

Bitkilerin Düşük Sıcaklıklara Dayanımında Hüresel ve Moleküler Mekanizmalar

Rafet ASLANTAŞ¹ Halil KARAKURT¹ Yaşar KARAKURT²

¹Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 25240-ERZURUM (halilkarakurt@yahoo.com)

²Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü-Isparta

Geliş Tarihi : 30.12.2010

Kabul Tarihi : 07.02.2011

ÖZET: Sıcaklık, yeryüzünde doğal bitki topluluklarının normal dağılışında etkili olan önemli bir belirleyici faktördür. Pek çok bitki tür ve çeşidi, çoğu zaman genetik özellikleri çerçevesinde canlı kalabildikleri en düşük sınır derecelerindeki sıcaklıklarla karşı karşıya kalmaktadır. Soğuğa dayanım sürecinde, bitkiler üşüme ve don stresi sonucu oluşabilecek zararlanmalardan veya ölümlerden korunmak veya tolerans sağlamak için farklı mekanizmalar geliştirmektedirler. Bunlar; bitkilerde hücre içi ve hücreler arası don oluşum sürecinin ekzotermik etkileri, don zararı sürecinde hücre membranlarında fiziksel değişimler, dona dayanım ve soğuk aklimasyonu, soğuk aklimasyonu süresince biyokimyasal değişimler (bitki öz suyunda bulunan bazı çözülebilir maddelerdeki, hücre membranlarının lipid bileşimindeki, protein miktarındaki, enzim aktivitesindeki, antioksidant sistemdeki, bitki besin elementlerindeki değişimler gibi) olarak kategorize edilmektedir. Günümüzde soğuğa dayanım sürecinin genetik olarak da açıklanabilmesi için moleküler düzeyde önemli çalışmalar yürütülmektedir. Bu orijinal derleme makalesinde, dünya üzerinde bitki tür ve çeşitlerinin yetişmesinde en büyük sınırlayıcı faktör olan üşüme ve donma stresine karşı bitkilerin geliştirdiği savunma mekanizmaları, bu süreçteki biyofiziksel ve biyokimyasal değişimler ile moleküler düzeydeki gelişmeler mevcut literatür dahilinde açıklanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bitki, Üşüme ve Donma, Soğuğa Dayanım, Biyofiziksel ve Biyokimyasal Değişim

The Cellular and Molecular Mechanisms on Resistance to Low Temperatures in Plants

ABSTRACT: Temperature is one of the distinctive factor having influence on distribution of natural plant societies. Many plant species and varieties are usually subject to the lowest limit temperature degrees to be remained alive within the frame of their own genetic traits. Plants improve different mechanisms to be protected or tolerated to injuries or deaths which might be resulted from chilling and freeze stresses in cold resistance duration. These have categorized such as exothermic effects of extracellular and intracellular freeze formation process in plants, physical changes in cell membranes during freeze injury, cold resistance and cold acclimation, biochemical changes during cold acclimation (changes in soluble matters in plant sap, lipid content in cell membranes, protein content, enzyme activity, antioxidant system, plant nutrient elements *etc.*). Nowadays, some investigations have been carried out at molecular level to be explained genetically cold resistance of plants. In this originally rewiev, the defense mechanisms of plants against chilling and freeze stresses which are one of the biggest restrictive factors on plant growth over the world, biophysical and biochemical changes during this process and also improvements in molecular level were compiled by being investigated a lot of different studies related to this subject.

Keywords: Plant, Chilling and Freeze, Cold Resistance, Biophysical and Biochemical Change

GİRİŞ

Sıcaklık doğal bitki topluluklarının yeryüzündeki normal dağılışında etkili olan belirleyici bir faktördür. Pek çok bitki tür ve çeşidi kendi genetik özellikleri çerçevesinde canlılıklarını sürdürebilmek için çoğu kere sınır dereceleriyle karşı karşıya kalabilmektedir. Dünya üzerinde karasal alanın yaklaşık %25'lik kısmı 15°C'nin altına düşmeyen ve don zararı açısından güvenilir olan bölgelerden oluşmaktadır. Geri kalan bölgelerde belirli dönemlerde sıcaklığın 0°C'nin altına düşmesi nedeniyle özellikle hassas bitkiler zarar görebilmektedir (Sakai ve Larcher, 1987; Scebba vd. 1998; Zhao, 1998; Pearce, 1999; Vagujfalvi vd. 1999; Pearce, 2001; Szalai vd. 2001; Puhakainen, 2004). Bitkisel üretimde soğuk stresinin önemi artmış ve araştırıcılar tarafından kapsamlı şekilde ele alınmaya başlanmıştır. Bu konuda bitkilerde soğuğa dayanımın sağlanması amacıyla klasik ıslah veya moleküler teknikler ile ilgili birçok farklı bitkide çalışmalar yürütülmüş ve yürütülmeye devam edilmektedir (Szalai vd. 2001).

Bitki dokuları arasında ve mevsimsel olarak soğuğa dayanım bakımından farklılıkların olması, dona dayanım mekanizmasının izahını daha karmaşık hale getirmiştir. Orta Avrupa çamalarında yaz periyodunda -10°C'lik sıcaklık yaprakların ölümüne neden olurken, kışın çok daha düşük derecelerde bile canlılıklarını sürdürmektedirler (Greene, 2002; Beck vd. 2004). Turunçgillerde, kışlık tahıllarda, patatesten, yaprağını döken meyve ağaçlarında ve bazı sebzelerde 2°C'lik bir dona dayanıklılık sağlanabilirse, bunların toplam veriminde önemli artışlar olacaktır. Ters durumda da önemli kayıplar söz konusu olabilir. Mesela, Dünyanın ortalama sıcaklığındaki 1°C azalma, pirinç üretiminde % 40'lık azalmaya neden olabilir (Pearce, 1999).

Bitkilerin dokusunu etkileyen atmosfer sıcaklıkları, bitkiyi iki şekilde etkilemektedir. Birincisinde, bitki metabolizmasında değişimlere yol açan enzimlerin katalizledikleri reaksiyon oranları ve aktiviteleri değişmektedir. İkincisinde ise ekstrem sıcaklıklar bitkilerde zarara neden olmaktadır.

Ekstrem sıcaklık koşullarında canlılığın devam ettirilmesi sorunu, makromolekül içeriği, hücrelerin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün devam etmesine bağlıdır. Hayvanlardan farklı olarak karasal alanda yaşayan bitkiler, olumsuz çevre şartlarından kaçınmak ve korunmak için yer değiştiremez. Bu sebeple bitkiler ekstrem çevre şartlarına karşı, canlılıklarını sürdürebilmek için fizyolojik ve biyokimyasal stratejiler geliştirmek zorundadırlar. Bu yüzden bitkiler belirli süreçlerde olumsuz faktörlere adaptasyon sağlamaktadırlar (Nilsen ve Orcutt, 1996).

Yüksek sıcaklığa bağlı olarak oluşan kuraklık, düşük sıcaklığa bağlı olarak oluşan donlar bitkilerin canlı kalmaları ve gelişimlerini etkileyen ana stres faktörlerindedir. Bitkilerde stres şartlarına dayanım iki şekilde sağlanmaktadır. Bunlar;

1. Avoidans (mevcut stres faktörünü azaltma veya engelleme özelliği),
2. Tolerans (zarar görmeden veya hafif zarar ile strese karşı canlı kalabilme).

