicated LT₅₀ as closely related to proline content and antioxidant enzyme activities at cold acclimation.

2019, 48 pages

Keywords: Pea, Cold resistant, Lethal Temperature, Enzyme Activity

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyerek beni yönlendiren danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Enzim aktivitelerinin belirlenmesinde yardımlarından dolayı Prof. Dr. Ökkeő ATICI'ya ve termal ekzoterm sıcaklık ölçümü için bize desteklerini eksik etmeyen Prof. Dr. Cafer KÖSE'ye minnetlerimi sunarak teşekkür ederim.

İklimlendirme kabinleri için bize kapılarını açan Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında tüm destekleriyle her zaman yanımda olan, aileme ve Nilgün DEMİRTAŐ'a en içten saygı ve sevgilerimi sunarım.

Onur Recep YİĞİT
Mayıs 2019

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| TEŞEKKÜR | iii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | viii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | ix |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Soğuğa Dayanıklılık | 1 |
| 1.2 Soğuk Aklimasyonu | 3 |
| 1.2.1 Bitkilerde Hücre İçi ve Hücreler Arası Don Oluşumu | 6 |
| 1.2.2 Don Zararı Sürecinde Hücre Membranlarındaki Değişimler | 7 |
| 1.2.3 Bitkinin Düşük Sıcaklığa Dayanımında Bitki Öz Suyunda Çözülebilir Maddelerdeki Değişimler | 9 |
| 1.2.4 Bitkinin Düşük Sıcaklığa Dayanımında Enzim Aktivitesindeki Değişimler .. | 11 |
| 1.2.5 Bitkinin Düşük Sıcaklığa Dayanımında Antioksidant Enzim Sistemdeki Değişimler..... | 11 |
| 1.3 Bezelye (<i>Pisum sativum arvense</i> L.) | 15 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ | 19 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM | 23 |
| 3.1 Kullanılan Araç ve Gereçler | 23 |
| 3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler | 23 |
| 3.3 Çözeltilerin Hazırlanmaları | 24 |
| 3.4 Bitki Materyali ve Büyüme Koşulları..... | 25 |
| 3.5 Soğuğa Karşı Direncin Belirlenmesi | 25 |
| 3.6 Soğuk Aklimasyon Tedavisi..... | 28 |
| 3.7 Prolin Tahlili | 28 |
| 3.8 Antioksidan Enzim Aktiviteleri | 29 |
| 3.9 İstatistiksel Analiz | 30 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA | 31 |
| 5. SONUÇ ve ÖNERİLER | 36 |
| KAYNAKLAR | 40 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

° C

cm

Gb

Kg

Kg/da

M

mg

ml

mm

mM

nm

µmol

Açıklamalar

Santigrad Derece

Santi Metre

Gigabaz

Kilogram

1000 danesinin kg ağırlığı

Molar

Mili Gram

Mili Litre

Mili Metre

Mili Molar

Nano Metre

Mikro Mol

Kısaltmalar

APx

ATPaz

CA

Ca²⁺

CAT

DHAR

DSC

DTA

EDTA

Fe²⁺

Fe³⁺

Fm

FT

Fv

G-6PD

Açıklamalar

Askorbat Peroksidaz

Adenozin Trifosfataz

Soğuk İklimlendirme Olan

İyonize Kalsiyum

Katalaz

Dehidro Askorbat Redüktaz

Diferansiyel Tarama Kalorimetri

Diferansiyel Termal Analiz

Etilen Diamin Tetra Asetikasit

Demir-II

Demir-III

Maksimum Floresan

Donma Toleransı

Değişken Floresan

Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz

Kısaltmalar

GR
GSH
H₂O
H₂O₂
HTE
KH₂PO₄
LTE
LTSEM

MDA
MDHAR
mRNA
NA
Na₂HPO₄
NaCl
NAD(P)H

NaOCl
NaOH
NBT
NMR
O₂⁻
OAT
OH⁻
PAL
PDH
POD
PPO
ROS
SH
SOD
TEM

Açıklamalar

Glutasyon Redüktaz
Glutasyon
Su
Hidrojen Peroksit
Yüksek Sıcaklıklı Ekzoterm
Potasyum Di-Hidrojen Fosfat
Düşük Sıcaklıklı Ekzoterm
Düşük Sıcaklık Tarayıcılı Elektron
Mikroskobu
Malondialdehit
Monodehidro Askorbat Redüktaz
Mesajcı Ribonükleik Asit
Soğuk İklimlendirme Olmayan
Di-Sodyum Hidrojen Fosfat
Sodyum Klorür
Nikotin Amid Adenin Dinükleotit
Fosfat
Sodyum Hipoklorit
Sodyum Hidroksit
Nitro-mavi Tetrazolyum
Nükleer Manyetik Rezonans
Süperoksit
Ornitin-AT-Aminotransferaz
Hidroksil
Fenilalanin Amonyak-Liyaz
Prolin Dehidrogenaz
Peroksidaz
Polifenol Oksidaz
Reaktif Oksijen Türevler
Sülfidril
Süperoksit Dismutaz
Termal Ekzoterm Sıcaklık Ölçümü

Kisaltmalar

Açıklamalar

UV

Ultraviyole



ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 3.1 Termal ekzoterm sıcaklık ölçümü için yerleştirilen ıslah hatları, 1.kabinet.... | 26 |
| Şekil 3.2 Termal ekzoterm sıcaklık ölçümü için yerleştirilen ıslah hatları, 2.kabinet.... | 26 |
| Şekil 3.3 Termal ekzoterm sıcaklık ölçümü için yerleştirilen ıslah hatları, 3.kabinet.... | 27 |
| Şekil 3.4 Prolin kimyasal yapısı..... | 28 |
| Şekil 3.5 Yaprak örneklerinin sülfosalisilik asit sulu çözeltisi ile ezilmesi (A-B), ekstraktın buzlu asetik asit ve 2 ml asit ninhidrin ile karıştırılması (C-D) | 29 |



ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 3.1 Faydalanılan araç ve gereçler..... | 23 |
| Çizelge 3.2 Kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildiği firmalar | 23 |
| Çizelge 5.1 25 ıslah hattı ve 6 çeşitten oluşan LT ₅₀ 'deki değişimler. | 36 |
| Çizelge 5.2 Üç bezelye ıslah hattının prolin içeriğindeki değişimler | 37 |
| Çizelge 5.3 Üç bezelye ıslah hattının SOD aktivitesindeki değişimler | 38 |
| Çizelge 5.4 Üç bezelye ıslah hattının APX aktivitelerindeki değişimler..... | 38 |
| Çizelge 5.5 Üç bezelye ıslah hattının CAT aktivitelerindeki değişimler..... | 39 |



1. GİRİŞ

1. GİRİŞ

1.1 Soğuğa Dayanıklılık

Sıcaklık doğal bitki familyasının dünya üzerindeki normal dağılışında etkin rol oynayan faktörlerden biridir. Bitkilerin çoğu kendi kalıtsal özellikleri doğrusunca varlıklarını sürdürebilmek için genellikle sınır dereceleriyle yüz yüze gelebilmektedirler. Dünya genelinde karaya ait alanın neredeyse % 25'lik bölümü 15 °C'den fazla sıcaklık görülen ve donmanın olumsuz etkileri yönünden güvenilir olan alanlardan meydana gelmektedir. Bunun dışındaki alanlarda belirli zaman aralıklarında sıcaklığın 0 °C'den az olması sebebiyle bilhassa duyarlı bitkilerde hasar oluşabilmektedir (Sakai and Larcher 1987; Scebba et al. 1998; Zhao 1998; Pearce 1999; Vagujfalvi et al. 1999; Pearce 2001; Szalai et al. 2001; Puhakainen 2004).

Soğuk stresin önemi bitkilerin üretimindeki yeri artmış ve araştırmacılar çalışmalarında detaylı bir şekilde bu konuyu işlemeye başlamıştır. Bununla ilgili olarak bitkilerde soğuğa karşı direncin kazanılması için geleneksel ıslah ya da moleküler tekniklerle alakalı olarak oldukça çeşitli bitkilerde incelemeler yapılmıştır ve incelemeler sürdürülmektedir (Szalai et al. 2001). Bitkilerin içerisinde dönemsel soğuğa dayanıklılık açısından farklılığın oluşması, donmaya dayanıklılık mekanizmasının aydınlanmasını kompleks bir durum olarak ortaya çıkmıştır. Orta Avrupa çamlarında yaz aylarında -10 °C'lik sıcaklık bitki yapraklarının yaşamının son bulmasına sebep olurken kış aylarında düşük sıcaklık derecelerinde hayatlarını devam ettirebilmektedirler (Greene 2002; Beck et al. 2004). Turunçgil, kışlık tahıllar, patates, yaprağını döken meyve ağaçları ve kimi sebzeler 2 °C gibi donmaya karşı direnç oluşturulabilirlerse tüm bu ürünlerin hasatlarında kayda değer bir artış olacaktır. Aksi halde toplam verimde kayda değer düşüşler meydana gelecektir. Örneğin, dünya sıcaklığının 1 °C düşmesi, pirinç üretiminin % 40'a varan düşüşüne sebep olacaktır (Pearce 1999). Atmosfer sıcaklığından bitkilerin dokusu etkilenir, bitki dokusunu iki şekilde etkilemektedir. Birincisi, bitki metabolizmasında değişimlere yol açan enzimlerin katalizledikleri reaksiyon oranları ve aktiviteleri değişmektedir. İkincisi ise çok fazla sıcaklıklar bitkilerde hasara yol açmaktadır. Çok yüksek sıcaklık koşullarında yaşamını sürdürebilme problemi, makro molekül içeriği, hücrelerin yapı olarak ve işlevsel bütünlüğünün sürdürebilmesi ile ilişkilidir.

1. GİRİŞ

Hayvan organizmalarından ayrı bir biçimde karada yaşamını sürdüren bitkiler, kötü ortam koşullarından sakınmak ve uzak durmak adına konumlarını değiştiremezler. Bundan dolayı bitkiler olağan dışı doğa koşullarına karşı, varlıklarını idame ettirmek için fizyolojik ve biyokimyasal taktikler uygulamak zorunda kalırlar. Bundan ötürü bitkiler değişken zaman aralıklarında kötü şartlara karşı uyum sağlamaktadırlar. (Nilsen and Orcutt 1996). Yüksek sıcaklığın etkisi ile meydana gelen kuraklık, düşük sıcaklığın etkisi ile meydana gelen donlar bitkilerin yaşamlarını devam ettirmelerini ve evrimlerini tetikleyen temel stres etmenlerindedir. Bitkilerde stres koşullarına adaptasyon iki biçimde oluşmaktadır. Bunlar; 1. Avoidans (mevcutta yer alan stres etmenini düşürme ya da önüne geçme vasfıdır), 2. Tolerans (hasara uğramadan ya da biraz hasar ile strese rağmen yaşamını sürdürebilme vasfıdır).

Ilıman iklim alanlarındaki çoğu bitki çeşidi belirli bir vakit donma derecelerinde bulunmayan düşük sıcaklıklara karşı karşıya gelerek don zararına rağmen adaptasyon oluşturabilmektedir. Bu kompleks dayanım aşaması, soğuk aklimasyonu ya da soğuğa adaptasyon aşaması olarak nitelendirilebilir. Soğuk aklimasyon aşamasında, bitkiler don stresinden kaçınmak ya da dayanım oluşturmak adına çeşitli metodlar oluşturmaktadır. Bunlar lipit bileşiminde, enzim aktivitelerindeki farklılıklar, şeker ve amino asit ihtivasındaki değişimler, bir takım proteinlerin seviyelerinde ve gen ekspresyonunda farklılıklar biçiminde dile getirilmektedir (Howarth and Ougham 1993; Burke 1995).

Bitkilerde soğuğa karşı direncin adaptasyon işleyişi birkaç etmenin tetiklediği kompleks bir koşuldur. Bundan dolayı bu durumu keşfetmek adına birkaç kayda değer etmene yoğunlaşarak araştırılmalıdır. İlk olarak hücre içi ve hücreler arası don oluşumunun işleyişi, don oluşumundan önce ve bu aşamada dokudaki nem ve kuru madde ihtivasındaki farklılık, lipitler, protein, bazı amino asitler, antioksidant enzimler, makro ve mikro besin elementlerindeki farklılıkların araştırılmasının ehemmiyet kazanacağı tasavvur edilmektedir.

Abiyotik stres çevresel olarak tanımlanır, üretkenliği ve verimi optimum seviyenin altına düşürür. Düşük sıcaklık, dünyanın birçok bölgesinde ıslah gelişimini ve bitkisel vejetatif olarak üretimini etkileyen önemli abiyotik stres faktörlerinden biridir. Bitkiler karmaşık organizmalardır. Dondurucu sıcaklıklara karşı korunmada

1. GİRİŞ

yeteneklerini geniş ölçüde değiştirirler. Soğuk stresin, bitki gelişimine etkisi hakkında kesin bir şey belirtmek zordur (Lewitt 1980). Donma bitkiler için ölüm olarak tanımlanır ya da soğuk stresten dolayı canlı bitki hücrelerinin büyümesine ve farklılaşmasına zarar verir. Ancak süper soğutma ile sıvıyı katılaşmasına engel olacak şekilde donma derecesinin altında soğutarak soğuk hasara karşı kaçınma mekanizması vardır, düşük sıcaklıklara maruz kalan bitkilerde. Bitkilerin süper soğutma derecesi normal çevre koşullarda bitki dokusunun buz-çekirdeklenme yeteneğine bağlıdır. Süper soğutma özellikle dona maruz kalan bitkilerde yüksek metabolik dönemlerde ve büyüme aktivitesi dönemlerinde önemli bir etmendir (Reyes-Diaz et al. 2006). Ne zamanki ekstraselüler süper soğutulmuş su donar, yüksek sıcaklıklı ekzoterm (HTE) oluşturur ve bitkiye zarar vermez. Aksine, hücre içi süper soğutulduğu zaman su donduğunda, düşük sıcaklıklı bir ekzoterm oluşturur (LTE), çoğunlukla organlar için öldürücüdür. Diferansiyel Termal analiz, bitkilerin kritik sıcaklıklarını tahmin etmek için kullanılan bir yöntemdir (Burke et al. 1976).

1.2 Soğuk Aklımasyonu

Meyve ağaçlarının soğuk dirençleri çeşitlerine göre değişiklik meydana getirmektedir. Elma ve vişne gibi ürün çeşitleri soğuğa dirençleri daha yüksek seviyede olmalarına karşın, kayısı ve badem gibi meyve çeşitlerinde düşüş sıcaklıktan dolayı hasar meydana gelmektedir. Normal bitkilerin düşük sıcaklıktan dolayı hasar görmesinden dolayı geçirdikleri zaman aralıkları, soğuğun sıcaklık derecesi, düşüş hızı ve tesir gösterdiği zaman gibi etmenler nüfuz etmektedir. Meyve ağaçlarının organlarının düşük sıcaklıklara karşı direnç seviyeleri değişkenlik göstermektedir (Aslantaş 2008).

Soğuğa direnci az olan bitki organları, çiçek tomurcuklarıdır. Bu tomurcukların bilhassa açılmaya adım attığı zamanlarda düşük sıcaklık seviyelerine karşı dirençleri çok fazladır. Çiçek tomurcuklarının düşük sıcaklık seviyelerine karşı dirençleri, içerisinde yer aldıkları büyüme dönemlerine göre değişiklik göstermektedir. Bu süreç bitkinin yaşadığı metabolik farklılaşmadan meydana gelmektedir. Örnek vermek gerekirse dinlenme durumundaki hücrelerde şeker ihtivasının ve protein miktarının

1. GİRİŞ

fazlaşması hücrede meydana gelen buz formasyonunu alt seviyeye çekerek dona direncini arttırmaktadır (Küden et al. 1998). Çoğu bitki çeşidi için, donmaya karşı direnç sabit olmamaktadır. Sıcaklık ve öteki çevre koşulları değişim gösterdiğinde, soğuğa karşı dirençte dönemsel biçimde farklılık göstermektedir. Tabiatта odunsu bitkilerin soğuğa aklımasyon reaksiyonları çoğunlukla, kısa gün fotoperiyot aşamasından sonra donma noktalarında bulunmayan sıcaklıklarla ilerlemektedir (Sakai and Larcher 1987; Smallwood and Bowles 2002; Puhakainen 2004).

Bitkiler güz mevsiminde doğal aklımasyon aşaması yaşayarak düşük sıcaklıklara daha dirençli hale gelmektedirler (Dalmannsdottir et al. 2001; Wisniewski and Basett 2003). Soğuk aklımasyonu, bitkilerin soğuk hava koşullarına karşın verdiği yanıt, işlevsel ve metabolik farklılaşmaların birleşiminden meydana gelen ileri aşamada faal bir aşamadır (Steponkus 1984). Soğuğa aklımasyon aşamasında çoğu olgunun oluşması azami direncin oluşmasında rol almaktadır. Örneğin; dış etkenlerden kaynaklanan farklılaşmalarla birlikte hormonal farklılaşmalar, gelişen gen aktivitesi ve yeni gen ürünleri, çözünebilir materyallerin toplanmasında ve lipit bileşiminde meydana gelen farklılaşmalar olarak nitelendirilebilir (Howarth and Ougham 1993; Aslantaş 1999). Dokularda bulunan suyun çok fazla soğuması, antifriz özelliği taşıyan maddelerin toplanması don stresine maruz kalmamayı sağlayabilir. Donmaya karşı dirençte Avoidans mekanizması çoğunlukla otsu bitkilerde, çok yıllık odunsu bitkilerdeyse dayanım etmeni daha dominant olarak bulunmaktadır. Her iki mekanizma benzer bitkide müşterek bir şekilde etki etmektedir. Mesela, çiçek ve yaprak tomurcuklarının iç dokularındaki su, tomurcuk pullarına iletilerek bu yerde fazla soğuma sergilemektedir. Bu aşama dondan kaynaklanan hasarın oransal olarak düşmesine yardım etmektedir. Odunsu bitkilerde parankima, floem gibi dokular böylece dondan kaynaklanan hasarı azaltabilmektedirler (Sakai and Larcher 1987; Nilsen and Orcutt 1996).

Bitkilerin dış etkenlere bağlı olarak olağan dışı koşullarda yaşamlarını devam ettirebilmesi, bitkilerin belirtilen koşullara morfolojik ve fizyolojik biçimde uyum sağlayabilme olabileme becerileriyle doğru orantılıdır. Küçük, kalın yapraklar, yüksek kök/sürgün bağıntısı gibi nitelikler bitkilerin dış etkenlere dayanım faktörleriyle başa çıkabilmesinde belirgin rol oynamaktadır (Nilsen and Orcutt 1996). Şeftali bitkisinde dona direnç incelemesinde, bütün türlerin azami direnci ocak ve şubat aylarında, en

1. GİRİŞ

düşük direnci ise mart ayında sergilediği ortaya çıkmıştır. Triogem ve Golden Jubilee çeşitlerinin tomurcukları -21,1 °C’de suni don testine maruz bırakılmıştır. Ocak ayında sırasıyla % 58,3 ve % 55,1 oranlarında canlılık sergilerken, mart ayında bu oran her iki türde de % 0,6’ya inmiştir. Böylece dona direncin türlere bağlı olarak farklılık gösterdiği belirtilmiştir (Küden et al. 1998). Kimi şeftali, kayısı ve kiraz türlerinin dona karşı direnç seviyelerinin belirlenmesi adına şubat ve mart aylarında 6-8 saat süreyle -10 °C ve -15 °C’deki sıcaklıklara karşı karşıya getirilmiştir. Sonuçta -10 °C’de şeftali tomurcuklarının tümünün, kayısı tomurcuklarının % 88,8’nin ve kiraz tomurcuklarının %96’sının hasar gördüğü belirlenmiştir (Küden et al. 1998).

Donmaya karşı dayanıklı bitkiler sadece düşük sıcaklıkta hücre dışı buzlanma başladığından zarar görürler. Birçok bitki türü donmaya karşı direnç geliştirir, bu fizyolojik süreç olan soğuk aklimasyondur. Soğuk aklimasyonu dinamik bir süreçtir, bitkilerin düşük fakat donma olmayan sıcaklıklara maruz kalırken sıfırın altındaki sıcaklıklara tolerans kazanmasıdır (Lewitt 1980). Bitkiler, biyokimyasal ve fizyolojik değişimlerin sayısı kadar aklimasyona karşılık verirler. Bu biyokimyasal ve fizyolojik değişimler, prolin ve protein miktarındaki değişiklikler ve enzimatik aktivitelerin değişimi olarak nitelendirilebilir. Çözünür karbonhidratlar ve serbest prolin, aklimasyon esnasında su kaybını engelleyebilir (Kovacs and Zet al. 2011).

Soğuk aklimasyon, prolin metabolizması yollarındaki enzim aktivitesi değişiklikleri ile prolin seviyesini artırır, böylece soğuğa direnci artırır (Ruiz et al. 2002). Bitki türlerinin soğuğa direnç kazanımlarında serbest prolin miktarı artış gösterir böylece prolin bitkilerin soğuk stresi ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Bitkilerde bulunan antioksidan enzimler, çevresel streslere maruz kaldıklarında strese karşı düzenlemede ana rol oynadığı bilinmektedir (Chaitanya et al. 2002; Turk vd. 2014; Bezirganoglu 2017). Geliştirilmiş oksidatif etkilerin stresini azaltmak için bitki türleri peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi çeşitli antioksidanlar üretir (Shahidet et al. 2012).

1. GİRİŞ

1.2.1 Bitkilerde Hücre İçi ve Hücreler Arası Don Oluşumu

Bitkiler dondurucu sıcaklıklarla karşı karşıya geldiklerinde neyin meydana gelebileceğini öğrenmek için suyun fiziksel ve kimyasal niteliğini ve don olayının bilinmesi gerekmektedir. 0 °C derecedeki saf suda, katı halden sıvı hale ya da sıvı halden katı hale bir faz geçişi bulunmaktadır. Don olayı kompleks bir olgudur. Donmaya bağlı zarar, hücreler arası donun meydana gelmesi ve hücre su kaybının önüne geçilmeye çalışılır (Lewitt 1980). Bitki hücrelerinde bulunduğu üzere, çözeltiler değişik sıcaklık derecelerinde donma ve erime niteliğine haizdir. Solüsyonlar çoğunlukla donmadan önce ileri derecede soğutma özelliği oluşturur. Aşırı soğutma derecesinin büyük olması çoğu etmenin tesiri ile değişir. Bir takım organlar ve dokular aşırı soğutma sayesinde don olayından kendini saklar. Aşırı soğutma limitlerin üzerine çıktığında, hücre dışında buz kristalleri meydana gelir. Bitkinin yaşamını yitirmesi, hücrenin dışından su kaybı karşılayacak eşik değerin üzerine çıktığında meydana gelir. Donma sebebi ile donmadan kaynaklı tıkanmalar, sürgünlerin yaşamlarının son bulmasına sebebiyet vermektedir (Pearce 1999; Pearce 2001; Kocaçalışkan 2002; Smallwood and Bowles 2002; Wisniewski and Basett 2003).

Hücre zarlarındaki formun kimyasal ve enzimatik karışımındaki farklılık, aşırı soğuma niteliğinde de değişikliğe sebebiyet vermektedir. Hücreler arası ve hücre içi donun meydana gelmesi doku adına önleyici nitelik oluşturan sıcaklık artışlarını (ekzoterm) oluşturmaktadır. İncelenen araştırmalarda 21 gün boyunca -30 °C'nin altındaki sıcaklık dereceleri ile karşı karşıya gelen odunsu bitkilerden elde edilen numunelerde düşük sıcaklık ekzotermi gözlemlenmiştir (Wisniewski and Basett 2003). Hücre içi donun meydana gelişi tabiatta olağan bir olgu değildir. Fakat hücrelerarası don, bütün ılıman iklim alanlarında kış boyunca bitkilerde oluşmaktadır. Çözülebilir susuz materyalin daha düşük derişikliği ve buz olayının meydana gelmesine etki eden nükleatörlerin bulunmasından ötürü buz olayının meydana gelmesi ilk önce hücrelerarası boşluk olan alanlarda oluşur (Pearce 1988). Hücrelerarası donun oluşumu, buz nükleonlarının meydana gelmesiyle soğuma derecesi ile benzer dış etmenlerden kaynaklı faktörler ile ilişkilidir (Palta and Weiss 1993). Hücrelerarası buz oluşumunun aşamalı biçimde artışı, hücrelerden suyu dışarıya atmaktır. Hücrelerarası buzun meydana gelmesi dolayısı ile oluşan su kaybının ve mekanik stresler dondan kaynaklı

1. GİRİŞ

hasara önemli derecede neden olmaktadır (Sakai and Larcher 1987). Bu aşamada oluşan buz kristallerine tesir etme zamanı, donma ve erime dereceleri, erime sonrasındaki şartlarda hasara netice edebilir. Donma aşaması ve dondan kaynaklı hasarın oranı bitkinin anatomik formu, yaşı, suyun ihtiva seviyesinden de etki göstermektedir (Palta and Weiss 1993).

Çoğu yöntem bitkilerde oluşan don hasarı için kayda değer veriler sunmaktadır. Görüntüleme yöntemlerindeki ilerlemeler (infrared video termograf) buzlanmanın meydana gelmesi ve ilerlemesi ile fizyolojik niteliğini kati biçimde sergilemektedir ve ekzotermilerin elde edilmesini temin etmektedir. Diferansiyel termal analiz (DTA), diferansiyel tarama kalorimetri (DSC), düşük sıcaklık tarayıcılı elektron mikroskobu (LTSEM), nükleer manyetik rezonans (NMR) bitki dondan kaynaklı olarak hasarı tespit etmekte kayda değerdir (Pearce 2001; Wisniewski and Basett 2003; Aslantaş 2008). Diferansiyel termal analiz (DTA) meyve ağaçlarının dokularında soğuğa karşı direnç derecelerinin tespit edilmesinde genellikle faydalanılmaktadır (Wisniewski and Basett 2003; Aslantaş 2008).

1.2.2 Don Zararı Sürecinde Hücre Membranlarındaki Değişimler

Don olayının yaşanması için gereken sıcaklık değeri ile karşı karşıya gelen buğday bitkilerinden korunan hücre zarlarında yağların yükseltgenmesi nedeniyle bozulması tespit edilmiştir (Pukacki et al. 1991). Elde edilen araştırmaların neticesi sayesinde dona dayanımın hücre zarlarında süperoksin meydana gelmesini öne çektiği tespit edilmiştir. Hücreler arası su donduğunda, buzun ya da suyun meydana gelmesinin ötesindeki bitki özsuunda çözülmüş olarak bulunan maddeler dokuların yapısında saklanmasını sürdürmektedir (Kendall and McKersie 1989; Zhao 1998).

Suda bulunan oksijenin çözünebilirliği soğuk sıcaklık değerlerinde fazlaştığından, oksijen dona dayanım boyunca rahatça hücrelere dağılır. Oksidasyon (yükseltgenme) ve redüksiyon (indirgenme) tepkimeleri ile bağlı olarak elektron nakil zincirleri ve fermentler don dehidrasyon hasarı sebebi ile dağılmaktadırlar. Elektronlar nakledicilerden alıcılara muntazam biçimde nakledilemez. Bundan dolayı taşıma

1. GİRİŞ

zincirlerinden dışarıya sızan elektronlar süperoksit ya da moleküler oksijen meydana gelmesini tetiklemektedirler. Aktif oksijen çeşitlerinin meydana gelmesi hücre zarı yağlarının dağılmasını çabuklaştırmakta ve serbest yağ asitleri veya peroksidasyon sonucunda oluşan toplanmasına sebebiyet vermektedir (Shewfelt 1992). Lipoksigenaz fermentinin serbest halde bulunan yağ asitlerini fermente ederek ya da kimyevi biçimde hidrolize ederek peroksidasyonun temel maddesini meydana getirdiği incelemeler neticesinde elde edilmiştir (Thompson 1989). Hücre zarı lipitlerinde ester teşkil ederek yağ asitlerinin serbest radikal oluşum tepkimeleri, bunların süpürülme nispetini geçmesi hassas ayrıntıdır. Bitki plazma zarları oksijenin farklılaştırmış türlerini harcama becerisine haiz redoks yapısını barındırır (Shewfelt and Ericson 1991). Bu tepkimede çoğunlukla bir elektron vericisi olan NAD(P)H'dan yararlanılarak süperoksit meydana getirilir (Crane et al. 1991).

Plazma zarlarındaki redoks yöntemleri çoğu fizyolojik etapta etkili şekilde görev alır. Fakat dayanım koşullarında zarların hasarına neden olan aktif oksijen türevlerinin meydana gelmesi konusunda çok veri bulunmamaktadır. Son zamanlarda su stresi ile karşı karşıya getirilen buğday bitki köklerinin plazma zarlarında oksijen harcanması ve süperoksit oluşmasının, lipit peroksidasyonu neticesinde fazlaştığı tespit edilmiştir. Bu evrenin plazma zarının redoks yönteminin hücreye ait oksijen radikallerinin oluşmasında kayda değer etmen olabileceği razı görülmektedir ve bu koşulların yağ peroksidasyonu tarafından zarlara hasar gösterebileceği dile getirilmiştir (Serrano et al. 1995). Çoğunlukla dondan kaynaklı hasar neticesinde; hücre zarı yarı iletkenliğinin zayıflaması, iyonların etkin transferindeki yitimler, fosfolipitlerin dağılması ve hücre zarlarının fiziksel bünyesindeki faz başkalaşması oluşmaktadır (Lewitt 1980). Sitoplazma, bunu sarmalayan plazma zarının yarı geçirgen niteliği donma/erime boyunca suyun içeriye ve dışarıya seyrine hâkim olan yüksek ehemmiyete sahiptir. Plazma zarı hücre içerisindeki ayrışabilir maddelerin dışa doğru çıkışının önüne geçmesini ve bundan mühim olan hücrelerarası buz oluşumunun plazma zarı içerisindeki alana hasar vermesinin önüne geçmeyi sağlamaktadır. Donma ve erime boyunca bu yapı ile ilgili ve işlevsel niteliklerin devamlılığı yaşamı idame ettirmekte rol oynar (Lewitt 1980). Hücre zarları esasında lipit ve proteinleri ihtiva ettiklerinden, membran hasarı ya lipit ya da protein veya bunlarda oluşan farklılaşmaların oluşması biçiminde ortaya çıkmaktadır. Plazma zarında hasar oluşma işleyişi üstünde tamamlanan incelemelerde don hasarı neticesinde proteinlerdeki sülfidril (SH)

1. GİRİŞ

sınıflarının oksitlenmesi, plazma zarı H^+ -ATPaz tepkimesinde düşüş olduğu tespit edilmiştir (Palta and Weiss 1993). Levitt'in SH varsayımı değerlendirildiğinde, plazma zarlarında don hasarı hücre zarı proteinlerinin parçalanmasına meydan vermektedir. Dondan kaynaklı hasardan ardından ayrışabilir protein -S-S- bağ oluşumunda sayı olarak yükseliş tespit edilmiştir. Moleküller arasında oluşan disülfid bağları protein moleküllerinin ayrışmamasını sürdürmektir. Arı SH ihtiva eden fermentler kullanılarak oluşturulan incelemelerde don olayı neticesinde bu fermentlerin aktif olmadığı tespit edilmiştir (Lewitt 1967).

1.2.3 Bitkinin Düşük Sıcaklığa Dayanımında Bitki Öz Suyunda Çözülebilir Maddelerdeki Değişimler

Düşük sıcaklık derecelerinin tesir ettiği alanlarda hayatını sürdüren bitkilerin su içerisinde ayrışabilen karbonhidrat ve amino asitleri yığmadığı ve bu moleküllerin don olayına karşı direncinde olumlu yönde rol aldığını hedefleyen araştırmalar yoğunlaşmıştır. Sakaroz, Fruktanlar, polyol ve prolin tarzı moleküllerin; bitkilerin düşük sıcak dereceleri ile karşı karşıya geldiği zamanlarda yapılarında topladığı tamamlanan araştırmalar neticesinde tespit edilmiştir (Smirnoff 1995a; Savitch et al. 2000). Karbonhidratlar bitkilerin düşük sıcaklıklara direncinde esas donma koruyucusudur. Sakkaroz don olayına karşı koyan bitkilerde genel olarak ihtiva edildiği saptanmıştır. Karbonhidrat düzeyinin uzun süre maruz kalınan düşük sıcaklık boyunca yaklaşık olarak 10 misli arttığı ve bu yığılımın don olayına karşı dirence tesir ettiği saptanmıştır (Guy 1990). Bu tesiri yüksek olasılıkla karbonhidratların letal hücre içi dondurucu sıcaklık değerini aşırı soğuk kademeye getirerek oluşturduğu tespit edilebilir. Bu moleküller ilaveten sitoplâzmadan dehidrasyonun önüne geçmek adına osmoprotektan şeklinde rol oynayarak don olayına karşı uyum sağlayabilmesi için hücreleri hazır duruma getirmektedir. Üstelik poteinlerin civarında yer alan suyun korunmasında destek olarak donmaya dirençte rol almaktadır (Smirnoff 1995a).

Buğday bitkisinde soğuk aklimasyonu boyunca prolin ve ayrışabilir şekerin toplandığı tespit edilmiştir (Vagujfalvi et al. 1999; Smallwood and Bowles 2002). Bu duruma ek olarak Yonca bitkisi üzerinde denenen çalışmada soğuk şartlara direnç boyunca prolin oranında artışın olduğu tespit edilmiştir (Dalmannsdottir et al. 2001).

1. GİRİŞ

Temel olarak prolin amino asidi, dayanım koşullarında bir korunma işleyişini sağlamak için oluşturulmaktadır (Aslantaş 2008). Kışlık buğday üzerinde yapılan araştırmada kış aylarında yapraklarında yer alan glikoz, fruktoz, sakkaroz ihtivalarında miktar olarak yükseliş olduğu tespit edilmiştir. Birçok araştırmada şeker ihtivasi ve çevresel faktörlere dayanım derecesi arasında olumlu yönde bir ilişki olduğu saptanmıştır ve daha fazla şeker ihtivasının soğuğa karşı stresi geliştirdiği tespit edilmiştir (Vagujfalvi et al. 1999).

Hücreler arasında akışkanlığa karşı direnç gösteren formasyon, dona dirençte ehemmiyetlidir ve bu hal dokunun şeker ihtivasıyla bağıntılıdır. Kavaktaki camsı oluşumun -20 °C dereceden düşük sıcaklıklarda meydana gelmeye başladığı tespit edilmiştir (Dalmanndottir et al. 2001; Wisniewski and Basett 2003). Norveç ve İzlanda menşeli iki yonca türü üzerinde araştırılan incelemelerde daha soğuk çevre koşullarında büyüyen Norveç türünde daha fazla kuru molekül yoğunlaşması meydana geldiği tespit edilmiştir. Eylül ayında nişasta ihtivasi Norveç türünde daha fazla oranda olduğu görülmüştür. Ancak Ocak ayına kadar nişasta ihtivasında kayda değer düşüş gözlemlenmiştir. Sakkaroz ihtivasi su içerisinde ayrışabilir, kuru madde içerisinde oransal olarak en büyük paya haiz olduğu görülmüştür. Ocak ayına kadar İzlanda türünde sakkaroz nispetinde kayda değer düşüş gözlemlenirken, Norveç türünde oransal düşüş gözlemlenmemiştir. Stolon ve köklerde sonbahar aylarında toplanmış olan nişasta kış aylarında ise bir karbonhidrat deposu sıfatıyla ihtiyacı karşılar. Nişasta ana metabolik etkinlikler için enerji temin eder ve hidrolize olarak ayrışabilir primitif şekerlere evrilir. Bunlar osmotik potansiyeli yükseltir, hücrelerin dona karşı olan dirençlerini artırmakta yardımcı olur (Dalmanndottir et al. 2001). Çeşitli yaşam alanlarında değişik meyve cins ve gruplarında dinlenme safhasında karbonhidratların dokulardaki rezervi ve soğuk hava koşullarına direnç ile bağıntılı durum olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda, Yalova koşullarında şeftali türlerinde (Burak 1989), Iğdır koşullarında kayısı türlerinde (Bolat 1995), Erzincan koşullarında kayısı türlerinde (Demirel 1997), ahududu türlerinde (Pallonen 1999), Fransa'da ceviz türlerinde (Ameglio et al. 2001), Doğu Anadolu Bölgesinden seçilen kuşburnu türlerindeki (Ercişli 2003) dokularında karbonhidratların mevsimsel farklılaşması ve don olayına karşı direnç ile kayda değer bağıntıların varlığı tespit edilmiştir.

1. GİRİŞ

1.2.4 Bitkinin Düşük Sıcaklığa Dayanımında Enzim Aktivitesindeki Değişimler

Sıcaklık derecelerinin varyasyonu ile bitki dokusunda meydana gelen enzimler sayesinde gerçekleşen tepkimeler de değişimler ortaya çıkmaktadır. Bitkinin bu koşullara uyum sağlaması, kalitatif ve kantitatif metabolizmaya ait farklılaşmaların oluşması ile ilişkilidir. Ferment yapısı ve tepkimelerindeki değişimler, farklı substrat ve etkenler ile ferment işlevinin ayarlanması sıcaklık şartlarına dayanım uyumunda olası meydana gelen olgulardır (Burke 1995). Bu aşamada çoğu ferment tepkimesindeki farklılaşmanın meydana geldiği yürütülen araştırmalarda tespit edilmiştir. Bu fermentlerin pek çoğu için çoğalan ferment tepkimesi yükselen gen ekspresyonu ile bağdaştırılmıştır. Buğday bitkisinde sakkaroz birikimi ve sakkaroz sintaz tepkimesindeki sayıca yükselişin, hem sakkaroz sintaz alt yapısını, hem de mesul mRNA sayısındaki artış ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Crespi et al. 1991). Ispanak bitkisinde 5 °C derecede sakkaroz sintaz tepkimesinin miktar olarak artışın soğuğa maruz bırakılan dokularda yer alan sakkaroz ihtivasındaki artış ile bağlantılı bulunduğu saptanmıştır (Guy et al. 1992). Bu fermentlerin birikimi düşük sıcaklık derecelerine direnç ve uyumunun neticesi olmaktadır ama don olayına direnç kazanma adına zorunlu bulunmamaktadır.

1.2.5 Bitkinin Düşük Sıcaklığa Dayanımında Antioksidant Enzim Sistemdeki Değişimler

Yapraklarını döken meyve çeşitleri, kış mevsiminde meydana gelen farklı biyotik ve abiyotik dayanım koşullarda (hastalığa neden olan etkiler, donma, kuruma v.s) yaşamlarını devam ettirebilmektedirler. Bu etapta askorbat peroksidaz, katalaz, glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz, polifenol oksidaz gibi antioksidant fermentler hücrelerin çerisinde tesirli oldukları ve dayanımların giderilmesine destek oldukları araştırmalarda kanıtlanmıştır (Tao et al. 1998; Baek et al. 2000; Porcel et al. 2003).

Soğuk aklimasyonu boyunca (0 °C-15 °C) H₂O₂ birikim oluşturabilmektedir. Aklimasyonun çoğunu meydana getiren biyotik ve abiyotik stres etmenleri, kloroplastlarda bulunan oksijen molekülünün indirgenmesi ya da aktif hale gelmesine sebebiyet veren düşük sıcaklık derecelerindeki dayanımda da oksijen radikallerinin

1. GİRİŞ

bitkinin hasar görmesinde pay sahibi olduğu tespit edilmiştir. Bu hasara sebebiyet veren radikallerin dayanım koşullarında meydana gelme olasılığının soğuk hava koşullarına karşı duyarlı bitkilerde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Hausladen and Alscher 1994b; Tao et al. 1998). Bitki hücrelerinde yer alan kloroplastlar, mitokondri, hücre zarlarında farklı elektron iletim zincir faktörlerinin otooksidasyon tepkimesi süperoksidin (O_2^-) meydana gelmesine sebebiyet vermektedir (Smirnoff 1995b). Hidroksil (OH^\cdot) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ile benzer öteki aktif oksijen farklılaşmış versiyonları birbiri ardına gelen indirgenme tepkimeleri ile O_2^- 'den meydana gelmektedir (Foyer 1993; Del Rio et al. 1996).

Bitki hücreleri oksidatif hasarın derecesini asgari seviyeye indiren, himaye edici ve onarım mekanizmasına haizdir. Çoğunlukla antioksidantlar iki sınıfta araştırılmaktadır. Birinci kategori antioksidantlar, aktif oksijen farklılaşmış türleri ile tepkime oluşturmaktadır ve böylece bu hasara sebebiyet veren radikallerin derecesini hasar eşliğinin altına indirmektedirler. Bu grupta yer alanlar; süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APx), katalaz (CAT), α -tokoferol ve askorbat'dır. İkinci kategoride yer alanlar; oksidasyon niteliğini azaltan antioksidantlardan oluşmaktadır. Bu grupta; dehidro askorbat redüktaz (DHAR), glutatyon redüktaz (GR), monodehidro askorbat redüktaz (MDHAR) ve glutatyon (GSH)'dur (Smirnoff 1993). Süperoksit dismutaz (SOD) reaksiyon vererek süperoksidi (O_2^-) H_2O_2 'ye çevirmektedir. Böylece süperoksit derece olarak daha az bir yoğunluğa indirgenir. Katalaz enzimi H_2O_2 'yi ayrıştırmaktadır. Fakat katalaz enzim reaksiyonu düşük (üşümeye neden olan) sıcaklıklarda ve bitki öldürücü nitelikteki yöntemler gibi dayanım koşullarında azalmaktadır (Smirnoff 1995b). Askorbat peroksidaz (APx) enzimi, kloroplast ve sitozol'de yer almaktadır ve oksidant olarak H_2O_2 ile reaksiyon vermektedir (Asada 1992). Askorbat aktif oksijenin hasar düzeyini indirmede kayda değer bir rol üstlenmektedir. Süperoksit dolaysız bir biçimde hidroksil ve hidrojen peroksit radikallerinin miktarını düşürebilmektedir (Foyer 1993). α -tokoferol başta gelen kloroplast zarlarında yer alan yeşil fotosentetik dokularda bulunmaktadır ve molekül biçiminde olan oksijenin nüfuzunu önleyici özelliğe haizdir. Bunlara ek olarak, lipid peroksidasyonunu karşılamada mühim bir etki göstermektedir (Smirnoff 1995b).