İlman iklim bölgelerindeki pek çok bitki türü belirli bir süre donma derecelerinde olmayan düşük sıcaklıklara maruz kalarak don zararına karşı dayanım kazanabilmektedir. Bu karmaşık adaptasyon süreci, soğuk aklimasyonu veya soğuğa dayanım süreci olarak adlandırılmaktadır. Soğuk aklimasyon süresince, bitkiler don stresinden korunmak veya tolerans sağlamak için farklı mekanizmalar geliştirmektedir. Bunlar lipit bileşiminde, enzim aktivitelerinde değişimler, şeker ve aminoasit içeriklerinde artışlar, bazı proteinlerin seviyelerinde ve gen ekspresyonunda değişiklikler şeklinde ifade edilmektedir (Howarth ve Ougham, 1993; Burke, 1995).

Bitkilerde soğuk stresine karşı dayanım mekanizması birçok faktörün etki ettiği karmaşık bir durumdur. Bu nedenle bunu ortaya çıkarabilmek için birçok önemli faktörün üzerinde durulması gerekmektedir. Öncelikle hücre içi ve hücreler arası don oluşum mekanizması, don oluşumu öncesinde ve bu süreçte dokudaki nem ve kuru madde içeriğindeki değişim, lipitler, protein, bazı aminoasitler, antioksidant enzimler, makro ve mikro besin elementlerindeki değişimlerin incelenmesinin önemli olacağı düşünülmektedir.

BITKİLERİN DÜŞÜK SICAKLIKLARA DAYANIMINDA HÜCRESEL MEKANİZMALAR

Bitkilerde Don Dayanım ve Soğuk Aklimasyonu

Meyve ağaçlarının soğuğa dayanımları türlere göre farklılık göstermektedir. Elma ve vişne gibi meyve türleri soğuklara daha dayanıklı oldukları halde, kayısı ve badem gibi meyve türleri soğuklardan çok zarar görmektedir. Doğal olarak

bitkilerin soğuklardan zararlanmasında içerisinde buldukları dönemler, düşük sıcaklığın derecesi, düşme hızı ve etkili olduğu süre gibi faktörler etkili olmaktadır. Soğuğa dayanımda yalnız türler arasında değil, çeşitler arasında da farklılıklar vardır. Meyve ağaçlarının organlarının soğuğa dayanıklılık dereceleri de değişmektedir (Aslantaş, 2008). Soğuklardan en fazla etkilenen organlar çiçek tomurcuklarıdır. Bunlar da özellikle açmaya başladıkları dönemlerde soğuklara çok duyarlıdırlar. Çiçek tomurcuklarının soğuklara dayanıklılığı, içinde buldukları gelişme periyoduna göre değişmektedir. Bu tamamen bitkinin içindeki metabolik değişimlerden kaynaklanmaktadır. Örneğin, dinlenme halindeki hücrelerde şeker oranının ve proteinlerin artışı hücre içindeki buz oluşumunu azaltarak don dayanıklılığı arttırmaktadır (Küden vd. 1998).

Birçok bitki türü için, don dayanım statik değildir. Sıcaklık ve diğer çevresel şartlar değiştiğinde, düşük sıcaklığa dayanımda mevsimsel olarak değişebilmektedir. Doğada odunsu bitkilerin soğuğa aklimasyon tepkileri genellikle, kısa gün fotoperiyot sürecini takiben donma derecelerinde olmayan sıcaklıklar ile tetiklenmektedir (Sakai ve Larcher, 1987; Smallwood ve Bowles, 2002; Puhakainen, 2004). Bitkiler sonbahar döneminde doğal aklimasyon süreci geçirerek soğuklara daha dayanıklı olabilmektedirler (Dalmannsdottir vd. 2001; Wisniewski ve Basett, 2003). Soğuk aklimasyonu sadece donma derecesinde olmayan düşük sıcaklıklara değil, aynı zamanda kuraklık ve ABA gibi farklı uyartıcı etkenler tarafından da tetiklenmektedir (Howarth ve Ougham, 1993). Aklime olmayan yüksek sıcaklıklarda hücre kültürü veya tüm bitkiye dıştan ABA uygulaması *Solanum commersenii* (Chen vd. 1983), *Arabidopsis thaliana* (Crespi vd. 1991), *Brassica napus* (Orr vd. 1986) türlerinde don dayanımı daha hızlı şekilde uyardığı saptanmıştır. Bünyesel ABA içeriğinin soğuk uygulanmış bitki dokularında artış gösterdiği belirlenmiştir (Bertrve vd. 1997).

Soğuk aklimasyonu, düşük sıcaklığa tepki gösteren bitkilerde fizyolojik ve metabolik değişimlerin bir kombinasyonundan kaynaklanan yüksek derecede aktif bir süreçtir (Steponkus, 1984). Soğuğa aklimasyon sürecinde pek çok olay maksimum dayanım kazanılmasında gerekmektedir. Bunlar; çevresel değişimlerle beraber hormonal değişimler, değişen gen aktivitesi ve yeni gen ürünleri, çözünebilir maddelerin birikiminde ve lipit bileşiminde oluşan değişimler şeklinde belirtilebilir (Howarth ve Ougham, 1993; Aslantaş, 1999).

Dokulardaki suyun aşırı soğuma durumu, antifiriz özellikteki maddelerin (krioprotektan) birikimi don stresinden korunmada etkili olabilmektedir. Don dayanımda Avoidans

mekanizması genellikle otsu bitkilerde, çok yıllık odunsu bitkilerde ise tolerans faktörü daha baskın olmaktadır. Her iki mekanizma aynı bitkide birlikte rol alabilmektedir. Örneğin, çiçek ve yaprak tomurcuklarının iç dokularındaki su, tomurcuk pullarına taşınarak burada aşırı soğuma gösterebilmektedir. Bu durum don zararının azalmasına katkı sağlamaktadır. Odunsu bitkilerde parankima, floem gibi dokular bu şekilde don zararını tolere edebilmektedirler (Sakai ve Larcher, 1987; Nilson ve Orcutt, 1996).

Bitkilerin çevresel ekstrem şartlarda canlı kalabilmesi, onların bu şartlara morfolojik ve fizyolojik olarak adapte olabilmeye yeteneklerine bağlıdır. Küçük, kalın yapraklar, yüksek kök/sürgün oranı gibi özellikler bitkilerin çevresel stres faktörleriyle mücadele edebilmesinde önemli olmaktadır (Nilson ve Orcutt, 1996). Şeftalilerde yapılan dona dayanıklılık çalışmasında, tüm çeşitlerin en yüksek dayanıklılığı ocak ve şubat aylarında, en düşük dayanıklılığı mart ayında gösterdiği belirlenmiştir. Triogem ve Golden Jubilee çeşitlerinin tomurcukları -21.1°C 'de suni don testine tabi tutulmuştur. Ocak ayında sırasıyla % 58.3 ve % 55.1 oranlarında canlılık gösterirken, mart ayında bu oran her iki çeşitte de % 0.6'ya düşmüştür. Ayrıca dayanıklılığın çeşitlere göre değiştiği ifade edilmiştir (Küden vd. 1998). Bazı şeftali, kayısı ve kiraz çeşitlerinin dona dayanım derecelerinin saptanması için şubat ve mart aylarında 6-8 saat süreyle -10°C ve -15°C 'deki sıcaklıklara maruz bırakılmışlardır. Sonuçta -10°C 'de şeftali tomurcuklarının tamamının, kayısı tomurcuklarının % 88,8'nin ve kiraz tomurcuklarının %96'sının zararlandığı saptanmıştır (Küden vd. 1998). Ertürk ve Güleriyüz (2007), Erzincan koşullarında bazı yerli ve yabancı kayısı çeşitlerinin dona dayanımları üzerine yapılan çalışmada Kasım (dinlenme başlangıcı), Ocak (dinlenme ortası) ve Mart (dinlenme sonu) aylarında alınan tomurcuklarda farklı sürelerde uygulanan yapay don testlerinde dönem ve yıllara göre çeşitler arasında dayanıklılık derecesinin değişim gösterdiği saptanmıştır. Don testi uygulanan tomurcuklarda zararlanma oranı ile elektriksel iletkenlik ve iletkenlik oranları arasında pozitif, tomurcukların su içeriğiyle ise negatif ilişkiler belirlenmiştir. Kayısı çeşitlerinde tomurcuklardaki toplam şeker, protein ve lipit miktarları dinlenmenin başlangıcından sonuna değin artmış, nişasta ise azalmıştır. Aslandaş (1999), Erzincan ekolojisinde bazı yerli ve yabancı orijinli badem çeşitlerinin dona dayanımları bakımından farklılık gösterdiği, geç uyanan genotiplerin daha avantajlı olduğu suni don testleri neticesinde belirlenmiştir. Çiçek tomurcuğunun dona dayanıklılığının kuru madde ve Ca içeriği ile pozitif, Cu içeriği ile negatif korelasyona sahip olduğunu belirlemiştir.