1. GİRİŞ

Bezelye bitkisindeki yapraklarda glutatyon redüktaz (GR) reaksiyonu stozol'de % 20-27, kloroplastlarda % 70-77, mitokondride % 3 olarak tespit edilmiştir (Veerson et al. 1990). Elma meyvesi kallus kültüründe soğuk aklimasyonu boyunca peroksidaz (POD) ve askorbat peroksidaz (APx) enzim reaksiyonları sayısal olarak yükselmeye başlamış ve aklimasyonun 10. gününe gelindiğinde azami düzeye vardığı tespit edilmiştir. Soğuğa maruz bırakılmak; glutatyon redüktaz ve dehidro askorbat redüktaz enzim reaksiyonlarında aşamalı bir şekilde yükselişe sebebiyet vermiştir. Farklı çeşitlerde de glutatyon redüktaz enziminin aktivitesi için yaklaşık aynı neticeler oluşmuştur. Bitki köklerinde yer alan antioksidant mekanizmalarının farklılaşması, netlik kazanmamıştır. Donma sıcaklık derecelerinde yüksek glutatyon redüktaz enziminin aktivitesi bir takım bitki çeşitlerinde tespit edilmiştir. Neticenin böyle olması üşümenin vereceği zarara dayanıma katkıda bulunduğu varsayılmaktadır (Scebba et al. 1998; Pearce 1999; Baek et al. 2000; Baek and Skinner 2006). Bitki hücrelerinde süperoksit dismutaz enziminin etkisi ile oksijen radikallerinin H₂O₂'ye çevrilmesi neticesinde, bu molekülün direnç işleyişi ile ilgili gen gruplarının indüklenmesinde bir sinyal molekülü olarak rol oynadığı belirlenmiştir (Tao et al. 1998; Baek et al. 2000; Baek and Skinner 2006). Bitkiler lignin ve süberin ihtiva eden hücre duvarı unsurlarının polimerleşmesinde rol oynadıkları tahmin edilen hücreler arası peroksidaz izoformları ihtiva etmektedir. Bu peroksidaz enzimleri yüksek hassasiyete sahiptir ve tepkimeler boyunca hücre duvarı ligninleşmede başlıca görev almaktadırlar. Bundan dolayı, hücre duvarlarının hücreleri dondan kaynaklı hasar oluşumuna karşı savunmada stratejik görev aldıkları kanıtlanmıştır (Baek et al. 2000).

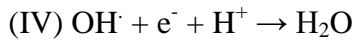
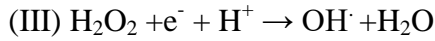
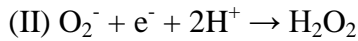
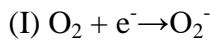
Soğuk hava şartlarına karşı dirençli bitkilerde adet olarak çok yüksek oranda tannik asit, fenilpropanoid, lignin ve süberin oluşumunun varlığı tespit edilmiştir (Teklemariam ve Blake, 2004). Kavak bitkisinde (*Populus suaveolens*) Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6PD) fermentinin tepkime oranının sonbahar mevsiminde yükseldiği ve ilkbahar mevsimine yaklaştıkça düşüş sergilediği tespit edilmiştir. Bunlara ilaveten bitki dallarında bu fermentin aktivitesinin engellenmesi ile dallarda hasar görülmesini etkilediği saptanmıştır. Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz ferment aktivitesinin aklimasyon oluşumu ile birlikte oransal olarak yükseldiği soya fasulyesi, muz, karaçayır, yonca bitki hücreleri kullanılarak tespit edilmiştir (Shanzhi et al. 2002). Don olayına karşı direnç seviyeleri farklılık gösteren şeftali bitki türlerinde peroksidaz, katalaz ve polifenol

1. GİRİŞ

oksidaz, antioksidant fermentlerinin direnç üzerine tesirlerinin belirlenmesi adına araştırma yapılmıştır.

Kış mevsimi boyunca çiçek tomurcuklarında yer alan piruvat ferredoksin oksidoredüktaz ve katalaz enzimi, yaprak tomurcuklarında ise peroksidaz ferment reaksiyonları çok fazla oranda farklılaşım sergilemişlerdir. Bu fermentlerin reaksiyon sayıları, bütün türlerin kış mevsimi boyunca organlarında oransal yükseliş sergilemiştir. İlkbahar mevsiminin ilk günlerinde enzim aktiviteleri düşmeye başlamıştır. Araştırmada piruvat ferredoksin oksidoredüktaz aktivitesi kış mevsiminin başlaması ile birlikte maksimum düzeye erişmesinin akabinde düşmüştür, şubat ayında ise oransal olarak biraz yükselmiştir. Bunun nedeninin ılık geçen Ocak ayı sonrasında soğuk Şubat ayı döneminin takip edilmesinden oluşabileceği tespit edilmiştir (Szalay et al. 2005).

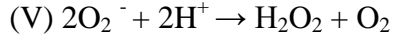
Soğuğa dayanım boyunca zehirli düzeyde H₂O₂ birikiminin önüne geçebilmek adına glutatyon redüktaz reaksiyon sayılarındaki yükseliş, stresin devam etmesi yönünden ehemmiyetlidir. Dışardan sistein verildiğinde glutatyon redüktaz reaksiyon sayılarının yükseldiğinden dolayı stres gelişmektedir. Bitkide oksidatif dayanıma sebebiyet veren aktif oksijen çeşitlerinin elektron iletim yöntemleri, farklı indirgenme ve yükseltgenme tepkimeleriyle antioksidant nitelikte ferment ve moleküller ile çeşitli versiyonlara evrilmektedir (Smirnoff 1995b). Bu versiyonlar;



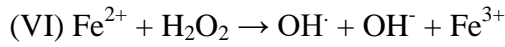
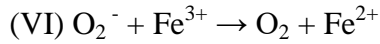
I numaralı tepkimede moleküler oksijen süperokside indirgenir. Bu tepkime hücre zarı elektron iletim mekanizmaları sayesinde meydana gelmektedir (endojenik biçimde oluşur). II, III ve IV numaralı reaksiyonlarda H₂O₂, OH[·] ve H₂O meydana gelmesine sebebiyet veren indirgenmeler kimyasal tepkimeler sonucunda meydana gelmektedirler (ekzogenik biçimde oluşur). Canlı organizmalarda süperoksit

1. GİRİŞ

kullanılarak aktif oksijen çeşitlerinin meydana gelmesi süperoksit dismutaz enzimiyle O_2 'nin H_2O_2 'ye çevrilmesi ile tetiklenmektedir.



H_2O_2 süperoksitin indirgenmesi $OH\cdot$ radikalleri meydana getirmektedir. Bu tepkimede iyonlar tepkime hızını arttırmaktadır, katalizör olmaktadır.



1.3 Bezelye (*Pisum sativum arvense* L.)

Baklagiller, bitkiler dünyası içerisinde 650'den fazla cins ve 18,000 tür ile 3. büyük familya olma özelliğini taşırlar. İnsanların beslenme zincirinde birincil protein ve karbonhidrat kaynaklarından olan baklagiller önemli miktarda protein ve amino asit içerdiklerinden, bilhassa az gelişmiş ülkelerin protein kaynaklarından en önemlisi olarak bilinmesinin yanı sıra hayvan besisinde de kaba yem ve kesif yem olarak kullanıldığı bilinmektedir. Öte yandan baklagillerin, üretildikleri toprakların niteliklerini iyileştirmeleri yönüyle de üretim düzeninde hatırı sayılır bir konumu vardır. Rhizobium bakterileri ile meydana getirdikleri müşterek yaşam sebebiyle sağladıkları azot niceliği, 6.4 kg/da ile 21.6 kg/da arasındadır. Bezelyenin insan ve hayvan beslenmesinde mühim bir konumu olmasıyla beraber fabaode alt familyasında, fabae takımında pisum cinsine bağlı bir baklagil çeşididir. Geçtiğimiz yıllarda üretimi yapılan bütün bezelyelerin oluşturdukları *pisum sativum* L. türünün 2 farklı türü vardır. Beyaz çiçekli ssp. *sativum* yeşil ve kuru taneleri için yetiştirilen yemeklik bezelye veya bahçe bezelyesi, mor çiçekli ssp. *arvense* ise ot ve tane yem amacıyla yetiştirilen yem bezelyesi olarak isimlendirilir. Fakat bazı ülkelerde yem bezelyesi hayvan beslenmesinin yanı sıra insan beslenmesinde de tüketilmektedir. (Açıkgöz 2001).

1. GİRİŞ

Bezelye, çift kromozom sayısı $2n=2x=14$ olan, kendine döllek ve haploid genom büyüklüğü 4.45 Gb ile mühim bir baklagildir (Dolezel and Greilhuber 2010). Bezelyenin primer gen merkezinin Doğu Akdeniz, İran, Kafkasya, Afganistan ve Tibet'e kadar olan bölgeler, sekonder gen merkezinin de Güney Batı Arabistan üzerinden Etiyopya ve Kuzey Afrika'ya kadar devam eden bölgeler olduğu ortaya konulmuştur (Govorov 1937; Davies 1976; Hagedorn 1984). Shoemaker (1953) Etiyopya'yı; Watts and Watts (1954) Etiyopya, Akdeniz kıyıları, Güney Batı Asya'yı, Höslin (1964) Akdeniz ülkelerini ve Etiyopya'nın bezelyenin gen özeği olduğunu belirtmişlerdir. Bulundurduğu fazla miktarda protein ve vitaminler sebebiyle yaş ve kuru sebze olarak kullanılan bezelyeden aynı zamanda unu kullanılarak çocuk mamasında ve bir takım karışımlarda önemli besin ögesi olarak yararlanılmaktadır. Aynı zamanda, bezelye yeşil ve kuru otunun yanı sıra, tanesinden de hayvan beslenmesinde yararlanılmaktadır. Bezelye atmosferdeki serbest azotu sabitleştirmesiyle de düşük girdili tarım düzenlerinin iyileştirilmesinde yararlanılabilecek baklagil bitkilerinin en önemlilerindedir. Kuru bezelye dünyada baklagiller içerisinde üretim bakımından fasulyeden sonra ikinci sıradayken (Skyrpetz 2004), ülkemizde ise nohut, mercimek, fasulye ve baklanın ardından beşinci sırada bulunmaktadır.

Ülkemiz bezelye yetiştirilmesi açısından oldukça ekonomik ve çevreye dost bir yapıya sahip olduğu halde, kuru bezelye üretimi olması gerektiği düzeyde değildir. Düşük üretimin en önde gelen sebeplerinden biri de, ülkemizin değişik bölgelerinde yetiştirilebilecek bezelye türlerinin geliştirilememesidir. Ülkemizde bezelyenin yetiştirilmesindeki problemlerin çözülmesi ve ihracatın artırılması doğrultusunda gereken tedbirler alınmalıdır. Ekim alanın az olmasıyla aynı doğrultuda olarak ülkemizde yetiştirilen yemeklik baklagil cinsleri arasında bezelye, yerli tescilli çeşit miktarı açısından en yoksul olanıdır. Ülkemizde kuru tane amacıyla tüketimine dair hiçbir tescilli çeşit yokken, taze tüketim amacı ile günümüze değin 11 adet çeşit, tescilli veya üretim iznli olarak piyasada bulunmuştur. Bu çeşitlerden de yalnızca biri (Marmara) ülkemizde ıslah yoluyla oluşturulmuştur (Karayel ve Bozoğlu 2008). Ülkemizde yem bitkilerinin tarımı içerisinde yem bezelyesi ekim alanlarının az bir alan oluşturmasının yanı sıra, ülkemizde kaliteli kaba yem ve tane yem niyetiyle büyük bir yetiştirme gücündedir. Ülkemiz bezelye gen merkezleri içerisinde gösterilmesinin aksine, bezelye genetik kaynaklarının ülkemizde yürütülen bezelye ıslah çalışmalarında yeteri kadar değerlendirildiğini söylenememektedir. Ülkemizde yetiştirilen bezelye çeşit

1. GİRİŞ

sayısının ve üretim miktarının düşük olması bu durumun en önemli işaretidir. Bundan dolayı, ülkemizde bezelye gen menşeleri bakımından var olan zenginliğin ilgili araştırmalarla sergilenmesi, bunların yeni çeşit geliştirme ve alternatif tarım sistemlerinde kullanılması, çok önemlidir.

Bezelyede yerel gen kaynakları kullanılarak geliştirilen yeni çeşitler yardımıyla kalite ve üretim artışının gerçekleştiği birçok araştırmacı aracılığıyla ortaya konulmuştur. Bezelye ıslahına dair ülkemizde sürdürülen bazı çalışmalarda, ticari çeşitlerin zayıf olduğu ve yeni çeşitlerin üretilmesi gerektiği konusunda son zamanlarda çalışmalar hızlanmış ve belirli noktalara gelinmiştir. Akdeniz bölgesi koşullarında yürütülen araştırmalarda kışlık bezelyede tane verimini 197.3-339.0 kg/da (Anlarsal et al. 2001); Toklu et al. (2009) 181.9-309.8 kg/da; Ton et al. (2014) 124.0-200.6 kg/da olarak belirlenmiştir. Fakat ıslah çalışmalarında en mühim problem olan varyete kaynağının sınırlı olmasının bu çalışmalardaki başarı imkânını azalttığı, uygun ebeveyn seçimiyle geniş bir varyete kaynağı oluşturulabileceği ve amaca uygun yeni hatlar geliştirilebileceği açıklanmıştır. Kışı ağır olan bölgelerimizde soğuğa dirençli yemeklik bezelye ve yem bezelyesi türleri oluşturulduğunda, bitkinin hem vejetasyon zamanının uzaması, hem de yağışlardan daha iyi faydalanması sebebiyle yazlık ekimlere kıyasla daha iyi olması ve tane mahsulün artması umulmaktadır. Sivas gibi kışları fazla soğuk geçen bölgelerde genel olarak kıraç alanlarda tahıl-nadas üretim sisteminin uygulandığı bilinmektedir. Erkenci ve soğuğa dayanıklı bezelye genotiplerinin belirlenip bölgede yetiştirilebilme imkânlarının belirlenmesiyle buğdaya alternatif bir ürün olarak değerlendirilebilecektir. Bu olanağın sulanabilmesi bölgelerde aynı sene içinde ikinci ürün alınabilme olanağı gerçekleşecektir.

Bezelye dünyada önemli bir baklagil mahsulüdür. Ekinler sürdürülebilir tarım sistemlerinde önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, ilkbaharın başında ve sonbaharın sonunda kırağılaşma büyüme mevsimini sınırlı bir süre ile kısıtlayarak bezelye mahsulüne zarar verir (Tan et al. 2012). Soğuk stresin bezelyenin fizyolojik ve biyokimyasal niteliğini etkilediği belgelenmiştir. Soğuk stresin bezelye üretimindeki etkisi göreceli olmasına rağmen önemi anlaşılmıştır (Noreen and Ashraf 2009; Shahidet al. 2012).

1. GİRİŞ

Bu çalışma farklı bezelye ıslah hatlarının soğuk direncini değerlendirmek, kontrollü koşullar altında yetiştirmek ve yaygın olarak kullanılan bezelye ıslah hatlarının ölümcül sıcaklık değerlerini belirlemek, bezelye bitkilerinin soğuğa karşı dirençlerinde enzimatik aktivitelerdeki değişimleri tanımlamak adına gerçekleştirilmiştir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Shewfelt and Ericson (1991) lipid peroksidasyonunu, bitki dokusunun zara bağılı çeşitli bozukluklarında gözlemlemişlerdir ancak bunun bir bozukluğun nedeni veya bir etkisi olup olmadığının açık olmadığını vurgulamışlardır. Bu bakış açısı, oksidatif stres kaynakları ve bitki zararlarının savunması hakkındaki mevcut bilgilerin gözden geçirilmesi gerektiğini söylemişlerdir. Peroksidasyonun kritik, kontrol edilebilir olayı temsil ettiği bitki membranlarının bozunması için birleşik bir mekanizma olduğunu öne sürmüşlerdir.

Baek et al. (2000) kışı geçiren bitkiler, kış aylarında meydana gelen çeşitli biyotik ve abiyotik strese dayanması gerektiğini söylemişlerdir. Önceki çalışmalarda aktif oksijen türlerinin donma, dehidrasyon, anoksi ve patojen enfeksiyonlarında rol oynadığını gösterdiğinden bahsetmişlerdir. Hücreler arası bölümlerde meydana gelen olayların önemi, hastalık direncinde belirginleştikçe kışlık arpa muhtemel katılımlarını sağlamak için hücreler arası antioksidan enzimlerin doğasını incelemişlerdir. Birim protein bazında hücreler arası peroksidaz, katalaz ve SOD aktivitelerinin seviyeleri sırasıyla, hücre aktivitelerinin % 394, % 18 ve % 9 olduğunu göstermişlerdir. Başlıca hücreler arası peroksidaz izoformları, 4 nötr ve 4 temel formdan oluşur; major hücresel izoformlar iki temel formdur. Bu çalışmada, 2 ana katalaz izoformunun dışında, daha yüksek bir moleküler ağırlık formu hem hücresel hem de hücreler arası bölümlerde ağırlıklı olarak bulunmuştur. 5 ana hücresel SOD izoformu arasında, 3 hücre içi bölümlerde mevcut olduğunu tespit etmişlerdir. Kışı geçiren arpa yapraklarında önemli miktarda hücre içi antioksidan enzimin varlığı, bu enzimlerin kış aylarında meydana gelen çeşitli streslere tolerans mekanizmasına dahil edilmesinde kullanıldığını belirlemişlerdir.

Pearce (2001) hücre dışı buzlanma, donmaya karşı toleranssız türlerin yanı sıra donmaya karşı toleranssız türlerde oluşacağından ve hücresel dehidrasyona neden olacağından bahsetmiştir. Donma hasarının en önemli tek nedeni, bu dehidrasyonun hücrelerin tolere edebileceği şeyleri aşmasıdır. Donmaya adapte edilmiş türlerde, ölümcül donmaya bağlı dehidrasyon hücre zararına zarar verir. Özel durumlarda, başka faktörler de hasara neden olabilir, derin süper soğutma sınırlamaları aşıldığında örnekler

2. KAYNAK ÖZETLERİ

hücre ölümü ve ksilem damarlarındaki donma kaynaklı emboliler devam ederken sürgünlerin ölümü olabilir. Hücre dışı buz kütleleri, organların yapısına zarar verebilir, ancak bu, tomurcukların organ dışı dondurulmasında olduğu gibi tolere edilebilir. Balık antifriz proteinlerinin genetik olarak ifade edilmesine yönelik deneylerde, hassas türlerin donma toleransını iyileştirmediğini göstermiştir. Hücresel dehidratasyonun toleransını sağlamak için daha iyi bir strateji olabileceğini savunmuştur.

Ruiz et al. (2002) Bu çalışmada prolin metabolizması ile NAD kinaz aktivitesi arasındaki ilişkiyi soğuk şoka maruz kalan yeşil sebzelerde incelemiştir. Bunun için 15 günlük yeşil sebzeler, 180 dakika boyunca 4 °C'lik bir sıcaklığa (soğuk şok) maruz bırakılmıştır. Sonuçlar, bitkilerin soğuk şok altında bu birikimde belirleyici olarak görünen ornitin-AT-aminotransferaz (OAT) ve prolin dehidrogenaz (PDH) enzimleriyle yapraklarda prolin birikimi gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, Ca^{2+} -CaM'ye bağlı NAD kinaz aktivitesi ile prolin metabolizması arasında yakın bir ilişki bulunmuştur. Bu adaptif tepkilerin veya bitkilerin soğuk strese uyumunun, artan $[Ca^{2+}]$ cyt'den önce geldiğini ortaya koymuştur. Yeşil bitkiler soğuk şoka maruz kaldığında Prolin biriktirmişler ve OAT ve CaM'ye bağımlı NAD kinaz aktiviteleri arttırdıkları gözlemlenmiştir.

Wisniewski and Basett (2003) soğuk aklimasyon, çoklu genlerin ekspresyonunu içeren karmaşık bir işlemdir ve yeni tekniklerin geliştirilmesi, soğuk tedaviler de dâhil olmak üzere çeşitli uyaranlara cevap veren çok sayıda genin tanımlanmasını kolaylaştırdığını göstermişlerdir. Bu araştırma yalnızca dona duyarlı türlerin yaşadığı don olaylarına kısa süreli maruz kalmaya izin veren soğuk tolerans ile ilgili olabileceği öne sürülmüştür. Ağaçların uzun süre aşırı düşük sıfır altı sıcaklıklara dayanmalarını sağlayan mekanizmaların tamamen farklı olabileceğinin muhtemel olduğunu savunmuşlardır. Moleküler biyoloji, genomik ve metabolomiklerin ortaya çıkmasına rağmen bireysel gen fonksiyonlarını ve biyokimyayı anlamının önemli olduğundan bahsetmişlerdir.

Reyes-Diaz et al. (2006) donmaya dayanıklılı tür olarak tanımlanan *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. bitkisini kullanmışlardır. Bu bitki türünün iki yabancı genotiplerini (Columbia ve Ler) ve donma dirençlerini farklı olan mutantları (sırasıyla esk-1 ve frs-1)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

kullanmışlardır. Tüm genotiplerde soğuk aklimasyon sırasında maksimum fotokimyasal verimi (F_v / F_m) ve pigmentleri (klorofil ve karotenoid) ölçmüşlerdir. Soğuk aklimasyona tabi tutarak Columbia ve esk-1 yapraklarında toplam çözünür karbonhidratların arttığını gözlemlemişlerdir.

Noreen and Ashraf (2009) bu çalışma, genetik olarak çeşitli dokuz bezelye (*Pisum sativum*) çeşidinde, antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki değişikliklerin ve bazı enzimatik olmayan antioksidanların seviyelerinin, tuz toleransı belirteçleri olarak kullanılıp kullanılmayacağını açıklamıştır. Bütün çeşitler kum kültüründe 4 NaCl seviyesine, yani 0, 40, 80 ve 120 mM'a maruz bırakılmıştır. Bitkilerin taze biyokütle, toplam fenolikler, toplam çözünür proteinler, hidrojen peroksit (H_2O_2), malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) yapraklarda farklı tokoferoller (α -, γ - ve Δ -tokoferol), taze ve tuzlu stresli bitkilerin tohumlarında analiz edilmiştir. Tuz stresi, SOD ve POD aktivitelerini, toplam fenolik ve γ - ve Δ -tokoferollerin seviyelerini belirgin bir şekilde arttırmıştır ve toplam çözünür protein ve CAT aktivitesini azalttığı halde, H_2O_2 'nin iç seviyeleri tüm bezelye çeşitlerinde etkilenmemiştir. Tüm bezelye çeşitlerinde tuza bağlı oksidatif stres meydana gelse de bu çalışmada ölçülen enzimatik ve enzimatik olmayan metabolitlerin üretilmesine göre tuza toleranslı ve tuza duyarlı çeşitlerin tepkisi tutarlı değildir. Analiz edilen farklı antioksidan enzimler ve metabolitlerden sadece CAT aktivitesinin, incelenen bezelye çeşidinde, tuz toleransının güvenilir bir işareti olduğunu bulmuşlardır.

Hashempour et al. (2014) antioksidan enzimlerin aktivitesindeki, total protein ve prolin içeriğindeki değişiklikler ve donma toleransı (FT) ile korelasyonları (LT_{50} olarak ifade edilir), 11 farklı zeytin çeşidinde soğuk iklimlendirmede (CA, Şubat ayında) ve soğuk iklimlendirme olmayan (NA) Ağustos ayında) aşamaları incelenmiştir. Her çeşitten yaprak örnekleri toplanmıştır ve iki gruba ayrılmıştır. İlk grup daha fazla biyokimyasal analiz için hemen sıvı azot içinde dondurulmuştur. İkincisi, FT'lerini belirlemek için 10 saat boyunca farklı donma sıcaklıklarına (-5 , -10 , -15 ve -20 °C) maruz bırakılmıştır. Donmamış kontrol numuneleri 4 °C'de tutulmuştur. Sonuçlar, Fishomi, Mission ve Shengeh'in diğer çeşitler arasında en donuk toleranslı olduğunu göstermiştir. Buna karşılık, Zard, Manzanilla ve Amigdalolia en hassas olanları olmuştur. Soğuk aklimasyon, süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD), askorbat

2. KAYNAK ÖZETLERİ

peroksidaz (APX), katalaz (CAT), polifenol oksidaz (PPO) ve toplam protein içeriğinin aktivitelerini arttırmıştır. Bununla birlikte, prolin içeriği ve fenilalanin amonyak-liyaz (PAL) aktivitesi, CA evresindeki örneklerle karşılaştırıldığında CA evresinde değişmemiştir ve hatta biraz azalmıştır. LT₅₀'nin CA ve NA aşamalarında POD, CAT ve PPO aktivitesi ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. Genel olarak, yüksek yapraklı POD, CAT ve PPO aktivitesi, soğuk bölge iklimi için toleranslı zeytin çeşitlerinin taranmasında önemli seçim kriterleri olarak kullanılabileceğini ortaya çıkarmışlardır.

Anlarsal vd (2016) Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü Araştırma Deneme Alanı'nda, sürdürülen bu çalışmada; değişik alanlardan toplanan 130 adet bezelye genotipi ile 4 adet ticari çeşit, Sivas ekolojik şartlarında kışa dayanıklılık seviyelerinin belirlenmesi için kullanmışlardır. Bu çalışmada, soğuğa dayanıklılık (1-5), bitki boyu, ilk bakla yüksekliği, bitkide bakla âdeti, bitkide tane sayısı, 100 tane ağırlığı ve tane verimi gibi agronomik ve morfolojik nitelikler değerlendirilmiştir. İstanbul, Kars, Diyarbakır, Bolu ve Sivas orijinli toplam 5 adet bezelye yerel genotipleri soğuğa yüksek düzeyde dayanıklı; Adıyaman, Elazığ, Kastamonu, Malatya, Sakarya, Tokat, Afyon, Bingöl, Konya, Karaman, Van, Hakkâri ve Şırnak orijinli bezelye genotiplerinin ise soğuğa dayanıklı oldukları saptanmıştır. Denizli, Edirne, Kırklareli, Manisa, Kahramanmaraş, Giresun, Ordu menşehirli bezelye genotipleri ve Ulubatlı, Kirazlı bezelye türleri soğuğa orta düzeyde dayanıklı olduklarının tespitini yapmışlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Araç ve Gereçler

Çizelge 3.1 Faydalanılan araç ve gereçler

| Kullanılan Araç | Firma |
|--------------------------|-----------------------------|
| Buzdolabı | Arçelik |
| Derin dondurucu (-30 °C) | Arçelik |
| Derin dondurucu (-80 °C) | Harris, İngiltere |
| Hassas terazi | Shimadzu AY220 |
| Homojenizatör | Wiggen Hauser D- 500 |
| İklim dolabı | Sanyo, Japonya ve Jeno Tech |
| Karıştırıcı | Fisons Whirlimixer |
| Manyetik karıştırıcı | Chiltern HS31 |
| Masa santrifüjü | Hettich EBA 21 |
| Otomatik pipetler | Ependhof, Axigen |
| pH metre | WTW unilab pH metre |
| Soğuk su banyosu | Huber Polystat CC1 |
| Soğutmalı santrifüj | Hettich Micro 22 R |
| Spektrofotometre | Shimadzu UVmini-1240 |

3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çizelge 3.2 Kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildiği firmalar

| Kimyasal | Firma |
|---------------------------------|-------|
| Asetik Asit | Sigma |
| Asit Ninhidrin | Merck |
| Askorbik Asit | Sigma |
| Sodyum Di-Hidrojen Fosfat | Sigma |
| Etilen Diamin Tetra Asetik asit | Sigma |
| Fosforik Asit | Sigma |
| Hidrojen Peroksit | Merck |
| Nitroblue Tetrazolium Klorür | Merck |
| Potasyum Di-Hidrojen Fosfat | Merck |
| Riboflavin | Merck |
| Sodyum Hidroksit | Merck |
| Sodyum Hipoklorit | Merck |
| Sülfosalisilik Asit | Sigma |

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.3 Çözeltilerin Hazırlanmaları

Araştırmada yararlanılan çözeltilerin faydalandığı yerler ve hazırlanış biçimleri aşağıda paylaşılmıştır.

1. 103,5 mM KH_2PO_4 , pH:7,5 (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 1,41 gram KH_2PO_4 , 70 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH:7,5'e ayarlanmış ve hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

2. 40 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 346 μl %35'lik H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

3. 5 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan): 43 μl %35'lik H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

4. 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7,8) (SOD için tampon çözelti): 1,7 gram KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, pH: 7,8'e ayarlandıktan sonra ve hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.

5. 13 mM metiyonin çözeltisi (SOD reaksiyon karışımı için): 0,586 gram metiyonin alınır, hazırlanmış olan 250 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülmüştür.

6. 63 μM NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür (SOD reaksiyon karışımı için): 0,0128 gram NBT alınır, hazırlanmış olan 250 ml 50mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülmüştür.

7. 0.1 mM EDTA-Etilen Diamin Tetra Asetik asit (SOD reaksiyon karışımı için): 0,073 gram EDTA alınmıştır, hazırlanmış olan 250 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine eklenerek çözülmüştür.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

8. 13 µM riboflavin (SOD aktivitesi için 2. çözelti): 0,019 gram riboflavin, 500 ml saf suda çözülmüştür ve 3 ml'lik reaksiyon karışımının 13 µM riboflavin içermesi için 390 µL riboflavin alınmıştır.

9. 0,5 mM askorbik asit, 0,1 mM (1µl) H₂O₂, 0,1 mM EDTA , 50 mM NaH₂PO₄ (APX aktivitesi için): 0,0088 gram askorbik asit, 0,0029 gram EDTA, 0,78 gram NaH₂PO₄ 80 ml saf suda çözülmüştür ve pH:7,0'a ayarlanmıştır. Son hacim 100 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

10. %3'lük sülfosalisik asit (prolin içeriği için homojenizasyon çözeltisi): 0,3 gram sülfosalisik asit 10 ml saf su içerisinde çözülmüştür.

11. Asit ninhidrin hazırlanışı (prolin içeriği için): 1,25 gram ninhidrin 30 ml asetik asit ve 20 ml fosforik asit içerisinde çözülmüştür.

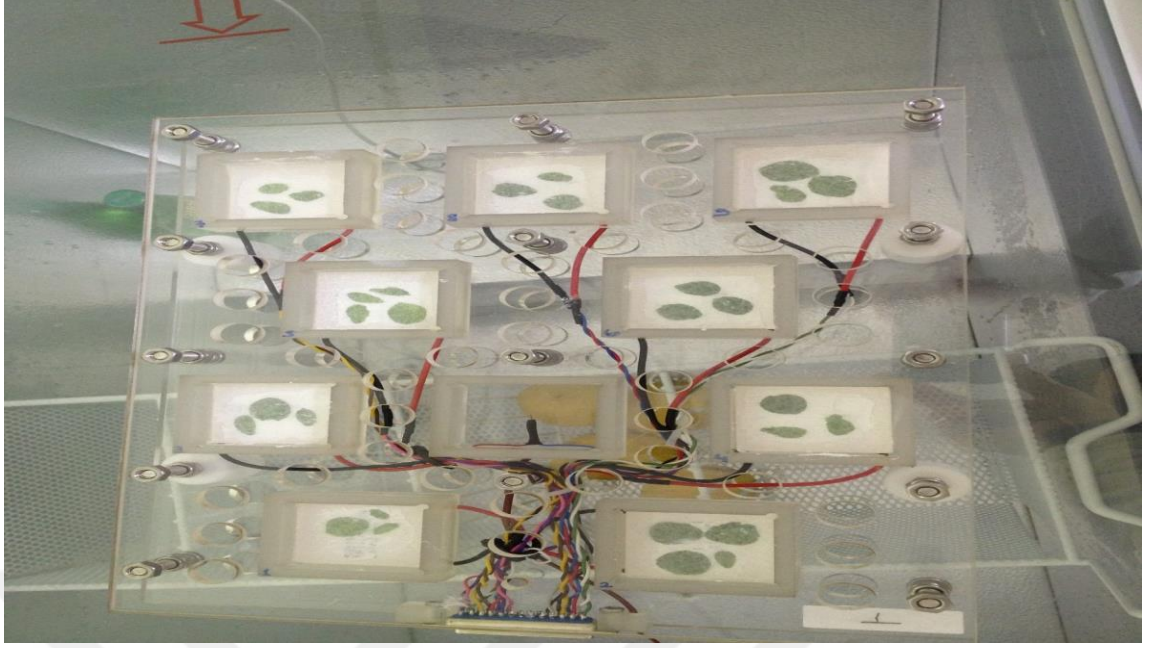
3.4 Bitki Materyali ve Büyüme Koşulları

Bezelye (*Pisum sativum arvense* L.) Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen 25 ıslah hattı ve 6 adet yerel çeşidin tohumları deneme materyali olarak kullanılmıştır. Deneylerden önce, tohumlar su / çamaşır suyu (10:1, ticari NaOCI) ile 10 dakika boyunca yüzeyleri sterilize edilmiştir ve daha sonra üç kez arıtılmış su ile yıkanmıştır. Tohumlar plastik kaplara ekilmiştir ve 1:1:1 oranında toprak: kum:torf karışımı ile doldurulmuştur. Bezelye bitkileri 25/15 °C gündüz / gece sıcaklığı olan bir serada çoğaltılmıştır. Bitkiler düzenli olarak sulanmış ve gübrelenmiştir. 10 gün sonra, bezelye ıslah hatları ve çeşitleri diferansiyel termal analize ve soğuk aklimasyona tabi tutulmuştur.

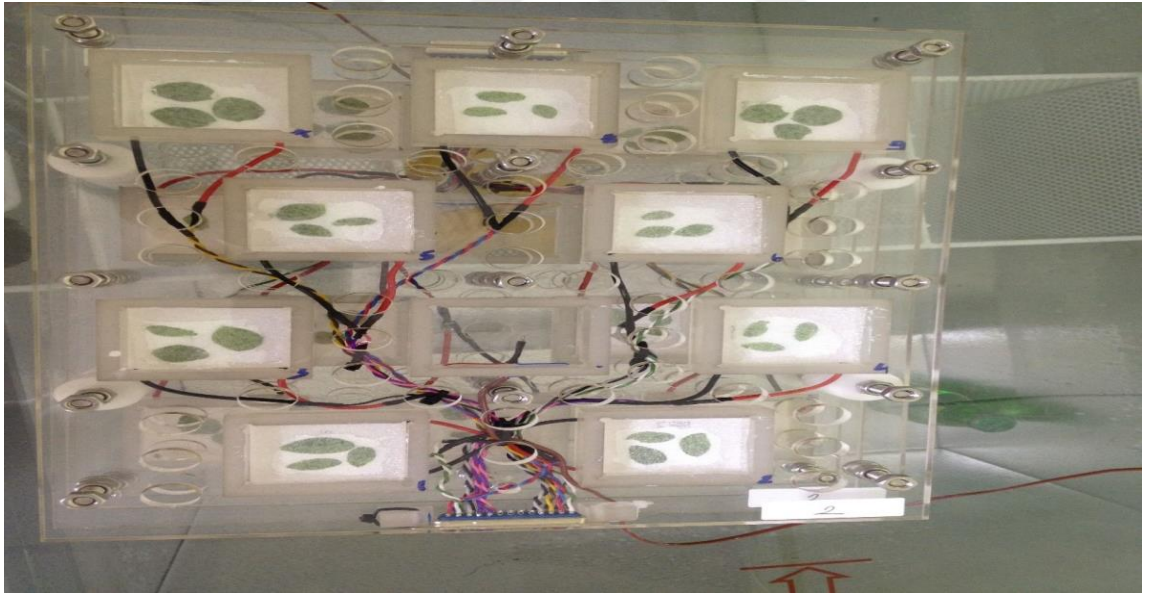
3.5 Soğuğa Karşı Direncin Belirlenmesi

Toplam 25 bezelye ıslah hatları ve 6 çeşit önceki yıllarda yapılan çalışmalardan seçilmiştir. Soğuğa direnci belirlemek için her ıslah hattından ve çeşitlerinden üç bezelye bitkisi seçilmiştir. Yaprak örnekleri 25 ıslah hattından ve 6 çeşitten standart parçalar halinde elde edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

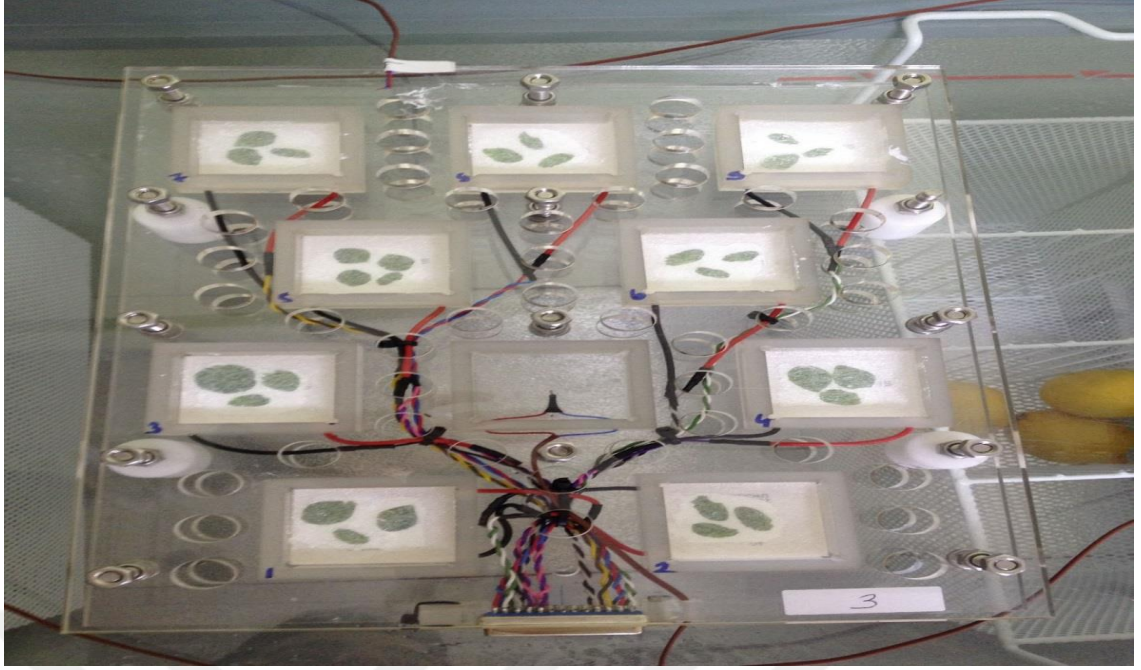


Şekil 3.1 Termal ekzoterm sıcaklık ölçümü için yerleştirilen ıslah hatları, 1.kabinet, (Köse ve Kaya 2018)



Şekil 3.2 Termal ekzoterm sıcaklık ölçümü için yerleştirilen ıslah hatları, 2.kabinet, (Köse ve Kaya 2018)

3. MATERYAL ve YÖNTEM



Şekil 3.3 Termal ekzoterm sıcaklık ölçümü için yerleştirilen ıslah hatları, 3.kabinet, (Köse ve Kaya 2018)

Termal ekzoterm sıcaklık ölçümü tablanın üst kısmından yapılmıştır ve sinyal gürültüsünün kontrolü için tablanın sol tarafı bırakılmıştır, tüm TEM (termal ekzoterm sıcaklık ölçümü)'ler için ortaktır. Dokular ve TEM arasında yeterli teması sağlamak için sağlıklı yaprakların üzerlerine köpük yalıtım pedleri (4 cm x 4 cm x 9 mm boyutlarında) yerleştirilmiştir. Bölme kapağı sıkıldıktan sonra bölmeler dondurucuya yerleştirilmiştir. Dondurucuda 4 bölmeye kadar istiflenmiştir ve çalışma başına maksimum 35 TEM yüklenmiştir. Dondurucu, 1 saat boyunca 4 °C'de tutulacak şekilde programlanmıştır ve 11 saat sonra -20 °C'ye düşürülmüştür (soğutma hızı 4 °C/ saat), -20 °C'de 1 saat bekletilmiştir (bir ısıtma oranı 4,4 °C/ saat). DAS sinyalleri kaydedilmiştir, her TEM'den 15 sn aralıklarla yüklenen voltaj çıkışı doğrudan Excel'e aktarılmıştır. Ekzoterm, termistör verisinin bir çiziminden manuel olarak tanımlanmıştır (x eksen), karşı yüklü TEM verisi eksi, boş TEM verisi (y eksen) olacak şekilde tanımlama yapılmıştır. Yaprakların öldürücü sıcaklıkları sırasıyla % 10, % 50 ve % 90 oranında yaprak ölümü ile rapor oluşturulmuştur (Andrews vd. 1984). Bu değerler yaprakların ekzoterm aralığından ve dağılımından (her TEM üzerindeki yapraklar açıkça görülebiliyor) belirlenmiştir. Bezelye için, ölümcül sıcaklık yaprak dokusu LTE₁₀ olarak raporlanmıştır.

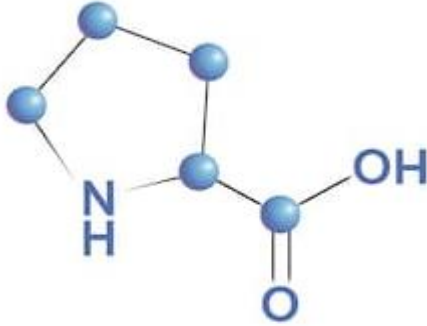
3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.6 Soğuk Aklimasyon Tedavisi

Soğuğa dayanıklılığı belirlenmek için her ıslah hattından ve çeşitlerden 3 bezelye bitkisi seçilmiştir. Soğuk aklimasyonu için 10 günlük fidanlar 4 °C'de ayarlanmış bir büyüme odasında inkübe edilmiştir. 21 gün boyunca belirli ışık şartlarında (gündüz / gece 16/8 saat fotoperiyod, 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık) ve bağıl nem (% 65) ile soğuk tedavi işlemi indüklenmiştir.