Bitkilerde Hücre İçi ve Hücreler Arası Don Oluşumu

Bitkiler donma sıcaklıklarına maruz kaldıklarında neler olduğunun bilinmesi için, suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri ile donma olayının bilinmesi gerekir. Saf suda 0°C 'de katıdan sıvıya veya sıvıdan katıya bir faz geçişi söz konusudur. Donma olayı karmaşık bir olaydır. Don zararı, hücreler arası don oluşumu ve hücre içinde dehidrasyon ile tolere edilmeye çalışılır (Lewitt, 1980). Bitki hücrelerinde olduğu gibi çözeltiler farklı sıcaklıklarda donma ve erime özelliğine sahiptir. Çözeltiler genellikle gerçek donma olmadan önce aşırı soğuma gösterirler. Aşırı soğumanın büyüklüğü birçok faktörün etkisiyle değişir. Bazı organ ve dokular aşırı soğuma ile dondan korunur. Aşırı soğumanın sınırları aşıldığında hücre dışında buz kristalleri oluşur. Hücre içinden dışarıya meydana gelen su kaybı tolere edilecek seviyeyi aşınca ölüm meydana gelir. Donma nedeniyle ksilem iletim demetlerinde meydana gelen tıkanmalar sürgün ölümlerine neden olur (Pearce, 1999; Pearce, 2001; Kocaçalışkan, 2002; Smallwood ve Bowles, 2002; Wisniewski ve Basett, 2003). Hücre membranlarındaki yapının kimyasal ve enzimatik bileşimindeki değişiklik, aşırı soğuma özelliğinde de değişikliğe neden olmaktadır. Hücreler arası ve hücre içi don oluşumunda doku için koruyucu özellik arz eden sıcaklık yükselmeleri (ekzoterm) meydana gelmektedir. Yapılan çalışmalarda 3 hafta süresince -30°C 'nin altındaki sıcaklıklara maruz kalan odunsu bitkilerden alınan örneklerde düşük sıcaklık ekzotermi belirlenmiştir (Wisniewski ve Basett, 2003).

Hücre içi don oluşumu doğada yaygın değildir. Ancak hücrelerarası don, tüm ılıman iklim bölgelerinde kış sürecinde bitkilerde meydana gelmektedir. Çözülebilir kuru maddenin daha düşük konsantrasyonu ve buz oluşumunu sağlayan nükleatörlerin varlığından dolayı buz oluşumu hücrelerarası boşluklarda başlar (Pearce, 1988). Hücrelerarası don, buz çekirdeklerinin oluşumu ile soğuma şiddeti gibi çevresel faktörlere bağlıdır (Palta ve Weiss, 1993). Hücrelerarası buzun kademeli olarak artışı, hücrelerden suyu dışarı çekmektedir. Hücrelerarası buz oluşumu neticesinde oluşan dehidrasyon ve mekanik stresler don zararına büyük oranda katkı sağlamaktadır (Sakai ve Larcher, 1987). Burada meydana gelen buz kristallerine maruz kalma süresi, donma ve erime oranları, erime sonrası koşullar da zararı etkileyebilir. Donma süreci ve don zararının derecesi bitkinin anatomik yapısı, yaşı, su içeriği tarafından da etkilenmektedir (Palta ve Weiss, 1993).

Birçok metot bitkilerdeki don zararı hakkında önemli bilgiler verebilmektedir. Görüntüleme

metotlarındaki gelişmeler (infrared video termograf) buzun oluşması ve yayılması ile yapısal özelliğini kesin bir şekilde göstermekte ve ekzotermilerin yakalanmasını sağlamaktadır. Diferansiyel termal analiz (DTA), diferansiyel skaning kalorimetre (DSC), düşük sıcaklık tarayıcı elektron mikroskobu (LTSEM), nükleer manyetik rezonans (NMR) bitki don zararını analiz etmede önemlidir (Pearce, 2001; Wisniewski ve Basett, 2003; Aslantaş, 2008). Diferansiyel termal analiz (DTA) meyve ağaçlarında dokuların soğuğa dayanım derecelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Wisniewski ve Basett, 2003; Aslantaş, 2008).

Don Zararı Sürecinde Hücre Membranlarındaki Değişimler

Donma sıcaklığına maruz kalan buğday bitkilerinden izole edilen membranlarda lipit peroksidasyonu belirlenmiştir (Pukacki vd. 1991) Yapılan çalışmalar sonucu don stresinin membranlarında süperoksit oluşumunu hızlandırdığı belirlenmiştir. Hücreler arası su donduğu zaman, buz-su oluşumunun dışında kalan bitki öz suyunda çözünmüş olan maddeler dokuların bünyesinde tutulmaya devam etmektedir (Kendall ve McKersie, 1989; Zhao, 1998).

Sudaki oksijenin çözünürlüğü daha düşük sıcaklıklarda arttığından, oksijen don stresi süresince kolayca hücelere yayılır. Oksidasyon (yükseltgenme) ve redüksiyon (indirgenme) reaksiyonları ile ilişkili elektron taşıma zincirleri ve enzimler don dehidrasyon zararı nedeniyle bozulmaktadır. Elektronlar vericilerden alıcılara düzenli şekilde aktarılamaz. Bu nedenle taşıma zincirlerinden dışarıya sızan elektronlar süperoksit (O₂) veya moleküler oksijen oluşumunu artırmaktadırlar. Aktif oksijen türevlerinin oluşumu membran lipitlerinin bozulmasını hızlandırmakta ve serbest yağ asitleri ve/veya peroksidasyon ürünlerinin birikimine neden olmaktadır (Shewfelt, 1992).

Lipoxigenaz enziminin serbest yağ asitlerini enzimatik veya kimyasal olarak hidrolize ederek peroksidasyonun ana kaynağını oluşturduğu yapılan araştırmalar sonucunda tespit edilmiştir (Thompson, 1989). Membran lipitlerinde esterleşmiş yağ asitlerinin serbest radikal üretim reaksiyonları, bunların süpürülme oranını aşması kritik noktadır. Bitki plasma membranları oksijen türevlerini tüketme yeteneğine sahip redoks sistemlerine sahiptir (Shewfelt ve Ericson, 1991). Burada genellikle bir elektron vericisi olan NAD(P)H kullanılarak süperoksit oluşturulur (Crane vd. 1991). Plasma membranlarındaki redoks sistemleri pek çok fizyolojik süreçte önemli bir role sahiptir. Ancak stres şartlarında membran zararına katkı sağlayan aktif oksijen türevlerinin üretimi hakkında çok fazla bilgi yoktur. Son yıllarda su stresi altında bulunan

buğday bitki köklerinin plasma membranlarında oksijen tüketimi ve süperoksit üretiminin, lipit peroksidasyonu sonucunda artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu durumun plasma membran redoks sisteminin hücrel oksijen radikallerinin üretiminde önemli bir faktör olabileceği kabul edilmekte ve bu durumun lipit peroksidasyonu yoluyla membrana zarar verebileceği belirtilmiştir (Serrano vd. 1995).

Genel olarak don zararı sonucunda; membran yarı geçirgenliğinin bozulması, iyonların aktif taşınımında kayıplar, fosfolipitlerin bozulması ve membranların fiziksel yapısındaki faz değişimi meydana gelmektedir (Lewitt, 1980). Sitoplazma ve onu çevreleyen plasma membranının yarı geçirgen özelliği donma/erime süresince suyun içeriye/dışarıya akışını kontrol etmede önemli bir role sahiptir. Hücre içindeki çözünbilir maddelerin dışarıya çıkmasını engelleme ve en önemlisi hücelerarası buzun plasma membranı içindeki bölgeye zarar vermesini önlemektedir. Donma/erime süresince bu yapısal ve fonksiyonel özelliklerin sürekliliği canlılığın devam ettirilmesinde önemlidir (Lewitt, 1980).

Hücre membranları temel olarak lipit ve proteinleri içerdiklerinden, membran zararı ya lipit ya da protein veya her ikisinde değişimlerin meydana gelmesi şeklinde meydana gelebilmektedir. Plasma membranının zarar görme mekanizması üzerinde yapılan çalışmalarda don zararı sonucunda proteinlerdeki sulfhidril (SH) gruplarının oksidasyonu, plasma membranı H⁺-ATPaz aktivitesinde azalma meydana geldiği belirlenmiştir (Palta ve Weiss, 1993). Lewitt'in SH hipotezine göre, plasma membranlarında don zararı membran proteinlerinin dağılmasına sebep olmaktadır. Don zararından sonra çözülebilir protein -S-S- bağ yapılarında artış görülmüştür. Moleküller arası bu disülfid bağları protein moleküllerinin bir arada kalmasını sağlamaktadır. Saf SH içeren enzimlerle yapılan çalışmalarda don sonucu bu enzimlerin inaktif olduğu belirlenmiştir (Lewitt, 1967).

BİTKİLERİN DÜŞÜK SICAKLIKLARA DAYANIMINDA MOLEKÜLER MEKANİZMALAR

Soğuk aklımasyonu süresince oluşan biyokimyasal değişimler, bitki öz suyunda çözünebilen maddelerin değişimi, membran lipit bileşimindeki, protein miktarında, enzim aktivitesinde, antioksidant sisteminde değişim ve bitki besin elementi içeriğinde meydana gelen biyokimyasal değişimler bitkilerin düşük sıcaklığa dayanıklılık mekanizmalarında oldukça önemlidir. Bu moleküllerin etkileri ayrı ayrı ele alınmıştır.

Bitki Öz Suyunda Çözülebilir Maddelerdeki Değişimler

Düşük sıcaklıkların etkili olduğu yerlerde yaşamını devam ettiren bitkilerin suda çözülebilir karbonhidrat ve aminoasitleri biriktirdiği ve bunların dona dayanımda etkili olduğuna yönelik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Fruktozlar, sakaroz, poliyol (polihidrik alkol türevi) ve prolin gibi maddelerin bitkiler düşük sıcaklığa maruz kaldığı periyotlarda bünyelerinde biriktiği yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Smirnoff, 1995a; Savitch vd. 2000). Fakat bu maddelerin birikim sebebi ve fonksiyonları tam olarak açıklanamamıştır.

Karbonhidratlar bitkilerde soğuğa dayanımda temel kriyoprotektanlardır. Sakaroz dona dayanıklı bitkilerde en yaygın şekilde bulunmaktadır. Karbonhidrat seviyesinin uzayan düşük sıcaklık süresince 10 kata kadar bir artış gösterdiği ve bu birikimin dona dayanımda etkili olduğu belirlenmiştir (Guy, 1990). Bu etkiyi muhtemelen karbonhidratların ölümcül hücre içi donma noktasını daha düşük derecelere çekerek meydana getirdiği belirtilebilir. Bu maddeler ayrıca sitoplazmadan dehidrasyonu önlemek için osmoprotektan olarak görev alarak donmanın tolere edilmesini için hücreleri hazırlamaktadır. Ayrıca proteinlerin etrafında bulunan suyun muhafaza edilmesine de yardımcı olarak dayanıma katkı sağlamaktadır (Smirnoff, 1995a). Buğdayda soğuk aklımasyonu sürecinde prolin ve çözülebilir şekerlerde birikimin olduğu belirlenmiştir (Vagujfalvi vd. 1999; Smallwood ve Bowles, 2002). Yonca'da yapılan çalışmada soğuğa dayanım sürecinde prolin miktarında artış belirlenmiştir (Dalmanndottir vd. 2001). Esas itibarıyla prolin amino asiti, stres şartlarında bir savunma mekanizması olarak sentezlenmektedir (Aslandaş, 2008).

Kışlık buğdayda yapılan çalışmada kış döneminde yapraklarda glikoz, fruktoz, sakkaroz içeriklerinde artış olduğu belirlenmiştir. Pek çok çalışmada şeker içeriği ve abiyotik streslere dayanım derecesi arasında pozitif bir korelasyon belirlenmiş ve daha yüksek şeker içeriğinin soğuğa dayanımı arttırdığı belirlenmiştir (Vagujfalvi vd. 1999). Hücrelerarasında vizkoz yapının oluşumu, dona dayanımda önemlidir ve bu durum dokunun şeker içeriğiyle ilişkilidir. Kavaktaki camsı yapının -20°C'nin altındaki sıcaklıklarda oluşmaya başladığı belirtilmiştir (Dalmanndottir vd. 2001; Wisniewski ve Basett, 2003).

Norveç ve İzlanda kökenli iki yonca çeşidinde yapılan çalışmada daha soğuk bölge şartlarında yetişen Norveç çeşidinde daha fazla kuru madde birikimi olduğu saptanmıştır. Eylül ayında nişasta içeriği Norveç çeşidinde daha yüksek bulunmuştur. Fakat Ocak ayına kadar nişasta içeriği belirgin bir azalma göstermiştir. Sakaroz içeriği suda çözülebilir

kuru madde içinde en yüksek orana sahip olmuştur. Ocak ayına kadar İzlanda çeşidinde sakaroz oranında önemli azalma görülürken, Norveç çeşidinde bir azalma olmamıştır. Stolon ve köklerde sonbahar döneminde birikmiş olan nişasta kış için bir karbonhidrat rezervi olarak hizmet eder. Nişasta temel metabolik aktivite için enerji sağlar ve hidrolize olarak çözülebilir basit şekerlere dönüşür. Bunlar osmotik potansiyeli artırır ve hücrelerin donma derecelerini daha düşük seviyelere indirir (Dalmanndottir vd. 2001).

Değişik bölgelerde farklı meyve tür ve çeşitlerinde dinlenme döneminde karbonhidratların dokulardaki birikimi ve soğuğa dayanım arasındaki ilişkiler belirlenmiştir. Bu kapsamda, Burak (1989) Yalova Şartlarında şeftali çeşitlerinde, Bolat (1995) Iğdır şartlarında kayısı çeşitlerinde, Demirel (1997) Erzincan koşullarında kayısı çeşitlerinde, Pallonen (1999) ahududu çeşitlerinde, Ameglio et al. (2001) Fransa'da ceviz çeşitlerinde, Ercişli (2003) Doğu Anadolu Bölgesinden selekte edilen kuşburnu tiplerinin dokularındaki karbonhidratların dönemsel değişimi ile dona dayanım arasında önemli ilişkiler olduğunu belirlemiştir.