3.7 Prolin Tahli

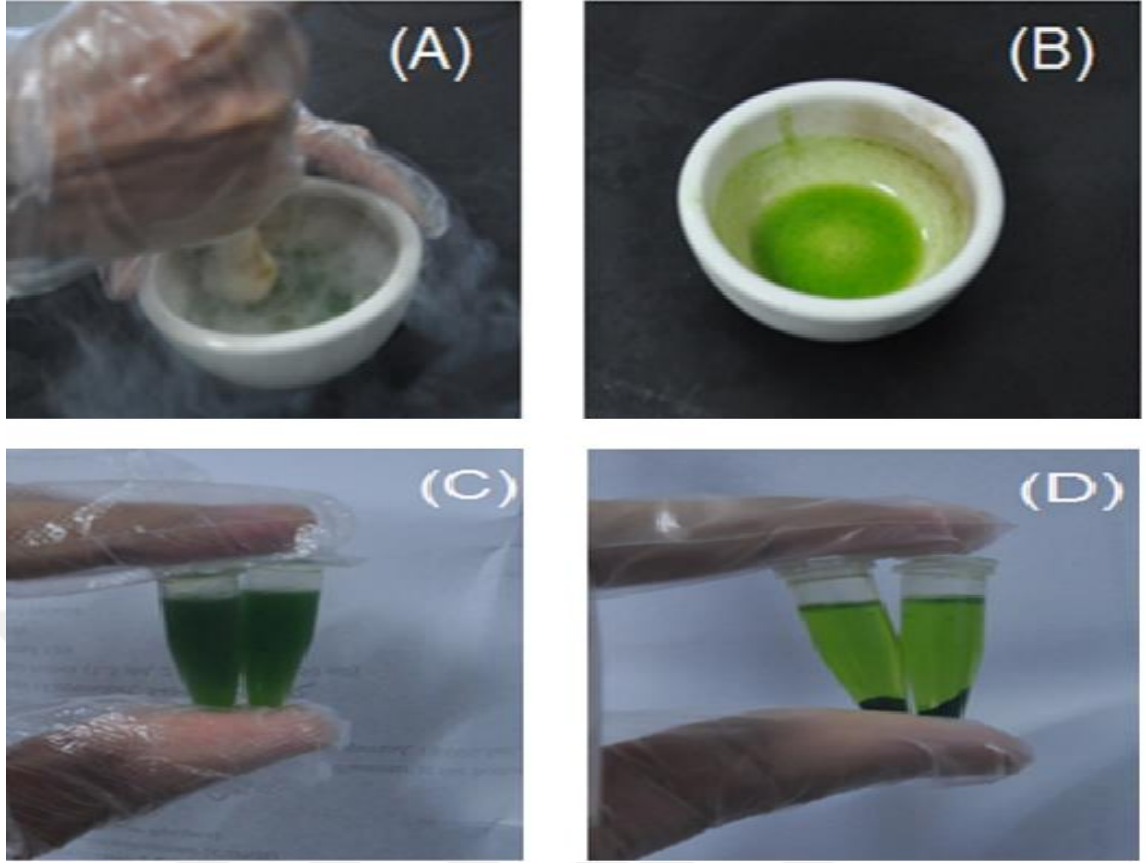
Her ıslah hattından üç bezelye bitkisinin prolin içeriğini belirlemek için seçimi yapılmıştır. Yaprakların prolin içeriğini belirlemek için ninhidrin asit yöntemi kullanılmıştır (Bates et al. 1973).



Şekil 3.4 Prolin kimyasal yapısı

Yaprak örnekleri % 3'lük (ağırlık / hacim) sülfosalisilik asit sulu çözeltisi ile havanda ezilmiştir ve oluşan homojenat, Whatman (no:1) kâğıdı ile filtreleme işlemine tabi tutulmuştur ardından oluşan özün 2 mililitresi, buzlu asetik asit ve 2 ml asit ninhidrin ile karıştırılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM



Şekil 3.5 Yaprak örneklerinin sülfosalisilik asit sulu çözeltisi ile ezilmesi (A-B), ekstraktın buzlu asetik asit ve 2 ml asit ninhidrin ile karıştırılması (C-D), (Chen et al. 2016)

Reaksiyon karışımı 1 saat 100 °C'de inkübe edilmiştir ve sonra 20 dakika boyunca buz üzerinde bırakılmıştır. Reaksiyona karışımına 4 mililitre toluen ilave edilmiştir. Santrifüjden sonra, organik faz kuvars küvet içine ekstrakte edilmiştir ve absorbansı 520 nm'de ölçülmüştür. Bu işlem tolüene karşı boş olarak ve UV-görünür spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır.

3.8 Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Antioksidan enzim aktivitelerini belirlenmek için her ıslah hattından ve çeşitlerinden üç bezelye bitkisi seçilmiştir. Yaprak örnekleri (0.5 g) tampon çözelti ile ezilmiştir ve buzda soğutulmuştur, 0,1 ml içeren metilenedinitrilotetra asetik asit (EDTA) 0,2 M fosfat tamponu (pH=7) ile homojenize edilmiştir. Öz, 12,000 rpm'de 15 dakika süreyle 4 °C'de santrifüjlenmiştir. Üst faz, APX, SOD ve CAT enzimlerinin aktivitesini ölçmek için kullanılmıştır. CAT aktivitesi, 20 mM H₂O₂ içeren 50 mM fosfat

3. MATERYAL ve YÖNTEM

tamponu (pH=7,5) kullanılarak 240 nm'de absorbanstaki azalmanın izlenmesi yöntemi ile ölçülmüştür. Bir birim CAT aktivitesi, dakikada 1 mM H₂O₂ ile kullanılan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Upadhyaya et al. 1985). APX, 3 ml numune karışımı ile içerisinde 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 0,5 mM sodyum askorbat, 0,1 mM EDTA, 0,2 ml süpernatant ve 6 mM H₂O₂ dâhil olmak üzere 290 nm'de absorbandsaki düşüşün kaydedilmesi ile analiz edilmiştir (Nakano and Asada 1981). SOD aktivitesi, nitro-mavi tetrazolyum (NBT) boyasının indirgenmesi sırasındaki absorbandsının izlenmesi ile belirlenmiştir (Dhindsa et al. 1981). 13 mM metiyonin, 2 µM riboflavin, 75 µM NBT, 0.1 mM EDTA, 50 mM sodyum karbonat, 50 mM fosfat tamponu (pH 7,8) ve 0,1 ml öz ihtiva eden numune karıştırılmıştır. Riboflavin eklenmiştir ve tüpler çalkalanmıştır, 30 cm altına iki floresan tüp içeren ışık kümesine yerleştirilmiştir. 20 dakika sonra tüpler siyah bir bezle örtülerek reaksiyon tamamlanmıştır. Absorbans 560 nm'de spektrofotometrik olarak kaydedilmiştir.

3.9 İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler üç tekrar ile yapılmıştır. Veriler, SPSS 15 paket programı kullanılarak varyans analizi (ANOVA) ve Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi P<0,05 yapılarak ortalamalar karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Soğuk stres, morfolojik ve biyokimyasal indüksiyon nedeniyle bitki dokularındaki değişiklikler ve fizyolojik değişiklikler; plazma zarı, enzimatik reaksiyonlardaki değişiklikler ve makromoleküller arasındaki etkileşimler gibi tüm hücrel işlemlere müdahale ettiği tespit edilmiştir (Tasgin et al. 2006). Farklı termal analiz ve LT kombinasyonu türlerdeki soğuk tolerans mekanizmalarını belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Pearce 2001). LT sıcaklıklarının belirlenmesi, bitki dokularının, önemli donma toleransı olmadan buz kristallerine dayanıp dayanamayacağını değerlendirmek için temeldir. Bezelye genotipleri, çevresel koşullardaki değişkenliklerden dolayı donma toleransında hayatta kalmak için farklılık gösterebilir (Shereena et al. 2006). Bu nedenle, soğuğa dirençli çeşitlerin iyileştirilmesi ve soğuk tolerans stratejilerinin tanınması, bezelye bitkileri için soğuk direncini büyük ölçüde ilerletebilir.

Bu çalışmada, çeşitli kültür koşulları için 6 çeşit ve 25 ıslah hattının LT₅₀ tarafından belirtildiği gibi soğuk direncini belirlenmiştir. Bu çalışmada incelenen bezelye ıslah hatları ve çeşitler donma sıcaklığına tepkilerinde ve soğuğa karşı aklimasyon potansiyellerinde önemli farklılıklar göstermiştir. 31 örneğin çoğu için hayatta kalma adına ölümcül sıcaklıklar (LT₁₀ ile LT₉₀ arasında) -2,1 °C ile -7,14 °C arasında değişmiştir. Islah hattı 10 açık bir şekilde çalışılan tüm genotiplerin en güçlüsüdür; 35 ise daha az güçlü olduğu görülmüştür. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, 14, 34, 6 ve 10 elit ıslah hatların, çalışılan diğer çeşitler arasında en dondurucu toleranslı çeşitler olarak görülebildiğini göstermiştir. Çeşitler bakımından, Töre ve Ürünü, donmaya en duyarlı çeşitler olarak kabul edilebilir. LT₅₀ değerleri, bahçe bezelyesi literatürlerinde bildirilenlere biraz benzemektedir (Wade 1941). Ulubatlı, Özkaynak, Taşkent ve Kirazlı daha önceki bir çalışmada dona dayanıklı çeşitler olarak bildirilmiştir (Acıkgoz vd. 2009).

Bu çalışmada ayrıca Ulubatlı, Özkaynak, Taşkent ve Kirazlı ıslah hatlarının donmaya dayanıklı 14, 34, 6 ve 10 ıslah hattıninkine yakın donma dayanımı değerleri olduğu tespit edilmiştir. Daha önceki bir çalışmada (Balackova et al. 1986) -6 °C soğuk strese maruz kalan Pisum fulvum çeşidinin yapraklarında hiçbir hasar gözlenmediğini

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

bildirilmiştir. Pisum sativum genotiplerinde % 5 ile % 100 arasında soğuk toleransı; 4 geleneksel hat ve 5 kısa saplı hatta en yüksektir. Fransa'da -23 °C ve altındaki sıcaklıklar Pisum sativum'un kışlamasının ölümcül olduğu değerlendirilirken, -6 ile -14 °C arasındaki sıcaklıkların tamamen dirençli bezelyeye zarar vermeyeceği kabul edilmektedir (Eteve 1985).

Bu çalışmanın sonuçları literatürde bildirilmiş olan önceki çalışmalara uygundur. Düşük sıcaklıklarda artan prolin içeriği, bezelye dâhil birçok bitki türünde yaygın olarak bildirilmiştir (Zhang et al. 2012). Prolin içeriği bariz olarak üreme koşullarına maruz kalan bitkilerde, ıslah hatlarının ve çeşitlerinin yapraklarındaki kontrollere kıyasla artmıştır. Normal koşullar altında, üç hatta farklı bazal tepki içerikleri gözlemlenmiştir. Islah hat 19, aklimasyonlu durumdan aklimasyona uğramayan duruma göre daha yüksek oranda prolin içeriğini göstermiştir. Benzer şekilde, donmaya duyarlı hat 9 soğuğa tepki olarak prolin seviyelerini arttırmıştır (Çizelge 5.1). Bununla birlikte, toplam prolin içeriği, soğuk direnç derecesine bağlıdır. Direnç çeşitlerinin ve üreme soylarının en yüksek prolin konsantrasyonlarının varlığı tespit edilmiştir. Soğuk işlenmiş bitkilerde, prolin birikimi, işlenmemiş bitkilerden daha yüksektir. Soğuk işlenmiş bitkiler, işlenmemiş bitkilerden daha hızlı iyileşmiştir, bu nedenle, prolin'in soğuk stres altındaki bitkilerde yararlı etkileri nedeniyle soğuk iklimlendirilmiş bitkiler, donma sıcaklıklarını iklimlendirilmemiş bitkilerden daha iyi tolere edebilmektedir. İndüklenmiş prolin içeriği ozmotik ayarlama, ROS (Reaktif oksijen türevler) süpürme ve soğuk strese iyi uyum için önemli olan enzim denatürasyonunun korunmasında işlev görebilmektedir (Aslani et al. 2011). Bu nedenle, prolin seviyeleri bezelye ıslah hatlarının soğuk direncinin taranması için potansiyel belirleyiciler olarak kabul edilebilir. Bu sonuçlar, soğuk aklimasyon sırasında nohuttaki prolin içeriğini gösteren diğer araştırmacıların bulgularıyla uyumludur (Nayyar et al. 2005a). Ayrıca buğday fidelerinde prolin seviyesinin, soğuk strese maruz kaldığında yavaş yavaş yükseldiğini bildirilmiştir (Javadian et al. 2010).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ceviz çeşitlerinde daha önce yapılmış bir rapora göre benzerlik göstermektedir (Aslani et al. 2011). Donmaya dayanıklı ceviz genotiplerinin, düşük sıcaklık koşullarında daha az dirençli olanlardan daha fazla serbest prolin içerdiği bildirmiştir. Bitkilerde soğuğa dirençli gelişme, antioksidan

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

enzim aktivitesinin zenginleştirilmesi ile güçlü bir şekilde bağlantılıdır. Antioksidan enzimlerin, soğuk strese tepki olarak üretilen ROS'a karşı hücrel özellikleri önlediği bilinmektedir (Mutlu et al. 2009). Soğuğa dirençli türlerin, pirinç ve mısır da dâhil olmak üzere birçok üründe soğuğa duyarlı türlere kıyasla daha yüksek antioksidan enzim aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Anderson et al. 1994; Guo et al. 2005).

Sonuçlarımız soğuk stres koşullarında üç ıslah hattında oksidatif strese karşı SOD, CAT ve APX aktivitelerinde önemli bir artış gözleendiğini göstermiştir. SOD, soğuk stresine karşı savunma mekanizmasında ilk adımdır. Soğuk aklimasyon altında üç ıslah çizgisinin yapraklarındaki SOD aktivitesinin değerlendirilmesi, belirgin bir artış göstermiştir ve daha sonra soğuk muamelenin süresine paralel olarak azalmıştır. Soğuk stres altında, soğuk iklimlendirilmiş bitkilerde SOD aktivitesindeki artış, özellikle iklimlendirilmemiş olanlar ile karşılaştırıldığında 7 gün boyunca 4 °C'de tutulduklarında çok daha yüksektir ve bu değişiklik çoğunlukla 19 ve 10 ıslah hattında gözlemlenmiştir. Soğuk toleranslı ve dirençli ıslah hattı 19, SOD aktivitesi en yüksek, soğuğa duyarlı ıslah hattı 9 ise aktivitesi en düşüktür (Çizelge 5.2).

Bu sonuçlar hem soğuk muamelesi hem de muamele olmayan dış koşullar altında LT_{50} ile SOD arasında anlamlı bir pozitif ilişki olduğunu göstermiştir. Soğuk dirençli hatlardaki daha yüksek SOD aktivitesi, hücrelerin detoksifikasyonuna yardımcı olan daha iyi ROS temizleme kapasitesini yansıtır. Bu çalışmaya göre, (Janmohammadi et al. 2012), soğuk aklimasyondan sonra SOD aktivitesinin, kışlık buğdayda LT_{50} 'nin azalması ile yakından korele olduğunu da belgelenmiştir. Ayrıca, APX aktivitesi soğuk iklimlendirme sırasında bezelye çeşitlerinde anlamlı olarak artmıştır (Çizelge 5.3). Soğuk aklimasyon sırasında APX aktivitesindeki artış, çam ve ladinde de belgelenmiştir (Tandy et al. 1989). Çalışmamızda, en yüksek APX aktivitesi 21 günde soğuk toleranslı ıslah hattı 19 da tespit edilmiştir, ancak en düşük aktiviteler soğuk aklimasyonlu 14 günde soğuğa dayanıklı ıslah hattı 10 da test edilmiştir. Ancak, iklimlendirilmemiş bezelye çeşitlerinde fark artışı gözlenmiştir. Ayrıca, LT_{50} ile soğuk aklimasyonlu ve aklimasyonsuz koşullar altında APX aktivitesi arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Sonuçlarımız, ROS'un zararını ortadan kaldırabilmesine rağmen, APX enziminin aktivitesinin bezelye ıslah hatlarının soğuk direncinde doğrudan bir rolü olmadığını göstermektedir. Bu, APX aktivitesinin doğrudan soğuk

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

dirençle ilişkili olmadığını gösteren önceki çalışma ile uyumludur (McKersie et al. 1999). Cansev et al. (2009), ayrıca APX aktivitesinin soğuk direncinin derecesi ile ilişkili olmayabileceğini de bildirmiştir.

CAT enzimi temel olarak peroksizomlarda bulunur ve bitkilerin soğuk stresine karşı korunmasında da önemlidir (Sudhakar et al. 2001; Mutlu et al. 2011). Soğuk iklimasyon sırasında üç bezelye ıslah hattında CAT aktivitesi anlamlı şekilde artmıştır, ancak ıslah hatları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. En düşük CAT aktivitesi, soğuk muamele hattında (10), hem soğuk muamele hem de muamele dışı koşullar sırasında bulunurken, en yüksek CAT aktivitesi, soğuk toleranslı hattında (19) bulunmuştur. Bu bulgular, CAT aktivitesinin zeytin yaprağı dokusundaki soğuk direnç derecesi ile yakından ilişkili olduğu tespit edilen önceki raporlarla uyumludur (Hashempour et al. 2014).

Sonuçlara dayanarak, çalışmamız bezelyenin soğuk direncini açıklamaya yardımcı olmuştur ve 4 ıslah hattının çalışılan 25 bezelye ıslah hattında en yüksek soğuk direncine sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, 10 ıslah hattı soğuğa dirençli olma eğilimi göstermiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar soğuk algınlığının APX, SOD, CAT enzimlerinin aktivitelerini geliştirdiğini de ortaya koymuştur. Bu nedenle, antioksidan enzimlerin önemli aktivitesi ve prolin içeriğinin, çeşitli ortam koşulları için dirençli bezelye türlerinin elde edilmesi için seçim kriteri olarak önerilebilir.

Yapılan bu çalışmamız sonucunda kullandığımız yem bezelyesi ıslah hatlarının soğuğa karşı direncinin ölüm sıcaklıkları belirlenmiş olup gelecekte bu ıslah hatları soğuğa dayanıklı aday çeşitleri olarak piyasaya sunulabilir.

Bu ıslah hatları değişen iklim koşullarına bağlı olarak erken ilkbahar ve geç sonbahar donlarına karşı verim kayıplarını minimum seviyeye indireceğinden yetiştiricilere soğuğa dayanıklı yem bezelyesi çeşitleri olarak sunulacaktır.

Bu ıslah hatları verim kayıplarını en az düzeye indireceğinden ülkemizin büyükbaş hayvan yetiştiriciliğinde yem bitkisi olarak kullanılarak ülke ekonomisine katkı sağlayacaktır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu dayanıklı ıslah hatları sayesinde ani sıcaklık deęiŐimlerine tolerans göstermelerinden dolayı tohum alımında dışa bağımlılığı azaltacaktır ve gelecekte yeni ıslah programlarının baŐlatılmasında baŐlangıç materyali olarak kullanılabilir.