Membran Lipit Bileşiminde Değişimler

Yağ asitleri başlıca doymuş, tekli doymamış ve çoklu doymamış şeklinde sınıflandırılır. Bütirik, laurik, palmitik, stearik, mirisik, araşidik asit bazı önemli doymuş yağ asitlerine; linoleik, linolenik ve oleik asit ise sık rastlanan doymamış yağ asitlerindedir. Bunlar hücre lipitlerinin ana bileşiklerindedir. Membran lipitleri düşük sıcaklığa dayanımda rol oynayan önemli faktörlerden birisidir. Membranlardaki doymamış yağ asitleri miktarının sıcaklık azaldıkça artış gösterdiği, yapılan farklı çalışmalarda belirlenmiştir. Hücre membranlarındaki lipitlerin doymamışlık derecesi soğuk toleransına önemli derecede olumlu tesir etmektedir. Soğuğa dayanımları farklı buğday çeşitlerinde aklımasyon süreci öncesinde palmitik asit, linoleik asit ve linolenik asit fraksiyonları belirlenmiş, oleik asit ve stearik asit miktarı çok düşük bulunmuştur. Aklımasyon aşamasından sonra linolenik ve oleik oranlarında artış, linoleik ve palmitik asit oranlarında azalma belirlenmiştir. Soğuğa dayanıklı çeşitlerde, doymamış yağ asitlerindeki artış oranları daha yüksek bulunmuştur (Szalai vd. 2001). Hücre membran lipitlerinin fiziksel özellikleri yağ asitlerindeki çift bağların sayısına bağlıdır. Doymamış yağ asitleri, doymuş yağ asitlerinden sentezlenir ve bu işlemdesaturaz enzimleri rol oynamaktadır. Bu enzimler tek bağları çift bağlara dönüştürür. Yapılan çalışmalarda birçok organizmada yağ asidi desaturaz enziminden sorumlu genler belirlenmiştir. Her bir yağ asidinin doymamışlık derecesi, genetik ve çevresel olarak

düzenlenmektedir. Sıcaklık bunun düzenlenmesinde kritik çevresel faktörlerden biridir. Düşük sıcaklıklarda uyarılan yağ asidi desaturaz enzimleri yağ asitlerinin doymamışlık derecelerini artırmaktadır. Doymuş yağ asitleri, kimyasal yapılarında belirli miktar hidrojen atomu taşımaktadırlar. Eğer bir çift hidrojen atomu eksik ise, yağ asidi tekli doymamış olarak adlandırılır. Çoğu bitki yağlarında doymamış yağ asitleri yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Bitki tür ve çeşitlerinde bulunan yağ asitleri fraksiyonu ve oranları farklılık göstermektedir (Sakamoto ve Murata, 2002). Lipit fraksiyonlarındaki değişimin nasıl olduğunun belirlenmesi, bitkilerin streslere tepkisi, büyüme ve gelişmelerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilecektir (Welti vd. 2002).

Soğuk aklımasyonu sürecinde bitki membran lipit bileşimlerindeki kalitatif ve kantitatif değişimler, dona dayanımın artması ile ilişkilendirilmektedir (Uemura vd. 1995). Değişen sıcaklıklara membranların adapte olması için yağ asitlerinde çift bağ sayısı, pozisyonu veya yağ asitleri arasındaki zincir uzunluklarında değişimler meydana gelmektedir (Nilsen ve Orcutt, 1996). Soğuk aklımasyonu, hemen bütün membran lipit türlerinin oranında değişimlere neden olmaktadır. Bu durum doğada oluşan don lezyonlarıyla ilişkilendirilmektedir (Pearce, 1999; Smallwood ve Bowles, 2002). Düşük sıcaklık ve düşük su miktarı membranların jel fazına geçişini teşvik eder. Jel fazı membranların fonksiyonelliğinin azaldığı bir durumdur. Lipitlerdeki doymamışlık durumu faz değişiminin olduğu sıcaklık derecesini azalttığı için önemli olmaktadır. Bu nedenle membranların fiziksel özellikleri soğuk ve don zararının sebep olduğu zararlarda önemli olmaktadır. Düşük sıcaklığa adaptasyon sürecinde lipitlerdeki yüksek doymamışlık seviyesinin soğuğa dayanımın kazanılmasında etkili olduğu belirlenmiştir (Pearce, 1999). Bir bitkinin yağ asidi bileşiminde değişiklik yapma özelliği, sıvı-kristal formda bulunan hücre membran lipitlerinin yapısının korunması açısından avantaj sağlayabilmektedir. Plasma membranları bitki hücrelerinde don zararının ana bölgelerinden biri olduğu için, bu membranlardaki lipitlerin yapısındaki değişimler özel olarak incelenmektedir (Uemura vd. 1995). Dutun kabuk dokularındaki plasma membranlarındaki fosfolipitlerin, sonbahar ve kış döneminde soğuğa aklımasyon sürecinde artış gösterdiği belirlenmiştir (Yoshida, 1984). Norveç ve İzlanda kökenli yonca çeşitlerinde yapılan çalışmada, toplam doymamış yağ asidi miktarı soğuğa daha dayanıklı Norveç çeşidinde daha yüksek bulunmuştur (Dalmannsdottir vd. 2001). Kışlık çavdarda yaprak hücrelerinde plasma membranlarındaki fosfolipitler arasındaki PC (phosphatidylcholine) ve PE (phosphatidylethanolamine)'nin doymamış

türevlerindeki artışın bir sonucu olduğu belirlenmiştir. Benzer değişimler soğuk aklımasyonu süresince *Arabidopsis thaliana*'nın plasma membranlarında gözlemlenmiştir. Bu değişimler dona dayanımda önemli olan membran akışkanlığında etkili olmaktadır (Uemura vd. 1995). Bermuda çimenlerinde yapılan çalışmada 8/4 °C gündüz/gece aklımasyon uygulamasını kademeli olarak donma derecelerine düşürülen bitkilerde yaprak ve kök dokularından sürekli örnek alınmıştır. Bu süreçte doymamış yağ asitleri içeriğinin doymuş yağ asitlerine göre 4 kat daha fazla bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Çalışma sonucunda bazı desaturaz enzimlerinin (oleik asit desaturaz, linoleik asit desaturaz gibi) düşük sıcaklıkta faaliyet göstermesi sonucu yağ asitleri bileşimine etki ederek don zararının kontrol edilmesinde önemli olduğu saptanmıştır (Samala vd. 1998). Yağ asidi desaturaz enzimleri, fosfolipitlerin yağ asidi zincirlerine çift bağ yerleştirmeden sorumludurlar. Bunları kodlayan genlerin düşük sıcaklıklar tarafından uyarıldığı belirtilmektedir (Dalmannsdottir vd. 2001).

Protein Miktarında Değişimler

Bitkilerin dona dayanıklılık fizyolojisinde aminoasitlerin ve proteinlerin de rolü bulunmaktadır. Genellikle bitkilerin düşük sıcaklığa maruz kalması sırasında bünyelerindeki çözünebilir protein miktarının oransal olarak arttığı, dona dayanıklı tür ve çeşitlerde bu oranın daha yüksek, dayanıksız çeşitlerde ise daha düşük olduğu ifade edilmektedir (Ertürk ve Güler, 2007).

Soğuk aklımasyonu süresince biriken özel proteinlerden bazıları antifiriz protein özelliği göstermektedir (Pearce, 2001). Antifiriz proteinler (AFPs) buz kristalinin şekli ve oluşumunu değiştirme özelliğine sahiptir ve buzun yeniden kristalizasyonunu engeller. Bunun sonucunda don zararından hücrelerin korunmasına katkı sağlarlar. Arpa, buğday, çavdar ve kışlık kanolada soğuk aklımasyonu süresince AFP birikimi olduğu gözlemlenmiştir (Scebba vd. 1998; Baek vd. 2000). Deterjan gibi özelliğe sahip olan bu proteinler, suyu çekmeyen ve makromoleküllerin bir araya gelmesini önleyici bir özelliğe sahiptir (Pearce, 1999; Smallwood ve Bowles, 2002).