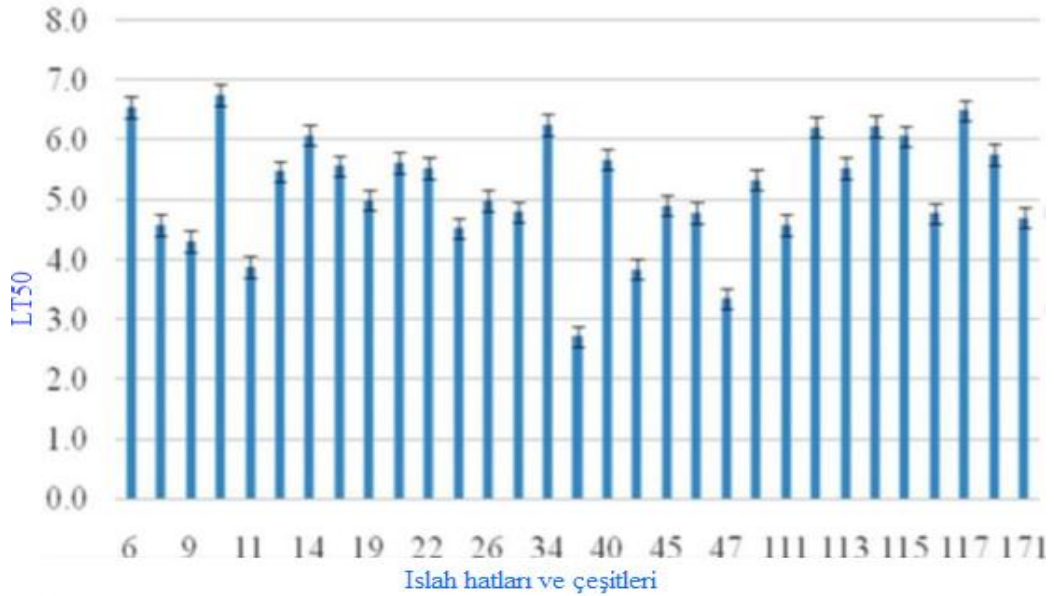


5. SONUÇ ve ÖNERİLER

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Başlangıçta, bezelye yapraklarının diferansiyel termal analiz profili tespit edilmiştir, bunlar farklı sıcaklıklarda sadece bir buzlanma oluştuğunu göstermiştir. Sıcaklık aralıkları, % 10,% 50 ve % 90 yaralanma oranları ile ilişkili test edilen bezelye genotiplerinde tanımlanmıştır. Bize göre sonuçlar, çeşitler ve ıslah hatları birkaç gruba ayrılabilir. Yapraklarda, LT_{10} , LT_{50} ve LT_{90} (sıcaklıklara neden olan öldürücü donma), çeşitler ve ıslah hatları incelenmiştir. Hassas bir şekilde sınıflandırılmıştır; hassas (35, 47, 43, 11, 9, 24, 8, 111, 171, 116 (Töre), 46, 27), toleranslı (45, 26, 19, 54, 13, 113 (Ürnlü) , 22, 16, 21, 40, 161) ve dayanıklı (115 (Taşkent), 14, 112 (Özkaynak), 114 (Kirazlı), 34, 117 (Ulubatlı), 6, 10). LT_{50} yapraklar için -2.68 °C' den -6.95 °C'ye kadar değişmiştir. Islah hatları arasında sırasıyla 10. ve 35.yaprak en yüksek ve en düşük süper soğutma noktasına sahiptir. Ticari çeşitler arasında Özkaynak ve Ulubatlı en yüksek soğutma noktalarına sahiptir, Töre ve Ürnlü en düşükleri olmuştur.

Çizelge 5.1 25 ıslah hattı ve 6 çeşitten oluşan LT_{50} 'deki değişimler



Serada 10 gün boyunca yetiştirilen bitkiler, soğuğa dayanıklılık potansiyelini araştırmak için 21 gün boyunca 4 °C ortama aktarılmıştır. Normal serada yetiştirilen bitkiler kontrol olarak görev yapmıştır. Soğuk aklimasyon, -20 °C sıcaklığa kadar hassasiyetine (9), toleranslarına (19) veya dirençlerine (10) göre seçilen üç ıslah hattı ile

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

değerlendirilmiştir. Prolin birikimi, üç ıslah hattının (9, 10 ve 19) yapraklarında 7 günlük soğuk aklimasyondan sonra ($P = 0,05$) kanıtlanmıştır. Prolin birikimi 19'daki birikim 9 ve 10'dan daha yüksektir. Soğuk aklimasyon, 21 günde en yüksek seviyeye ulaşan prolin içeriğini kademeli olarak arttırılmıştır. Kontrol ile karşılaştırıldığında, yedi gün aklimasyondan sonra sırasıyla 9, 10 ve 19 ıslah hattının prolin birikimi 3,90-6,30, 4,10-5,50 ve 4,10-7,20 kat artış göstermiştir. 14 günde, araştırılan tüm ıslah hatlarının yapraklarında prolin birikimi sürekli olarak artmıştır. 21 günlük aklimasyon sırasında, en yoğun prolin birikimi, 19. ıslah hattının yapraklarında gözlemlenmiştir ve 7, 14 ve 21 günlük aklimasyon sonra, prolin miktarı bu ıslah hattının yaprakları, aklimasyon olmayanların yapraklarından önemli ölçüde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.2 Üç bezelye ıslah hattının prolin içeriğindeki değişimler

| Islah hatları | 7. gün (Kontrol) | 7. gün | 14. gün | 21. gün |
|---------------|------------------|--------|---------|---------|
| 9 | 3.9 | 6.3cB | 14.6bA | 22.1aB |
| 19 | 4.1 | 7.2cA | 14.3bA | 28.0aA |
| 10 | 4.1 | 5.5cC | 10.4bB | 21.3AB |

* Aynı sütunda farklı üst yazıya sahip değerler, Duncan testine göre $P < 0,05$ düzeyinde farklıdır; büyük harf = sütundaki fark; küçük harf = satırdaki fark olarak ifade edilmiştir

Antioksidan enzimler (APX, SOD ve CAT) için varyans analizinin verisi, test edilen üç bezelye ıslah hattının SOD, APX ve CAT aktivitelerinde 21 günlük aklimasyonda, 7,14 değeri ile anlamlı bir ($P \leq 0,05$) iyileşme olduğunu göstermiştir. SOD aktivitesi hem soğuk aklimasyon hem de soğuk aklimasyon olmayan aşamada çeşitler arasında farklılık göstermiştir. En yüksek SOD aktivitesi 7 gün soğuk aklimasyonda olmuştur; 19 (12,900 nmol / g FW), 10 (12,700 nmol / g FW), 9 (11,800nmol / g FW). En düşük SOD faaliyeti 21 gün süren aklimasyonda yaşanmıştır; 10 (3,893 nmol / g FW), 9 (3,800 nmol / g FW) ve 19 (4,300 nmol / g FW). Aksine, en düşük SOD aktivitesi soğukta 7 gün süren aklimasyon olmayanda olmuştur; 9 (2,600 nmol / g FW), 10 (3,200 nmol / g FW) ve 19 (3,700 nmol / g FW).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çizelge 5.3 Üç bezelye ıslah hattının SOD aktivitesindeki değişimler

| Islah hatları | 7.gün (K.grubu) | 7. gün | 14. gün | 21. gün |
|---------------|------------------|--------|---------|---------|
| 9 | 2.6 ^c | 11.8aB | 6.1bA | 3.9cB |
| 19 | 3.7 ^a | 12.9aA | 8.2bc | 4.3cA |
| 10 | 3.2 ^b | 12.7aA | 7.1bB | 3.8CB |

* Aynı sütunda farklı üst yazıya sahip değerler, Duncan testine göre P <0,05 düzeyinde önemli ölçüde farklıdır; büyük harf = sütundaki fark; küçük harf = satırdaki fark olarak ifade edilmiştir.

Soğuk aklımasyonuna tabi tutulan 19 ıslah hattı, 7 gün boyunca kontrolle kıyasla yapraklarında SOD aktivitesinde anlamlı bir artış olduğunu göstermiştir (Çizelge 5.2). APX aktivitesi de hem soğuk aklımasyon hem de aklımasyon olmayan aşamalarda çeşitler arasında farklılık göstermiştir. En yüksek APX aktivitesi 21 günlük soğuk aklımasyonda olmuştur; 19 (7,80 nmol / mg protein), 9 (5,40 nmol / mg protein), 10 (5,00 nmol / mg protein). En düşük APX aktivitesi ise 21 gün boyunca elde edilmiştir; 10 (1,200 nmol / mg protein), 9 (1,700 nmol / mg protein) ve 19 (2,200 nmol / mg protein). Buna karşılık, en yüksek APX aktivitesi 7 gün boyunca soğuk olmayan aklımasyon için gözlemlenmiştir; 19 (1,400 nmol / g FW), 9 (1,200 nmol / g FW) ve 19 (0,500 nmol / g FW). Benzer şekilde, 19 ıslah hattı, soğuk aklımasyon açısından en yüksek APX aktivitesini göstermiştir (Çizelge 5.3).

Çizelge 5.4 Üç bezelye ıslah hattının APX aktivitelerindeki değişimler

| Islah hatları | 7.gün (Kontrol) | 7.gün | 14.gün | 21.gün |
|---------------|------------------|-------|--------|--------|
| 9 | 1.2 ^b | 1.7cB | 2.4bB | 5.4aA |
| 19 | 1.4 ^a | 2.2cA | 4.0bB | 7.8aA |
| 10 | 0.5 ^c | 1.2cC | 2.3cB | 5.0AC |

* Aynı sütunda farklı üst yazıya sahip değerler, Duncan testine göre P <0,05 düzeyinde önemli ölçüde farklıdır; büyük harf = sütundaki fark; küçük harf = satırdaki fark olarak ifade edilmiştir.

Soğuk aklımasyona maruz bırakılan ıslah hatları arasında bezelye yapraklarındaki CAT düzeyinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak, CAT aktivitesi

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

soğuk aklımasyona uğramayan ıslah hatları arasında farklılık göstermiştir. Soğuk aklımasyonda, en yüksek CAT aktivitesi, 19. ıslah hattında elde edilmiştir (15,300 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteini), en düşük CAT aktivitesi, 21 gün boyunca soğuk aklımasyonda 9. ıslah hattında (14,800 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteini) elde edilmiştir. Benzer şekilde, aklımasyon olmayan şartlardaki 19. ıslah hattının (2,600 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ protein), en yüksek CAT aktivitesine sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 5.4).

Çizelge 5.5 Üç bezelye ıslah hattının CAT aktivitelerindeki değişimler

| Islah hatları | 7.gün (Kontrol) | 7.gün | 14.gün | 21.gün |
|---------------|------------------|-------|--------|--------|
| 9 | 2.0 ^c | 4.7 | 9.9 | 14.9 |
| 19 | 2.6 ^a | 4.9 | 9.9 | 15.3 |
| 10 | 1.9 ^b | 4.8 | 9.8 | 14.8 |

* Aynı sütunda farklı üst yazıya sahip değerler, Duncan testine göre $P < 0,05$ düzeyinde önemli ölçüde farklıdır; büyük harf = sütundaki fark; küçük harf = satırdaki fark olarak ifade edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Acikgoz, E. 2009. Genotype and environment interaction and stability analysis of dry matter and seed yield in field pea (*Pisum sativum* L.). Spain J. Agri Res, 7: 96-106.
- Açıkgoz, E. 2001. Yem Bitkileri, Uludağ Üni Zir Fak Tarla Bit Böl Uludağ Üni, Basımevi, 3.baskı, Bursa, 584 s
- Ameglio, T., Cochard, H., Lacoïnte, A., Sauter, J., Evers, F., Martignac, M. 2001. Adaptation to cold temperature and response to freezing in walnut tree, Acta Hort, 544: 247-254.
- Anderson, M.C., T.K, Prasad, B.A, Martin and C.S. Stewart. 1994. Differential gene expression in chilling-acclimated maize seedlings and evidence for the involvement of abscisic acid in chilling tolerance. Plant Physiol, 105: 331-339.
- Anlarsal A.E., Yucel C, ve Ozveren D. 2001. Cukurova koşullarında bazı bezelye (*Pisum sativum* ssp, *sativum* L, ve *Pisum sativum* ssp, *arvense* L.) hatlarının uyumu ve verimlerinin saptanması üzerinde bir araştırma. C.U Ziraat Fak Dergisi, 16(3): 11-20.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxidescavenging enzyme in plants. Physiol Plant, 85: 235-241.
- Aslani, A.A., K, Vahdatı, M, Rahemi, D, Hassani and C. Leslie. 2011. Cold hardiness and its relationship with proline content in Persian Walnut. Eur J of Hortic Sci, 76: 84-90.
- Aslantaş, R. 1999. Erzincan Şartlarında yetiştirilen bazı badem (*Amygdalus communis* L.) çeşit/klon ve tiplerinin vejetatif ve generatif gelişme ile çiçek tomurcuklarının dona dayanım derecelerinin belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi 92s.
- Aslantaş, R. 2008. Bahçe Bitkilerinin dona dayanıklılık fiziyojisi. Atatürk Üniv, Fen Bilimleri Enstitüsü Ders Notu, Erzurum.
- Baek, K.H., Skinner, D.Z. 2006. Differential expression of manganese superoxide dismutase sequence variants in near isogenic lines of wheat during cold acclimation. Plant Cell Rep, 25: 223-230.
- Baek, S.H., Kwon, I.S., Park, T., Yun, S.J., Kim, J.K., Choi, K.G. 2000. Activities and isozyme profiles of antioxidant enzymes in intercellular compartment of overwintering barley leaves. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 33 (5): 385-390.
- Balackova, N.E., A.P, Lakhanov and V.N Zaitsev. 1986. Resistance of pea and French bean breeding material to unfavorable temperatures. Nauchno Teknich eskii

Byulleten Vs esoyusnogo Naucho Issledovadel Skogo Instituta Z ernobobovykh I Krupanykh Kultur, 35: 66-71.

- Bates L, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207
- Beck, E.H., Heim, R., Hansen, J. 2004. Plant resistance to cold stress: Mechanism and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *J Biosci*, 29 (4): 449-459.
- Bezirganoglu, I. 2017. Response of five triticale genotypes to salt stress in in vitro culture. *Turk J Agric For* 41: 372-380.
- Bolat, İ. 1995. The relationship between frost resistance and seasonal changes in carbohydrate contents in flower buds in apricot (*Prunus armeniaca* L, cvs Şalak and Tebereze). *Acta Hort*, 384: 183:187.
- Burak, K. 1989. Marmara Bölgesi'nde yetiştirilen önemli bazı şeftali çeşitlerinin dona dayanımları üzerinde araştırmalar. Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (Doktora Tez Projesi), Yalova.
- Burke, J.J. 1995. In *Environment and Plant Metabolism* (N, Smirnov, ed.), BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK, pp,63-78.
- Burke, M.J., LV, Gusta, H.A, Quamme, C.J, Weiser and P.H, Li 1976. Freezing and injury in plants. *Annu, Rev, Plant, Physiol*, 27: 507-528.
- Cansev, A., H, Gulen and A, Eris 2009. Cold-hardiness of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in cold acclimated and non-acclimated stages: seasonal alteration of antioxidative enzymes and dehydrin like proteins, *J, Agric, Sci*, 147: 51-61.
- Chaitanya, K.V., D, Sundar, S, Masilamani and A.R Reddy 2002. Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars. *Plant. Growth. Regul*, 36, 175-180.
- Chen, T, and Zhang, B. 2016. Measurements of Proline and Malondialdehyde Content and Antioxidant Enzyme Activities in Leaves of Drought Stressed Cotton, *Bio-protocol* 6 (17): e1913
- Crane, F.L., Sun, L.L., Barr, R., Low, H. 1991. Electron and proton transport across the plasma membrane, *J, Bioenerg Biomembr* 23: 773-803.
- Crespi, M.D., Zabaleta, E.J., Pontis, H.G., Salerno, G.L. 1991. Sucrose synthase expression during cold acclimation in wheat, *Plant Physiol.*, 96: 887-891.
- Dalmanndottir, S., Helgadottir, A., Gudleifsson, B.E. 2001. Fatty acid and sugar content in white clover, in relation to frost tolerance and ice-encasement tolerance, *Annals of Botany*, 88: 753-759.

- Davies D.R. 1976. Peas (Ed: N.W,Simmonds),Volution of Crop Plants, Longman, London, pp,172-174.
- Del Rio, L.A., Palma, L.M., Sveolio, F.J., Corpas, G.M., Pastori,P. 1996. Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide and in stressed plants,Biochem,Soc.Trans., 24: 434-438.
- Demirel, H. 1997. Erzincan Ovası'nda seçilen ve yetiştirilen bazı kayısı çeşitleri ve zerdali tiplerinin dona dayanımları üzerine bir araştırma, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Erzurum.
- Dolezel J,and Greilhuber J. 2010. Nuclear genome size, Are we getting closer Cytometry 2010,77, 635–642.
- Ercişli, S. 2003. Relationship of seasonal changes in carbohydrates and cold hardiness in buds of two rose hip genotypes,Europ,J,Hort,Sci., 68 (2): 63-66.
- Eteve, G. 1985. Breeding for Tolerance and Winter Hardiness in Pea,In: The Pea Crop A Basis for Improvement, Hebblethwaite, P.D., M.C,Heath and T.C.K,Dawkins (Eds.) Butterworths, London, UK.
- Foyer, C.H. 1993. Ascorbic acid, LN Antioxidants in Higher Plants, RG, Alscher and J.L.Hess, eds,(Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Press), pp,31-58.
- Govorov L.I. 1937. Pisum (N.I,Vavilov, E.V,Wulff),Flora of Cultivated Plants, IV, Grain Leguminosae, State Agricultural Publishing Company, Moscow, Leningrad, pp,231-336.
- Grene, R. 2002. Oxidative stres and acclimation mechanism in plants, American Society of Plant Biologists, The Arabidopsis Book, doi: 10.1119/tab.0036.1.
- Guo, Z., H,Tan, Z,Zhu, S,Lu and B,Zhou 2005. Effect of intermediates on ascorbic acid and oxalate biosynthesis of rice and in relation to its stress.Plant.Physiology and Biochemistry.43:955-962.
- Guy, C.L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance:role of protein metabolism,Ann,Rev,Plant Physiol,Plant Mol,Biol., 41: 187-223.
- Guy, C.L., Huber, J.L.A., Huber, S.C. 1992. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature,Plant Physiol., 100:502-508.
- Hagedorn D.J. 1984. Compendium of Pea Disases. University of Wisconsin-Madison.
- Hashempour, A., M,Ghasemnezhad, RF,Ghazvini, and M.M Sohani 2014. Olive (*Olea europea L.*) freezing tolerance related antioxidant enzyme activity during acclimation and non-acclimation,Acta,Physiol,Plant.36: 3231–3241.
- Hausladen, A., Alscher, R.G. 1994b. Cold hardiness-specific Glutathione reductase isozymnes in Red Spruce,Plant Physiol., 105: 215-223.

- Hoslin S.M. 1964. Gemusebau, Erzeugung und Absatz, Bayerischer Landwirtschaft verlag Gm BH, Munchen.
- Howarth, C.J., Ougham, H.J. 1993. Gene expression under temperature stress, *New Phytol.*, 125: 1-26.
- Janmohammadi, M., V,Enayati, and N,Sabaghnia 2012. Impact of cold acclimation, deacclimation and re acclimation on carbohydrate content and antioxidant enzymes activities in spring and winter wheat, *Icel,Agric,Sci*,25: 3-11.
- Javadian, N., G,Karimzadeh, S,Mahfoozi, and F.Ghanati 2010. Cold-induced changes of enzymes, proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat, *Russian,J,Plant Physiology*,57: 540-547.
- Karayel R, ve Bozoğlu H. 2008. Turkiye'nin farklı bolgelerinden toplanan yerel bezelye populasyonunun bazı agronomik ozellikleri. *OMU Zir. Fak. Dergisi*, 23(1): 32-38.
- Kendall, E.J., McKersie, B.D. 1989. Free radical and freezing injury to cell membranes of winter wheat, *Physiol,Plant.*,76:86-94.
- Kocaçalışkan, İ. 2002. Bitki Fizyolojisi, DPU Fen Edebiyat Fakóltesi, 2,Baskı, Kütahya.
- Kovács, Z., L,Simon-Sarkadi, C,Sovány, K,Kirsch, G.Galiba, and G Kocsy 2011. Differential effects of cold acclimation and abscisic acid on free amino acid composition in wheat. *PlantScience*.180: 61-68.
- Küden, A.B., Küden, A., Paydaş, S., Kaşka N., İmrak B. 1998. Bazı ılıman iklim meyve tür ve çeşitlerinin soğuğa dayanıklılığı üzerinde çalışmalar. *Tr. Journal of Agriculture ve Forestry*, 22: 101-109.
- Lewitt, J. 1967. Status of the sulfhydryl hypothesis of freezing injury and resistance, In *Molecular Mechanisms of Temperature Adaptation*, C. Ladd Prosser, ed,(Washington, DC: Amer, Assoc. Adv. Sci.), pp,41-51.
- Lewitt, J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stress, Vol.1 Chiling, freezing, and high temperature stresses (New York London Toronto: academic Press).
- McKersie, B.D., S.R,Bowley, and K.S,Jones 1999. Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase, *Plant Physiol* 119: 839-847.
- Mutlu, S., O,Atici, N,Esim, and Mete E 2011. Essential oils of catmint (*NepetameyeriBenth.*) induce oxidative stress in germinating seeds of various weed species. *Acta.PhysiologiaePlantarum*,33: 943-951.
- Nayyar, H., K,Chander, S,Kumar, and Bains T 2005a. Glycine betaine mitigates cold stress damage in Chickpea, *Agron, Sustain, Dev*,25: 381-388.
- Nilsen, E.T., Orcutt, D.M. 1996. *Physiology of Plants Under Stress* (New York Toronto: John Wiley and Sons, Inc.).