Soğuk aklımasyonu ile değişen gen ekspresyonunun ilişkili olduğu, yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Birçok çalışma düşük sıcaklığa tepki olarak yeni polipeptitlerin sentezlendiğini göstermiştir. Son yıllarda dona dayanım ile proteinler arasında bağlantı olduğuna dair çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Araştırmalarda bu polipeptitlerin soğuk aklımasyonu başlangıcının dona dayanımla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Dona dayanımdaki rolleri, dona dayanım sürecinin başlangıcında artış göstermeleri ve deaklımasyon sürecinde ise ortadan

kaybolmaları ile açıklanmaktadır (Guy vd. 1992). Düşük sıcaklıkta proteinlerin çoğu ve mRNA sentezlenmeye devam etmektedir. Bu durum soğuk aklımasyon sürecinde azalma göstermesine rağmen, temel hücre metabolizmasının sürdürülmesi ihtiyacı ile tutarlılık göstermektedir (Howarth ve Ougham, 1993).

Soğuk uyarımlı proteinlerin çoğunun sentezi, ABA'ya karşı tepki olarak değerlendirilmektedir (Tseng ve Li, 1990). Apoplastta çözünebilir proteinlerin birikimi, soğuk aklımasyonu süresince kışlık çavdarda belirlenmiştir. Aklım edilen kışlık çavdar yapraklarından ekstrakte edilen böyle proteinler, buzun yüzeyinde adsorbe edilerek buz kristalinin normal gelişimini değiştirebilmektedir. Antifiriz proteinler (AFPs) olarak adlandırılan bu apoplastik proteinler, buz oluşumunun tolere edilmesinde önemli bir mekanizmaya sahip olduğu kışlık çavdarda yapılan çalışmada belirlenmiştir (Jia vd. 1996).

Enzim Aktivitesindeki Değişimler

Sıcaklık değişimleriyle birlikte, bitki dokularındaki enzimatik aktiviteler de farklılıklar meydana gelmektedir. Bitkinin bu şartlara adaptasyonu, kalitatif ve kantitatif metabolik değişimlerin meydana gelmesine bağlıdır. Enzim profili ve aktivitelerindeki değişimler, çeşitli substrat ve etkenlerle enzim fonksiyonunun düzenlenmesi sıcaklık stresine adaptasyonda muhtemel olan olaylardır (Burke, 1995). Bu süreçte pek çok enzim aktivitesinde değişimin olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Bu enzimlerin çoğu için artan enzim aktivitesi artan gen ekspresyonu ile ilişkilendirilmektedir. Crespi et al. (1991) buğdayda sakaroz birikimi ve sakaroz sintaz aktivitesindeki artışın, hem sakaroz sintaz alt birimi, hem de sorumlu mRNA miktarındaki artışla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Guy et al. (1992) ıspanakta 5°C'de sakaroz sintaz aktivitesindeki artışın soğuk uygulanan dokulardaki sakaroz içeriğindeki artışla uyumlu olduğunu belirlemiştir. Bu enzimlerin birikimi düşük sıcaklıklara tepki ve/veya adaptasyonunun sonucu olmakta fakat, dona dayanım için gerekli olmamaktadır.

Antioksidant Sistemdeki Değişim

Yaprağını döken meyve türleri, kış döneminde oluşan çeşitli biyotik ve abiyotik stres şartlarında (donma, kuruma, patojen enfeksiyonu v.s) canlı kalabilmektedir. Bu süreçte askorbat peroksidaz, katalaz, glutathion reductaz, süperoksit dismutaz, polifenol oksidaz gibi antioksidant enzimler hücreler arasında etkili olarak bu streslerin tolere edilmesine yardımcı oldukları, çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (Tao vd. 1998; Baek vd. 2000; Porcel vd. 2003). Üşüme ve soğuk aklımasyonu süresince (0 °C ile 15

°C arası) H₂O₂ birikebilir. Birçok stres oluşturan biyotik ve abiyotik stres faktörleri, kloroplastlarda moleküler oksijenin indirgenmesi veya aktivasyonuna neden olan düşük sıcaklık stresinde de oksijen radikallerinin bitki zararlanmasında rol oynadığı belirtilmiştir. Bu zararlı radikallerin stres şartlarında oluşma potansiyelinin soğuğa hassas bitkilerde daha fazla olduğu belirtilmektedir (Hausladen ve Alscher, 1994b; Tao vd. 1998). Bitkilerde mitokondri, kloroplastlar, membranlarda çeşitli elektron taşıma zincir unsurlarının oto-oksidasyonu süperoksitin (O₂⁻) oluşumuna neden olmaktadır (Smirnov, 1995b). Hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikali (OH⁻) gibi diğer aktif oksijen türevleri birbirini takip eden indirgenme reaksiyonuyla O₂⁻'den oluşmaktadır (Foyer, 1993; Del Rio vd. 1996).

Bitki hücreleri oksidatif zarar seviyesini minimize eden, koruyucu ve tamir sistemine sahiptir. Genel olarak antioksidantlar iki grupta incelenir. Birinci grup antioksidantlar, aktif oksijen türevleriyle reaksiyona girmekte ve bu şekilde bu zararlı radikallerin seviyesini zarar eşliğinin altına çekmektedirler. Bu gruptakiler süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Askorbat Peroksidaz (APx), Ascorbate ve α-tokoferol'dür. İkinci grup olanlar, oksitlenme özelliğini düşüren antioksidantlardır. Bunlar Glutathion (GSH), Glutathione Reductaz (GR), Monodehydro ascorbate Reductaz (MDHAR) ve Dehydroascorbate Reductase (DHAR)'dır (Smirnov, 1993). Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksidi (O₂⁻) H₂O₂'ye dönüştürmektedir. Bu şekilde süperoksit daha düşük bir konsantrasyona indirgenmiş olur. Catalaz H₂O₂'yi parçalamaktadır. Ancak Katalaz aktivitesi üşüme sıcaklıklarında ve herbisit uygulamaları gibi stres şartlarında azalmaktadır (Smirnov, 1995b). Askorbat Peroksidaz (APx), kloroplast ve cytosol'de bulunmakta ve oksidant olarak H₂O₂'yi kullanmaktadır (Asada, 1992). Ascorbate aktif oksijenin zarar seviyesini düşürmede önemli bir göreve sahiptir. Süperoksit doğrudan hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerini azaltabilmektedir (Foyer, 1993). α-tokoferol başlıca kloroplast membranlarında bulunan yeşil fotosentetik dokularda bulunmakta ve moleküler oksijenin etkisini giderici etkiye sahiptir. Ayrıca, lipid peroksidasyonunu gidermede önemli bir role sahiptir (Smirnov, 1995b). Bezelye yapraklarında Glutathion Reductaz (GR) aktivitesi kloroplastlarda % 70-77, mitokondride %3, cytosol'de % 20-27 olarak belirlenmiştir (Veerson vd. 1990).