- Noreen, Z., and Ashraf M. 2009. Assessment of variation in antioxidative defense system in salt treated pea (*Pisumsativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers, *J.Plant,Physiol*,166: 1764-1774.
- Pallonen, P. 1999. Relationship of seasonal changes carbohydrates and cold hardiness in canes and buds of tree red raspberry cultivars, *J,Amer,Hort,Sci.*, 124 (5): 507-513.
- Palta, J.P., Weiss, L.S. 1993. Ice formation and freezing injury:An overview on the survival mechanism and molecular aspects of injury and cold acclimation in herbaceous plants.In *Advances in Plant Cold Hardiness*,P,Li and L.Christefsson, eds,(Boca Raton, Ann Arbor, London Tokyo: CRC press), pp,143-176.
- Pearce, R.S. 1988. Extracellular ice and cell shape in froststressed cereal leaves: a low temperature scanning electron microscopy study, *Planta*, 175:3 13-324.
- Pearce, R.S. 1999. Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation*, 29: 47-76.
- Pearce, R.S. 2001. Plant freezing and damage, *Annals of Botany*,87: 417-424.
- Porcel, R., Barea, J.M., Ruiz-Lozano, J.M. 2003. Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence,*New Phytologist*, 157: 135-143.
- Puhakainen, T. 2004. Physiological and molecular analyses of cold acclimation of plants, Department of Biological and Environmental Sciences, Genetics Faculty of Biosciences, University of Helsinki, Finland.
- Pukacki, P.M., Kendall, E.J., McKersie, B.D. 1991. Membrane injury during freezing stress to winter wheat (*Triticum aestivum* L.) crowns,*J,Plant Physiol.*, 138: 516-521.
- Reyes-Diaz, M., N,Ulloa, A,Zuniga-Feest, A,Gutierrez,M,Gidekel, M,Alberdi, LJ,Corcuera, and LA Bravo 2006. *Arabidopsis thaliana* avoids freezing by supercooling,*J,Experimental,Botany*,57: 3687-3696.
- Ruiz, J.M., E,Sanchez, PC,Garcia, LR,Lopez and RM Rivero 2002. Proline metabolism and NAD kinase activity in green bean plants subjected to cold-shock,*Phytochemistry*,59: 473-478.
- Sakai, A., Larcher, W. 1987. *Frost Survival in Plants: Responses and Adaptations to Freezing Stress* (New York, USA:Springer-Verlag).
- Savitch, L.V., Harney, T., Huner, N.P.A. 2000. Sucrose metabolism in spring and winter wheat in response to high irradiance, cold stress and cold acclimation,*Phsiologia Plantarum*, 108: 270-278.

- Scebba, F., Sebastiani, L., Vitagliano, C. 1998. Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation, *Physiologia Plantarum*, 104: 747-752.
- Serrano, A., Cordoba, F., Gonzales-Reyes, J.A., Santos, C., Navas, P., Villalba, J.M. 1995. NADH-specific dehydrogenase from onion root plasma membrane: purification and characterization, *Protoplasma*, 181: 133-139.
- Shahid, M.A., RM, Balal, M., Pervez, T., Abbas, M., Ashfaq, U., Ghazanfar, M., Afzal, A., Rashid, F., Garcia-Sanchez, and N., Mattson 2012. Differential response of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes to salt stress in relation to the growth, physiological attributes antioxidant activity and organic solutes, *Aust, J, Crop, Sci*, 6: 828-838.
- Shanzhi, L., Huan, G., Wenfeng, L., Yuanzhen, L., Qian, Z., Dongmei, H., Baoqing, Z., Zhiyi, Z. 2002. *Forestry Studies in China*, 6(4): 1-7.
- Shereena, J., and N., Salim 2006. Chilling Tolerance in *Pisum sativum* L., Seeds: An Ecological Adaptation, *Asian J, Plant Sci*, 5: 1047-1050.
- Shewfelt, R.L. 1992. Response of plant membranes to chilling ve freezing, In *Plant Membranes: a biophysical approach to structure, development and senescence*, Y.Y, Leshem, ed. (Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers), pp, 192-219.
- Shewfelt, R.L., Ericson, M.E. 1991. Role of lipid peroxidation in the mechanism of membrane-associated disorders in edible plant tissue, *Trends Food Sci, Technol.*, 2: 152-154. Cherry, ed. (Berlin: Springer Verlag).
- Skrypetz S. 2004. Dry Peas: Situation and outlook. Agriculture and Agri-Food Canada, Market Analysis Division, Bi-weekly Bulletin, 17: 1–10.
- Smallwood, M., Bowles, D.J. 2002. Plants in a cold climate, *Phil, Trans, R, Soc, Lond*, B 357: 831-847.
- Smirnoff, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation, *New Phytol.*, 125: 27-58.
- Smirnoff, N. 1995a. Metabolic flexibility in relation to the environment, In *nvironment and Plant Metabolism Flexibility and Acclimation*, N, Smirnoff, ed. (BIOS Scientific Publisher Limited), pp, 1-16.
- Smirnoff, N. 1995b. Antioxidant systems and plant response to environment, In *Environment and Plant Metabolism Flexibility and Acclimation*, N, Smirnoff, ed. (BIOS Scientific Publisher Limited), pp, 217-243.
- Sudhakar, C., A., Lakshmi, and Giridarakumar S 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Sci* 161: 613-619.

- Szalai, G., Jvea, T., Paldi, E., Dubacq, J.P. 2001. Changes in the fatty acid unsaturation after hardening in wheat chromosome substitution lines with different cold tolerance, *J,Plant Physiol.*, 158: 663-666.
- Szalay, L., Hegedüs, A., Banyai, E.S. 2005. Presumable protective role of peroxidase and polyphenol oxidase enzymes against freezing stress in peach (*Prunus persica* L., Batsch), *Acta Biologica Szegendiensis*, 49 (1-2): 121-122.
- Tan, M., K, Ali, and D Zeynep 2012. Morphological characteristics and seed yield of east anatolian local forage pea (*Pisum sativum* ssp, *arvense* l.) ecotypes, *Turkish J,Field Crops*, 17: 24-30.
- Tandy, N.E., RTD, Giolio, and CJ Richardson 1989. Assay and electrophoresis of superoxide dismutase from red spruce (*Picea rubens* Sarg.), Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and Scot pine (*Pinus sylvestris* L.), *Plant, Physiol*, 190: 742-748.
- Tasgin E, Atici O, Nalbantoglu B and Popova PL 2006. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves, *Phytochemistry* 67: 710–715.
- Teklemariam, T.A., Blake, T.J. 2004. Phenylalanine ammonia-lyase-induced freezing tolerance in Jackpine (*Pinus banksiana*) seedlings treated with low, ambient levels of ultraviolet-B radiation, *Physiologia Plantarum*, 122: 244-253.
- Thompson, G.A. 1989. Molecular changes in membrane lipids during cold stress, In *Environmental Stress in Plants*, J.H.
- Toklu F, Karaköy T, Hakli E, Bicer T, Brandolini A, Kilian B & Özkan H 2009a. Genetic variation among lentil (*Lens culinaris* Medik) landraces from Southeast Turkey, *Plant Breeding* 128(2): 178-186.
- Vagujfalvi, A., Kerepesi, I., Galiba, G., Tischner, T., Sutka, J. 1999. Frost hardiness depending on carbohydrate changes during cold acclimation in wheat, *Plant Sci.*, 144: 85-92.
- Watt R.L, and Watts G.S. 1954. *The Vegetable Growing Business*, Orange Judd Publishing Co, Inc., New York.
- Wisniewski, M., Bassett, C. 2003. An overview of cold hardiness in woody plants: Seeing the forest through the trees. *Hortscience*, 38 (5).
- Zhang, J., X, Wu, X, Niu, R, Liu, Y, Liu, W, Xu, and Wang Y 2012. Cold-resistance evaluation in 25 wild grapes species, *Vitis*, 51: 153-160.
- Zhao, S. 1998. Induction of freezing tolerance in Jack Pine seedlings: changes in lipids, oxidation-reduction and antioxidant enzymes during cold acclimation, Department of Botany, Toronto University, PhD Thesis, p166.

EKLER

Ek 1. Tezin yayımlanan makalesi; Cold stress resistance and the antioxidant enzyme system in *Pisum sativum* (I. Bezirganoglu vd. 2018)



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

İsim–Soy isim : Onur Recep YİĞİT
Uyruğu : TC
Doğum Tarihi ve Yeri : 05.02.1990/Erzurum
Medeni Hali : Bekar
Telefon : +90 (537) 619 98 88
e–mail : onurryigit@gmail.com

Eğitim

| Derece | Üniversite | Mezuniyet Yılı |
|---------------|-----------------------------|----------------|
| Yüksek Lisans | Erzurum Teknik Üniversitesi | 2019 |
| Lisans | Fatih Üniversitesi | 2013 |
| Lise | Şükrüpaşa Anadolu Lisesi | 2007 |

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Burç Genetik Tanı Merkezi-2015
LCC Telekomünikasyon-2016
İris Telekomünikasyon-2017 (Devam ediyor)

Yayınlar :

1. Cold stress resistance and the antioxidant enzyme system in *Pisum sativum*

COLD STRESS RESISTANCE AND THE ANTIOXIDANT ENZYME SYSTEM IN *PISUM SATIVUM*

I. Bezirganoglu¹, P. Uysal² and O. R. Yiğit¹

¹Department of Molecular Biology and Genetics, Erzurum Technical University, 25050 Erzurum, Turkey; ²Ministry of Food, Agriculture and Livestock, Eastern Anatolia Agricultural Research Institute 25090 Erzurum, Turkey

*Corresponding author: İsmail Bezirganoglu, E-mail address: ismail.bezirganoglu@erzurum.edu.tr

ABSTRACT

Pea (*Pisum sativum*) is one of the major commercial forage all over the world, but its yield is restricted by cold stress due to cold sensitivity. In this study, the response of 31 pea genotypes with different cold resistance was tested under cold stress. Pea plants were cultivated from seeds in a temperature-controlled greenhouse (25/15°C) for 10 days prior to experiments. Cold-resistant and cold-sensitive lines and cultivars were selected using values of different thermal analysis. In addition, alterations in the activity of antioxidant enzymes (ascorbate peroxidase, catalase and superoxide dismutase), free proline content and their relation to LT₅₀ with cold resistance were investigated, and three breeding lines were selected at cold acclimation and non-acclimation conditions. Proline content gradually increased at cold acclimation compared to those leaves at non-acclimated. Cold acclimation improved the activities of APX, SOD and CAT. The highest correlation between enzyme activities and cold resistance was observed in the case of SOD, APX and CAT of 19 breeding lines' leaves. Our results indicated LT₅₀ as closely related to proline content and antioxidant enzyme activities at cold acclimation.

Key words: pea, cold resistant, lethal temperature, enzyme activity.

INTRODUCTION

Abiotic stress is identified as environmental factors that reduce yield and productivity below optimum levels. Low temperature is one of the important abiotic stress factors influencing plant vegetative and reproductive development in many areas of the world (Janda *et al.*, 2003). Plants are complex organisms, which vary widely in their ability resist against chilling and freezing temperatures. It is hard to find out a precise estimate of the effects of cold stress on plant growth (Levitt, 1980). Freezing is defined as the death of the plant or damage to growth or differentiation of most of the living cells of plants as a result of cold stress. However, supercooling, a state where liquids do not solidify even below their normal freezing points is an avoidance mechanism against cold damage in plants, which are exposed to low temperatures. The degree of plant supercooling in normal environment conditions is primarily dependent on the ice-nucleating ability of the plant tissue and its immediate environment. Supercooling is particularly important in plants subjected to frosts during periods of high metabolic or growth activities (Reyes-Diaz *et al.*, 2006). When the extracellular supercooled water freezes, it creates a high temperature exotherm (HTE) and does not injure the plant. On the contrary, when the intracellular supercooled water freezes, it creates a low temperature exotherm (LTE), which is mostly lethal for organs. Differential thermal analysis is a method, which is utilized to predict

the critical temperatures for plant tissues (Burke *et al.*, 1976). Freezing-resistant plants experience damages only at temperatures lower than the temperature at which extracellular ice formation begins. Many plant species develop freezing resistance when subject to low non-freezing temperatures, a physiological process known as cold acclimation. Cold acclimation is a dynamic process in which plants exposed to low but non-freezing temperatures acquire tolerance to sub-zero temperatures (Levitt, 1980). Plants respond to acclimation through a number of biochemical and physiological alterations including changes in carbohydrates, proline and protein content as well as enzymatic activities. Soluble carbohydrates and free proline may inhibit water loss during acclimation (Kovacz *et al.*, 2011). Cold acclimation increases the level of proline via changes in enzyme activities in the proline metabolism pathways, which enhances cold-resistance (Ruiz *et al.*, 2002). Proline is also strongly associated with plants' cold stress as free proline increase during acquisition of cold resistance in plant species. The antioxidant enzymes in the plants, when they are exposed to environmental stresses, have been known to play a main role in the regulation against stress (Chaitanya *et al.*, 2002; Turk *et al.*, 2014; Bezirganoglu 2017). To reduce the stress enhanced oxidative effects, plant species produce various types of antioxidants such as peroxidase, catalase and superoxide dismutase (Shahid *et al.*, 2012).

Pea (*Pisum sativum* L.) is a major legume crop in the world. The crops display an important role in the sustainable agricultural systems. However, frost damage

in early spring and late fall to the pea crop can restrict the growing season to a limited time period (Tan *et al.*, 2012). It is documented that the stress excited influences on physiological and biochemical attributes of pea, although the relative importance of cold stresses affecting its production has been poorly understood (Noreen and Ashraf 2009; Shahid *et al.*, 2012). The present study was carried out to evaluate the cold resistance of different pea breeding lines and cultivars under controlled conditions and to determine the lethal temperature values for commonly used pea breeding lines and to identify the relationship of alterations in enzymatic activities to cold resistance in pea plants.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and growth conditions: Pea (*Pisum sativum* L.) seeds were obtained from East Anatolia Agricultural Research Institute, Erzurum, Turkey. Prior to experiments, seeds were surface-sterilized for 10 min with water/bleach (10:1, commercial NaOCl) solution and then washed three times with distilled water. Seeds were cultivated in plastic pots filled with a 1:1:1 mixture of soil: sand: peat. They were propagated in a greenhouse with day/night temperature of 25/15°C. Plants were watered and fertilized regularly. After 10 days, Plants of pea breeding lines and cultivars were subjected to differential thermal analysis and cold acclimation.

Determination of cold-resistance: A total of 31 pea breeding lines and cultivars were chosen from previous year's study. Three pea plants from each breeding lines and cultivars were carry out to determine the cold resistance. Leaf samples were obtained as uniform pieces from 25 breeding lines and 6 cultivars. One TEM in the top tray was left empty as a control for signal noise that was common to all TEMs. Foam insulation pads (4 cm x 4 cm x 9 mm thick) were placed on top of leaf in each well to ensure adequate contact between the tissues and TEM. The chamber lid was then tightened and chambers were placed in the freezer. Up to four chambers were stacked in the freezer for a maximum of 35 TEMs loaded per run. The freezer was programmed to hold at 4°C for 1 hrs, and drop to -20°C in following 11 hrs (a cooling rate of 4°C/hr), hold at -20 °C for 1 hr (a warming rate of 4.4 °C/hr). The DAS recorded signals from each TEM at 15-sec intervals and downloaded voltage output directly to Excel. Exotherms were identified manually from a plot of thermistor output (x axis) versus loaded-TEM output minus empty-TEM output (y axis). Lethal temperatures for leaves were reported at which 10%, 50% and 90% of the leaves were killed, respectively (Andrews *et al.*, 1984). These values were determined from the leaf exotherm range and distribution that were clearly visible

for leaves on each TEM. For pea, lethal temperatures were reported as leaf tissue LTE₁₀.

Cold acclimation treatment: Three pea plants from each breeding lines and cultivars were carry out to determine the cold resistance. For cold acclimation, 10-day-old seedlings were incubated in a growth chamber set at 4°C to induce cold treatment for 21 days, with light condition (day/night 16/8 h photoperiod, 50 μmol m⁻² s⁻¹ light) and relative humidity (65%). Leaf samples were obtained at 7, 14 and 21 days after cold treatment for proline contents and enzyme activity evaluation.

Proline assay: Three pea plants from each breeding lines were carry out to determine the proline content. To determine the proline content of leaves the acid ninhydrin method was used (Bates *et al.*, 1973). Leaf samples were crushed in a mortar and pestle with 3% (w/v) sulfosalicylic acid aqueous solutions and the homogenate was filtered through Whatman No. 1 filter paper, then 2 ml of filtered extract was mixed with 2 ml glacial acetic acid and 2 ml acid ninhydrin. The reaction mixture was incubated at 100°C for 1h and then left on ice for 20 min. Four milliliter of toluene was added to the reaction mixture. After centrifugation, the organic phase was extracted into quartz cuvette and absorbance was measured at 520 nm against toluene as blank by UV-visible spectrophotometer.

Antioxidant enzyme activities: Three pea plants from each breeding lines and cultivars were carry out to determine the antioxidant enzyme activities. Leaf samples (0.5 g) were crushed with a mortar and homogenized in ice-cold 0.2 M phosphate buffer (pH 7) containing 0.1m methylenedinitrilotetra acetic acid (EDTA). Extract was centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at 4°C. The supernatant was utilized to measure the activity of APX, SOD and CAT enzymes. CAT activity was measured by monitoring the decrease in absorbance at 240 nm in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) including 20 mM H₂O₂. One unit of CAT activity was defined as the amount of enzyme that used 1 μM H₂O₂ per min (Upadhyaya *et al.*, 1985). APX was analyzed by recording the decrease in absorbance at 290 nm in 3 ml sample mixture including 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0,5mM sodium ascorbate, 0,1 mM EDTA, 0,2 ml supernatant and 6mM H₂O₂ (Nakano & Asada, 1981). SOD activity was determined by monitoring the reduction in absorbance of nitro-blue tetrazolium (NBT) dye (Dhindsa *et al.*, 1981). Sample mixture included 13 mM methionine, 2 μM riboflavin, 75 μM NBT, 0.1 mM EDTA, 50 mM sodium carbonate, 50 mM phosphate buffer (pH 7.8), and 0.1 mL of the extract. Riboflavin was added at the end and the tubes were shaken and placed 30 cm below a light bank containing two fluorescent tubes. After 20 min, The reaction was finished by covering the tubes with a black

cloth. The absorbance was recorded spectrophotometrically at 560 nm.

Statistical Analysis: All experiments were conducted in three replicates. Data were evaluated by analysis of variance (ANOVA), and means were compared by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.

RESULTS

Cold-resistance estimation among breeding lines and cultivars:

Initially, differential thermal analysis profile of pea leaves was determined, which indicated only one ice-forming event at different temperatures. Temperature ranges associated with 10%, 50% and 90% injury were identified in the pea genotypes tested. According to our results, as represented in Figure 1, the cultivars and breeding lines can be categorized into several groups. In the leaves, LT_{10} , LT_{50} and LT_{90} (temperatures causing lethal freezing), the cultivars and breeding lines studied were classified as sensitive (35, 47, 43, 11, 9, 24, 8, 111, 171, 116 (Töre), 46, 27) tolerant (45, 26, 19, 54, 13, 113 (Ürünlü), 22, 16, 21, 40, 161) and resistant (115 (Taşkent), 14, 112 (Özkaynak), 114 (Kirazlı), 34, 117 (Ulubatlı), 6, 10). The LT_{50} for leaves ranged from -2.68 to -6.95°C. Among the breeding lines, the leaves of 10 and 35 had the highest and lowest supercooling points, respectively. Among commercial cultivars, Özkaynak and Ulubatlı had the highest supercooling points and Töre and Ürünlü had the lowest ones.

Cold-acclimation and proline assay: Plants grown for 10 days in the greenhouse were transferred into the 4°C environment for 21 days to investigate the potential of plants for cold resistance. Plants grown in the normal greenhouse served as controls. Cold-acclimation was assessed with three breeding lines which were selected based on their sensitivity (9) tolerance (19) or resistance (10) to temperature of -20°C. Proline accumulation was proven after 7 days of cold acclimation ($P \leq 0.05$) in leaves of three breeding lines (9, 10, and 19). Proline accumulation in 19 was higher than that in 9 and 10 breeding lines prior to cold acclimation. Cold acclimation gradually increased proline content, which reached the highest level at 21 days. Compared with the control, proline accumulation of 9, 10, and 19 breeding lines showed a 3.90-6.30, 4.10-5.50, and 4.10-7.20-fold rise after 7 days acclimation, respectively. At the day of 14, proline accumulation in the leaves of all investigated

breeding lines increased consistently. During 21 days of acclimation, the most intensive proline accumulation was observed in the leaves of '19' breeding line, and after 7, 14 and 21 days of acclimation, the amount of proline in the leaves of this breeding line was significantly higher than that in leaves of non-acclimated ones (Table 1).