Elma kallus kültüründe soğuk aklımasyonu süresince Askorbat Peroksidaz (APx) ve Peroksidaz (POD) aktiviteleri artmaya başlamış ve aklımasyonun 10. gününde maksimum seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Soğuk muamalesi GR ve DHAR aktivitelerinde kademeli artışa neden olmuştur. Başka

türlerde de GR aktivitesi için benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bitki köklerindeki antioksidant sistemlerinin değişimi, henüz tam ortaya konulamamıştır (Kuroda vd. 1990, Zhao, 1998). Donma sıcaklıklarında yüksek GR aktivitesi bazı bitki türlerinde saptanmıştır. Bu durumun üşüme toleransına katkı sağladığı düşünülmektedir (Scebba vd. 1998; Pearce, 1999; Baek vd. 2000; Kocsy vd. 2001; Baek ve Skinner, 2006;). Bitki bünyesinde SOD tarafından oksijen radikallerinin H₂O₂'ya dönüştürülmesi sonucu, bu maddenin dayanım mekanizması ile ilgili genlerin uyarılmasında bir sinyal molekülü olarak görev aldığı tespit edilmiştir (Tao vd. 1998; Baek vd. 2000; Baek ve Skinner, 2006). Bitkiler lignin, süberin içeren hücre duvarı bileşenlerinin polimerizasyonunda görev aldıkları düşünülen hücreler arası peroksidaz izoformları içermektedir. Bu peroksidazlar aşırı hassas reaksiyonlar süresince hücre duvarı lignifikasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Bu nedenle, hücre duvarlarının hücreleri don zararından korumada önemli rol aldıkları kabul edilir (Baek vd. 2000). Soğuğa dayanıklı bitkilerde daha fazla fenil propanoid, tanen, lignin ve süberin birikimi olduğu saptanmıştır (Teklemariam ve Blake, 2004).

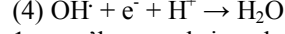
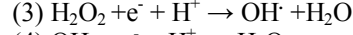
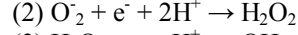
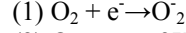
Kavakta (*Populus suaveolens*) Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6PD) enzim aktivitesinin sonbahar döneminde arttığı ve ilkbahara doğru bir azalma gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca dallarda bu enzimin inaktive edilmesinin zararlanmayı tetiklediği belirlenmiştir. G-6PD enzim aktivitesinin iklimasyon uygulaması ile artış gösterdiği yonca, karaçayır, soya fasulyesi, muz bitkilerinde belirlenmiştir (Shanzhi vd. 2002).

Dona hassasiyetleri farklı olan şeftali çeşitlerinde polifenol oksidaz, katalaz ve peroksidaz antioksidant enzimlerinin dayanım üzerine etkilerinin saptanması için bir çalışma yürütülmüştür. Kış süresince çiçek tomurcuklarında PFO ve CAT, yaprak tomurcuklarında ise POD enzim aktiviteleri daha büyük değişim göstermişlerdir. Bu enzimlerin aktiviteleri tüm çeşitlerin kışı geçiren organlarında artış göstermiştir. İlkbaharın başlangıcıyla birlikte azalma seyrine geçişlerdir. Çalışmada POD aktivitesi kış başlangıcında maksimum seviyeye ulaştıktan sonra azalmış, şubat ayında bir miktar artış göstermiştir. Bu durumun ılıman Ocak ayını takiben soğuk bir Şubat ayı periyodunun olmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Szalay vd. 2005).

Soğuk stresi sürecinde toksik seviyede H₂O₂ birikimini engellemek için GR aktivitesindeki artış, dayanımın devamı açısından önemlidir. Dışardan sistein uygulandığı zaman GR aktivitesini artırdığı için dayanım artmaktadır (Kocsy vd. 2001).

Bitkide oksidatif strese neden olan aktif oksijen türlerinin elektron taşıma sistemleri, çeşitli indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları ile

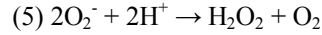
antioksidant özellikteki enzim ve maddelerle farklı türevlere dönüşmektedir (Smirnov, 1995b). Bunlar;



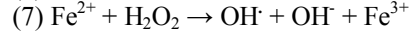
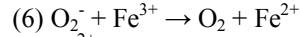
1 no'lu reaksiyonda moleküler oksijen süperokside indirgenir. Bu reaksiyon membran elektron taşıma zincirleri yoluyla olmaktadır (endogenik olarak gerçekleşir).

2, 3, 4'deki H₂O₂, OH⁻ ve H₂O oluşumuna neden olan indirgenmeler kimyasal reaksiyonlar yoluyla olmaktadır (ekzogenik olarak gerçekleşir).

Biyolojik sistemlerde süperoksitten aktif oksijen türlerinin oluşumu SOD ile O₂'nin H₂O₂'ye dönüştürülmesi ile başlamaktadır.



H₂O₂'nin indirgenmesi OH⁻ radikalleri oluşturmaktadır. Bu reaksiyonda iyonlar katalize edicidir.



Bitki Besin Elementlerinin Dona Dayanımında Etkileri

Donma/erime stresi sonucu hücrelerde iyon kaybı belirlenmiş ve bu durum membran geçirgenliğinin kaybolmasına neden olmuştur. Don zararları olan hücrelerden kaybolan ana katyon potasyumdur (K⁺). Hücre plazma membranı vasıtasıyla K⁺'un taşınımı H⁺-ATPaz aktivitesi ile olduğundan, donma/erime stresi süresince H⁺-ATPaz fonksiyonunda değişim olduğu belirtilmektedir. Çam yapraklarından saflaştırılan plazma membranlarında H⁺-ATPaz aktivitesi ölümcül donma/erime stresinden sonra kaybolduğu belirlenmiştir (Pukacki ve Pukacka, 1987). Donma/erime zararından sonra dokuların tekrar düzelebilmesi için kaybedilen iyonların (özellikle K⁺) tekrar hücrelere pompalanması gerekir (Iswari ve Palta, 1989). Yapılan çalışmalarda H⁺-ATPaz'ın bir inhibitörü olan Sodyum Vanadate uygulamasının don stresi sonucu dokuların tekrar düzelmesini engellediği belirlenmiştir (Arora ve Palta, 1991). Don stresi süresince plazma membranında bulunan H⁺-ATPaz'ı etkileyen moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılmasına rağmen, bu değişimlerin membrandaki proteinlerin denatürasyonundan veya lipit-protein interaksiyonlarındaki değişimlerden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Pukacki ve Pukacka, 1987).

Düşük sıcaklığa maruz kalma, dokuda Ca²⁺'da geçici bir artışa neden olmaktadır (Puhakainen, 2004). Bu süreçte apoplasttan sitoplazma sıvısına Ca akışı meydana gelmektedir. Plazma membranlarında bulunan Ca kanalları sıcaklık düşüşüne karşı sensör görevi yaparlar (Smallwood ve Bowles, 2002).

Düşük sıcaklığa maruz kalan bitkilerde hücre membran akışkanlığında bir azalma meydana gelir. Bu durum soğuk uyarımlı genlerin çalışması için bir sinyal özelliği taşıdığı yapılan çalışmalarda saptanmıştır. Hücrelerarası Ca artışının yoncada, düşük sıcaklığa tepki gösteren genlerin çalışmasını uyardırmada gerekli olduğu belirlenmiştir (Smallwood ve Bowles, 2002). Malatya'da Hacıhaliloğlu kayısı çeşidine ait ağaçlarda NPK gübrelemesinin dona dayanım üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, azotlu gübrelemenin kontrole göre dona dayanımı azalttığı, potasyumlu gübrelemenin ise azotlu ve fosforlu gübrelemeye göre don toleransında önemli artış sağladığı tespit edilmiştir (Muradoğlu, 1998). Yiğit ve Güleriyüz (1995) Kütahya vişnesinde potasyum sülfat gübrelemesinin soğuğa dayanım üzerindeki etkilerini incelediği çalışmada, potasyumun bitkilerdeki dayanıklılığı karbonhidrat metabolizmasını etkileyerek arttırdığı, uygun dozlarda uygulanan K⁺ gübrelerin bitki dokusunda şeker birikimini ve osmotik basıncı artırmak suretiyle donma noktasını daha düşük sıcaklıklara çektiğini belirlemiştir. Limon ve şeftalilerde değişik dönemlerde P, B, Mn ve Zn'nin değişik uygulamalarının sürgünlerde pişkinleşmeye katkı sağlayarak soğuğa dayanıklılığı arttırdığı belirlenmiştir (Burak, 1989).