Antioxidant enzyme activity: Analysis of variance of data for antioxidant enzymes (APX, SOD, and CAT) showed that 7, 14 and 21 days of acclimation had a significant ($P \leq 0.05$) improvement on the activities of SOD, APX and CAT of the three tested pea breeding lines. SOD activity was different among cultivars in both cold acclimation and non-acclimated stage. The highest SOD activity was on 7 days at cold acclimation; 19 (12.900 nmol/g FW), 10 (12.700 nmol/g FW), 9 (11.800 nmol/g FW). Whereas the lowest SOD activity was for 21 days acclimation; 10 (3.893 nmol/g FW), 9 (3.800 nmol/g FW) and 19 (4.300 nmol/g FW). On the contrary, the lowest SOD activity was on 7 days at non-cold acclimation; 9 (2.600 nmol/g FW), 10 (3.200 nmol/g FW) and 19 (3.700 nmol/g FW). Cold acclimated 19 breeding line indicated a significant increase in SOD activity in their leaves compared with the control for 7 days (Table 2). APX activity was also different among cultivars in both cold acclimation and non-acclimated stages. The highest APX activity was for 21 days at cold acclimation; 19 (7.80 nmol/mg protein), 9 (5.40 nmol/mg protein), 10 (5.00 nmol/mg protein), whereas the lowest APX activity was obtained for 21 days; 10 (1.200 nmol/mg protein), 9 (1.700 nmol/mg protein) and 19 (2.200 nmol/mg protein). In contrast, the highest APX activity was observed for 7 days at non-cold acclimation; 19 (1.400 nmol/g FW), 9 (1.200 nmol/g FW) and 19 (0.500 nmol/g FW). Similarly, 19 breeding line showed the highest APX activity in terms of cold acclimation (Table 3). No significant differences in the level of CAT were obtained in the leaves of pea among breeding lines subjected to cold acclimation. However, CAT activity was different among breeding lines at non-acclimation. At cold acclimation, the highest CAT activity was obtained in the breeding line 19 (15.300 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ protein), whereas the lowest CAT activity was obtained in the breeding line 9 (14.800 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ protein) for 21 day at cold acclimation. Similarly, the breeding line 19 (2.600 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ protein) had the highest CAT activity at the non-acclimation (Table 4).

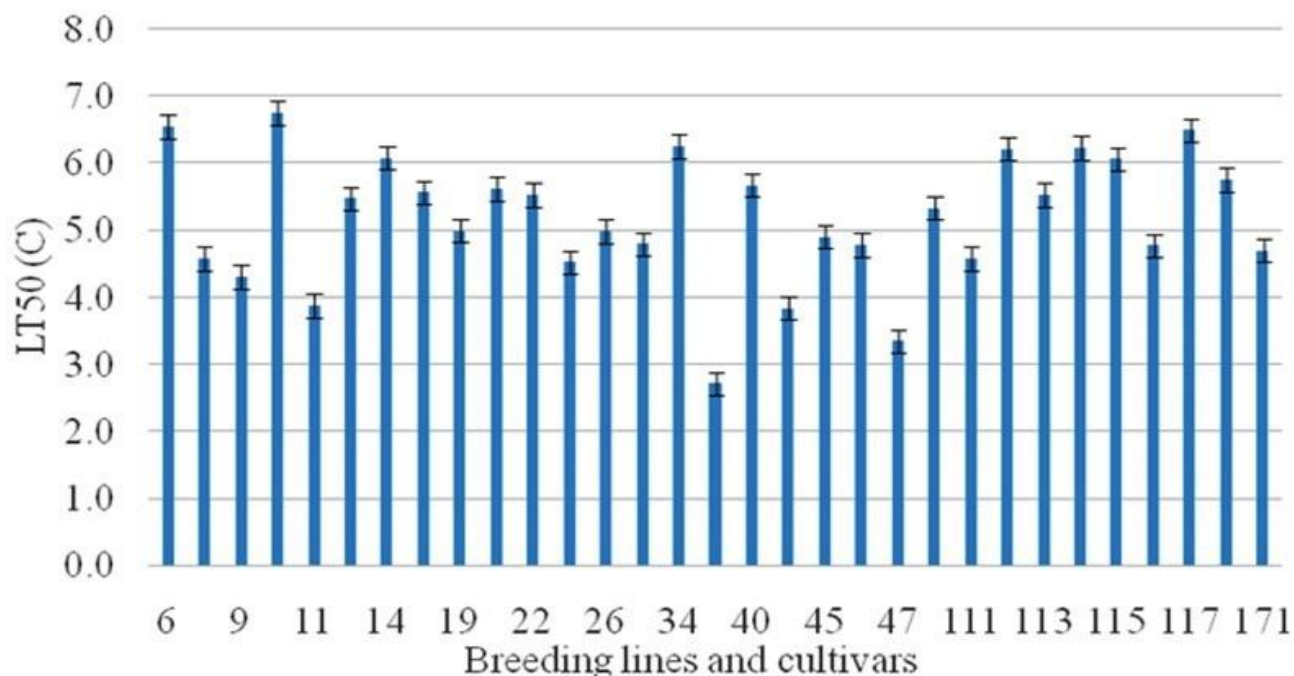


Fig 1.Changes in LT₅₀ of 25 breeding lines and 6 cultivars. Vertical bars indicate standart errors from means (n=3).

Table 1.Changes in prolinecontent of three pea breeding lines.

| Plant lines | 7 days (CO) | 7 days | 14 days | 21 days |
|-------------|-------------|--------|---------|---------|
| 9 | 3.9 | 6.3cB | 14.6bA | 22.10aB |
| 19 | 4.1 | 7.2cA | 14.3bA | 28.00aA |
| 10 | 4.1 | 5.5cC | 10.4bB | 21.3AB |

*Values with the different supercript in the same column are different at the P<0.05 level based on Duncan test.

Table 2.Changes in SOD activities of three pea breeding lines.

| Plant lines | 7 days (CO) | 7 days | 14 days | 21 days |
|-------------|------------------|--------|---------|---------|
| 9 | 2.6 ^c | 11.8aB | 6.1bA | 3.9cB |
| 19 | 3.7 ^a | 12.9aA | 8.2bc | 4.3cA |
| 10 | 3.2 ^b | 12.7aA | 7.1bB | 3.8CB |

*Values with the different supercript in the same column are significantly different at the P<0.05 level based on Duncan test.

Table 3.Changes in APX activities of three pea breeding lines.

| Plant lines | 7 days (CO) | 7 days | 14 days | 21 days |
|-------------|------------------|--------|---------|---------|
| 9 | 1.2 ^b | 1.7cB | 2.4bB | 5.4aA |
| 19 | 1.4 ^a | 2.2cA | 4.0bB | 7.8aA |
| 10 | 0.5 ^c | 1.2cC | 2.3bB | 5.0AC |

*Values with the different supercript in the same column are significantly different at the P<0.05 level based on Duncan test.

Table 4.Changes in CAT activities of three pea breeding lines.

| Plant lines | 7 days | 7 days | 14 days | 21 days |
|-------------|------------------|--------|---------|---------|
| 9 | 2.0 ^c | 4.7 | 9.9 | 14.9 |
| 19 | 2.6 ^a | 4.9 | 9.9 | 15.3 |
| 10 | 1.9 ^b | 4.8 | 9.8 | 14.8 |

*Values with the different supercript in the same column are significantly different at the P<0.05 level based on Duncan test.

DISCUSSION

Cold stress interferes with all cellular processes due to induction of morphological and biochemical changes in plant tissues and physiological alterations in plasma membrane, changes in enzymatic reactions and interactions among macromolecules (Taşginet al., 2006). The combination of different thermal analysis and LT has been commonly used to identify cold tolerance mechanisms in species (Pearce, 2001). Determination of LT temperatures is basic to evaluate whether plant tissues can resist ice crystals without significant freezing tolerance. Pea genotypes might differ in freezing tolerance due to differential survival of their variation in the environmental conditions (Shereenaet al., 2006). Therefore, improving cold resistant cultivars and recognition of strategies of cold tolerance could greatly progress cold resistance for pea plants. In this study, we determined cold resistance of 6 cultivars and 25 breeding lines as indicated by LT_{50} for various environmental conditions. Pea breeding lines and cultivars investigated in the present study displayed considerable differences in their response to subfreezing temperatures and in their acclimation potential against cold. The lethal temperatures (from LT_{10} to LT_{90}) for survival for most of the 31 samples ranged between -2.1 and -7.14 °C. Breeding line 10 was obviously the strongest of all genotypes studied; while 35 was much less strong. Our results also showed that 14, 34, 6 and 10 breeding lines can be considered as the most freezing tolerant cultivars among the other studied cultivars (Fig. 1). In terms of cultivars, Töre and Ürünlücü could be considered as the most freezing-sensitive cultivars. The LT_{50} values were somewhat similar to those reported in the literatures for garden pea (Wade, 1941). Ulubatlı, Özkaynak, Taşkent and Kirazlı were reported as frost tolerant cultivars in a previous study (Acikgozet al., 2009). In this study, we also found that Ulubatlı, Özkaynak, Taşkent and Kirazlı breeding lines had freezing resistance values close to that of freezing resistant 14, 34, 6 and 10 breeding lines. In a previous study Balackovaet al (1986). reported that no damage was observed in leaves of *Pisumfulvum* cultivars exposed to -6°C cold stress. Cold tolerance in the genotypes of *Pisumsativum* from 5 to 100%; it was highest in four conventional lines and five short-stemmed lines. In France, temperatures of -23°C and below are evaluated lethal to overwintering *Pisumsativum*, while temperatures of -6 to -14°C are considered as not damaging to totally resistant pea (Eteve, 1985). The results of this study are in accordance with previous studies reported in the literature. Increased proline content at low temperatures has been commonly reported in many plants species, including pea (Zhang et al., 2012). Proline content obviously increased in plants exposed to the acclimation condition in the leaves of breeding lines and cultivars compared to the controls. Under normal

conditions, different basal response contents were observed in three lines. Breeding line 19 displayed higher contents of proline in the acclimated state with respect to the non-acclimated state. Similarly, the freezing sensitive line (9) had promoted levels of proline in response to cold (Table 1). However, total proline content is dependent on the degree of cold resistance. Resistance cultivars and breeding lines had the highest concentration of proline. In cold treated plants, proline accumulation was higher than non-treated plants. Cold treated plants recovered faster than non-treated ones, therefore, due to proline's beneficial effects in plants in cold stress, cold acclimated plants could tolerate freezing temperatures much better than non-acclimated plants. Induced proline content may function in osmotic adjustment, ROS scavenging and protection of enzyme denaturation (Aslamarzet al., 2011), which are important for well adaptation to cold stress. Therefore, proline levels could be considered as potential markers for screening the cold resistance of pea breeding lines. These results are in agreement with other researchers' findings (Nayaret al., 2005a) that demonstrated the contents of proline in chickpea during cold acclimation. Furthermore, Javadianet al., 2010. reported that proline level in wheat seedlings was gradually promoted when exposed to cold stress. The results obtained in this study are in accordance with a previous report for walnut cultivars, where Aslamarzet al., 2011. Reported that freezing resistant walnut genotypes contain more free proline than the less resistant ones under low temperature conditions. Development of cold resistant in plants is strongly linked to the enrichment of antioxidant enzyme activity. Antioxidative enzymes are known to prevent cellular properties against ROS, which is produced in response to cold stress (Mutluet al., 2009). It has been shown that cold resistant species have higher antioxidant enzyme activities compared to cold sensitive species in many crops, including rice and maize (Anderson et al., 1994; Guoet al., 2005). Our results demonstrated that under cold stress conditions, a significant increase in SOD, CAT and APX activities was observed against oxidative stress in three breeding lines. SOD is the first step in defense mechanism against cold stress. Assessment of SOD activity in the leaves of three breeding lines under cold acclimation have showed an apparent increase and then decrease in parallel with the duration of cold treatment. Under cold stress, the increase in SOD activity was much higher in cold acclimated plants particularly when they were kept in 4°C for 7 days compared to non-acclimated ones and this alteration was observed mostly in 19 and 10 breeding lines. SOD activity in the cold tolerant and resistant breeding line 19 was the highest, whereas in the cold sensitive breeding line 9, its activity was lowest (Table 2). These results suggested a significant positive relationship between LT_{50} and SOD under both cold treatment and non-treatment conditions. Higher SOD

activity in cold resistant lines reflects better ROS scavenging capacity that helps detoxification of cells. In accordance with this study, Janmohammadi *et al.*, 2012 also documented that the SOD activity after cold acclimation was closely correlated to the decrease of LT₅₀ in winter-wheat. Besides, APX activity significantly increased in pea cultivars during cold acclimation (Table 3). Increase in APX activity during cold acclimation has also been documented at pine and spruce (Tandy *et al.*, 1989). In our study, the highest APX activity was detected in cold tolerant breeding line 19 on 21 days, however, the lowest ones were assayed in cold resistant breeding line 10 on 14 day at cold acclimate. However, a difference increase was observed in non-acclimated pea cultivars. In addition, correlation between LT₅₀ with APX activity under cold acclimated and non-acclimated conditions was statistically significant. Our results suggest that although it could diminish the damage of ROS, the activity of the APX enzyme does not have a direct role in the cold resistance of pea breeding lines. This is agreement with previous study that showed APX activity is not directly related to cold resistance (McKersie *et al.*, 1999). Cansev *et al.*, 2009, also reported that APX activity may not be related to the extent of cold resistance. In the meanwhile, CAT enzyme is found mainly in peroxisomes and also important in the protection of plants against cold stress (Sudhakaret *et al.*, 2001; Mutlu *et al.*, 2011). CAT activity significantly increased in three pea breeding lines during cold acclimation but no significant difference between breeding lines was observed. The lowest CAT activity was found in the cold resistant line (10), during both cold treatment and non-treatment conditions, whereas the highest CAT activity was found in cold tolerant line (19). These findings are in agreement with previous reports, where CAT activity was found to be closely relation with the extent of cold resistance in olive leaf tissue (Hashempouret *et al.*, 2014).

Based on the results, our study helped clarifying the cold resistance of pea and demonstrated that four breeding lines have the highest cold resistance among the 25 studied pea breeding lines. Moreover, ten breeding lines displayed tendency to be cold resistant. Our results also indicated that cold acclimation improved the activities of APX, SOD, CAT enzymes. Therefore, substantial activity of antioxidant enzymes and proline content may be proposed as selection criteria for obtaining resistant pea species for various environment conditions.

Acknowledgments: This study was approved by Erzurum Technical University Review Board (Project no: BAP 2015/10), and supported by Erzurum Technical University Research Fund.

REFERENCES

- Acikgoz, E, (2009). Genotype × environment interaction and stability analysis of dry matter and seed yield in field pea (*Pisum sativum* L.). Spain. J. Agri. Res. 7: 96-106.
- Anderson, M.C., T.K. Prasad, B.A. Martin and C.S. Stewart (1994). Differential gene expression in chilling-acclimated maize seedlings and evidence for the involvement of abscisic acid in chilling tolerance. Plant. Physiol. 105: 331-339.
- Andrews, P.K., C.R. Sandidge and TK. Toyama (1984): Deep supercooling of dormant and de-acclimating Vitis buds. Amer. J. Enol. Viticult. 35: 175-177.
- Aslani, A.A., K. Vahdati, M. Rahemi, D. Hassani and C. Leslie (2011). Cold hardiness and its relationship with proline content in Persian Walnut. Eur. J of Hortic. Sci 76: 84-90.
- Balackova, N.E., A.P. Lakhonov and V.N Zaitsev (1986). Resistance of pea and French bean breeding material to unfavorable temperatures. Nauchno Tekhnicheskii Byulleten Vs esoyusnogo Nauchno Issledovadel Skogo Instituta Z ernobobovykh I Krupnykh Kultur. 35: 66-71.
- Bates, L., R.P. Waldren and I.D Teare (1973). Rapid determination of free proline for water- stress studies. Plant and Soil. 39: 205-207.
- Bezirganoglu, I, (2017). Response of five triticale genotypes to salt stress in in vitro culture. Turk. J. Agric. For. 41: 372-380.
- Burke, M.J., LV. Gusta, H.A. Quamme, C.J. Weiser and P.H. Li (1976). Freezing and injury in plants. Annu. Rev. Plant. Physiol. 27: 507-528.
- Cansev, A., H. Gulen and A. Eris (2009). Cold-hardiness of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages: seasonal alteration of antioxidative enzymes and dehydrin like proteins. J. Agric. Sci. 147: 51-61.
- Chaitanya, K.V., D. Sundar, S. Masilamani and A.R Reddy (2002). Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars. Plant. Growth. Regul. 36. 175-180.
- Dhindsa, R.A., P. Dhindsa and TA Thorpe (1981). Leaf senescence correlated with increased permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J. Exp. Bot. 126: 93-101.
- Eteve, G, (1985). Breeding for Tolerance and Winter Hardiness in Pea. In: The Pea Crop A Basis for Improvement, Hebblethwaite, P.D., M.C. Heath and T.C.K. Dawkins (Eds.) Butterworths, London, UK.
- Guo, Z., H. Tan, Z. Zhu, S. Lu and B. Zhou (2005). Effect of intermediates on ascorbic acid and oxalate

- biosynthesis of rice and in relation to its stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 955-962.
- Hashempour, A., M. Ghasemnezhad, RF. Ghazvini, and M.M Sohani (2014). Olive (*Olea europaea* L.) freezing tolerance related antioxidant enzyme activity during acclimation and non-acclimation. *Acta. Physiol. Plant*. 36: 3231–3241.
- Janda, T., G. Szalai, K. Rios Gonzalez, O. Veisz, and E. Paldi (2003). Comparative-study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science*. 164: 301-306.
- Janmohammadi, M., V. Enayati, and N. Sabaghnia (2012). Impact of cold acclimation, de-acclimation and re acclimation on carbohydrate content and antioxidant enzymes activities in spring and winter wheat. *Intl. Agric. Sci.* 25: 3-11.
- Javadian, N., G. Karimzadeh, S. Mahfoozi, and F. Ghanati (2010). Cold-induced changes of enzymes, proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat. *Russian J. Plant Physiology*. 57: 540-547.
- Kovács, Z., L. Simon-Sarkadi, C. Sovány, K. Kirsch, G. Galiba, and G Kocsy (2011). Differential effects of cold acclimation and abscisic acid on free amino acid composition in wheat. *Plant Science*. 180: 61–68.
- Lewit, J. (1980). Responses of Plants to Environmental Stresses. New York, NY, USA: Academic Press.
- McKersie, B.D., S.R. Bowley, and K.S. Jones (1999). Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol* 119: 839-847.
- Mutlu, S., O. Atici, N. Esim, and Mete E (2011). Essential oils of catmint (*Nepeta meyeri* Benth.) induce oxidative stress in germinating seeds of various weed species. *Acta. Physiologiae Plantarum*. 33: 943-951.
- Nakano, Y., and Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant. Cell. Physiol.* 22: 867-880.
- Nayyar, H., K. Chander, S. Kumar, and Bains T (2005a). Glycine betaine mitigates cold stress damage in Chickpea. *Agron. Sustain. Dev.* 25: 381-388.
- Noreen, Z., and Ashraf M (2009). Assessment of variation in antioxidative defense system in salt treated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. *J. Plant. Physiol.* 166: 1764-1774.
- Pearce, R.S. (2001). Plant freezing and damage. *Ann Bot (Lond)* 87: 417–424.
- Shahid, M.A., RM. Balal, M. Pervez, T. Abbas, M. Ashfaq, U. Ghazanfar, M. Afzal, A. Rashid, F. Garcia-Sanchez, and N. Mattson (2012). Differential response of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes to salt stress in relation to the growth, physiological attributes antioxidant activity and organic solutes. *Aust. J. Crop. Sci.* 6: 828–838.
- Shereena, J., and N. Salim (2006) Chilling Tolerance in *Pisum sativum* L. Seeds: An Ecological Adaptation. *Asian J. Plant Sci.* 5: 1047-1050.
- Reyes-Diaz, M., N. Ulloa, A. Zuniga-Feest, A. Gutierrez, M. Gidekel, M. Alberdi, LJ. Corcuera, and LA Bravo (2006). Arabidopsis thaliana avoids freezing by supercooling. *J. Experimental. Botany.* 57: 3687-3696.
- Ruiz, J.M., E. Sanchez, PC. Garcia, LR. Lopez and RM Rivero (2002). Proline metabolism and NAD kinase activity in green bean plants subjected to cold-shock. *Phytochemistry.* 59: 473-478.
- Sudhakar, C., A. Lakshmi, and Giridarakumar S (2001). Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Sci* 161: 613-619.
- Tan, M., K. Ali, and D Zeynep (2012) Morphological characteristics and seed yield of east anatolian local forage pea (*pisum sativum* ssp. *arvense* L.) ecotypes. *Turkish J. Field Crops.* 17: 24-30.
- Tandy, N.E., RTD. Giolio, and CJ Richardson (1989) Assay and electrophoresis of superoxide dismutase from red spruce (*Picea rubens* Sarg.), Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and Scot pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant. Physiol.* 190: 742-748.
- Turk, H., S. Erdal, M. Genişel, O. Atici, Y. Demir, and Yanmış D (2014). The regulatory effect of melatonin on physiological, biochemical and molecular parameters in cold-stressed wheat seedlings. *Plant Growth Regulation.* 74: 139-151.
- Upadhyaya, A., D. Sankhla, TD. Davis, Sankhla. N, and BN Smith (1985). Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. *J. Plant. Physiol.* 121: 453-461.
- Wade, BL. (1941). Frost tolerance of strains of market garden peas. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 38: 530-534.
- Zhang, J., X. Wu, X. Niu, R. Liu, Y. Liu, W. Xu, and Wang Y (2012). Cold-resistance evaluation in 25 wild grapes species. *Vitis.* 51: 153-160.