Soğuğa Dayanımda Moleküler Çalışmalar

Farklı bitki tür ve çeşitlerinde soğuğa duyarlı genlerin izolasyonu, karakterizasyonu ve soğuk aklımasyonunun genetiğinin ortaya konulması için birçok çalışma yürütülmüştür. Soğuk uyarımlı proteinlerin sentezi mRNA'nın translasyonunda değişimlerle olmaktadır. Yapılan çalışmalarla mRNA profilindeki değişim ve artan dona dayanım arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. Günümüze kadar birçok bitkide pek çok uyarımlı gen soğuğa alıştırmalı ve alıştırmalı olmayan bitkilerden cDNA kütüphanelerinin incelenmesiyle elde edilmiştir. Bu cDNA klonlarının nükleotid sekansları belirlenmiştir. Fakat bu izole edilen genlerin çoğunun bilinmeyen fonksiyonlara sahip yeni polipeptitleri kodladığı belirlenmiştir (Neven vd. 1993).

Soğuk aklımasyonu kabiliyeti ve dayanımın genetik analizi bu kompleks sürecin doğasını göstermiştir. Çalışmaların çoğu buğday ve diğer hububat bitkilerinde yürütülmüştür. Buğday ve odunsu bitkilerde dona dayanımın kalıtımı, çok genle kontrol edilmektedir. Hem dominant hem de resesif genlerin kümülatif etkileri de belirlenmiştir. Buğdayda 5A ve 5D kromozomları dona dayanımda esas etki göstermelerine rağmen, 21 kromozomun 11'inin dona dayanımda etkili olduğu belirlenmiştir (Thomashow, 1990).

Kayın bitkisinde soğuk aklımasyonu ile ilgili yapılan çalışmada dona dayanımda etkiye sahip

olduğu belirlenen Bp1ti36, 36kD geninin, düşük sıcaklık yanında, kuraklık, tuz streslerine ve dıştan ABA uygulamasına tepki gösterdiği belirlenmiş ve bu genin Arabidopsise transplante edilmesi sonucunda bu özelliğin aktarıldığı tespit edilmiştir. Bitkide dona dayanım mekanizması ile ilgili genler, düşük sıcaklığa tepki gösterenler (LTRE), soğuk uyarımlı genler (COR), ABA-uyarımlı genler (ABRE) şeklinde ayrı ayrı incelenmektedirler (Puhakainen, 2004). ABA bitkilerde soğuk aklımasyonu süreciyle ilgilidir. ABA'nın düşük sıcaklığa maruz kalan otsu ve odunsu bitkilerde arttığı ve dıştan uygulanmasının üşüme ve don toleransında artış sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca bünyelerinde ABA içeriği düşük olan bazı mutant bitkilerin soğuk aklımasyonu sürecinde zarar gördükleri saptanmıştır (Smallwood ve Bowles, 2002; Puhakainen, 2004). Elmada in vitro şartlarda Mondial Gala elma çeşidinde soğuk uygulaması sonucu gen ekspresyonundaki değişimlerin incelendiği çalışmada, izole edilen MYB geninin katalaz enzim fonksiyonundan sorumlu olduğu ve aklımasyon şartlarında aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Siligato et al. 2004).

Sonuç olarak, bitkiler düşük sıcaklıklar sonucu oluşan üşüme ve don stresine tolerans sağlamak ve korunmak için farklı mekanizmalar geliştirmektedirler. Bu mekanizmaların biyofiziksel, biyokimyasal ve moleküler olarak daha detaylı araştırılması sonucu bitkilerin soğuğa dayanımı konusunda önemli sonuçlar elde edilebilecektir. Böylelikle dünya üzerinde bitkilerin yayılım sınırlarını belirleyen en önemli faktörlerden biri olan düşük sıcaklıklara daha dayanıklı bitki tür ve çeşitleri seçilebilecek ve bu konuda yapılacak ıslah çalışmalarına önemli katkılar sağlanabilecektir. Ayrıca düşük sıcaklık stres mekanizması için elde edilen bilimsel veriler, kuraklık stres mekanizmasının açıklanmasına da olumlu katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- Ameglio, T., Cochard, H., Lacoite, A., Sauter, J., Evers, F., Martignac, M., 2001. Adaptation to cold temperature and response to freezing in walnut tree. *Acta Hort.*, 544: 247-254.
- Arora, R., Palta, J.P., 1991. A loss in plasma membrane ATPase activity and its recovery coincides with incipient freeze-thaw injury and post-thaw recovery in onion bulb scale tissue. *Plant Physiol.*, 95:845-852.
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85: 235-241.
- Asiantaş, 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 fizyolojisi. Atatürk Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Ders Notu, Erzurum.
- 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. *J. of Biochemistry and Molecular Biology*, 33 (5): 385-390.
- 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.
- Bates, L.S., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant 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.
- Bertrve, A., Pobitaille, G., Castonguay, Y., Nadaeau, P., Boutin, R., 1997. Changes in ABA and gene expression in cold-acclimated sugar maple. *Tree Physiol.*, 17: 31-37.
- 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 Teberzeze). *Acta Hort.*, 384: 183-187.
- Burak, 1989. Marmara Bölgesi'nde yetiştirilen önemli bazı seftali çeşitlerinin dona dayanımları üzerinde araştırmalar. Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (Doktora Tez Projesi), Yalova.
- Burke, J.J., 1995. Enzym adaptation to temperature. IN - Environment and Plant Metabolism Flexibility and Acclimation. N. Smirnoff, ed. (BIOS Scientific Publisher Limited), pp. 63-78.
- Chen, H.H., Li, P.H., Brenner, M.L., 1983. Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. *Plant Physiol.*, 71: 362-365.
- 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.
- Dalmannsdottir, S., Helgadottir, A., Gudliefsson, 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.
- 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.
- Dimler, R.J., Shaeter, N.C., Crist, J., 1952. Quantitative paper chromatography of D-Glucose and its oligosaccharides. *Anal. Chem.*, 24: 1411-1414.
- 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.
- Ertürk, Y., Güleriyüz, M., 2007. Erzincan koşullarında bazı yerli ve yabancı kayısı çeşitlerinin düşük sıcaklıklara dayanım derecelerinin belirlenmesi. *Tarım Bilimleri Derg.*, 13(2): 128-136.
- Flurkey, W.H., 1986. Polyphenoloxidase in higher plants: immunological detection and analysis of in vitro translation products. *Plant Physiol.*, 81(2): 614-618.
- 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.
- Grene, R., 2002. Oxidative stress and acclimation mechanism in plants. *American Society of Plant Biologists, The Arabidopsis Book*, doi: 10.1119/tab.0036.1.
- 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.
- Hausladen, A., Alscher, R.G., 1994a. Purification and characterization of glutathione reductase isozymes specific for the state of cold hardiness of Red Spruce. *Plant Physiol.*, 105: 205-213.
- Hausladen, A., Alscher, R.G., 1994b. Cold hardiness-specific glutathione reductase isozymes in Red Spruce. *Plant Physiol.*, 105: 215-223.
- Havir, E.A., McHale, N.A., 1987. Regulation of Catalase Activity in Leaves of *Nicotiana sylvestris* by High CO₂. *Plant Physiol.*, 89(3): 952-957.
- Howarth, C.J., Ougham, H.J., 1993. Gene expression under temperature stress. *New Phytol.*, 125: 1-26.
- Iswari, S., Palta, J.P., 1989. Plasma membrane ATPase as a site of functional alteration during cold acclimation and freezing injury. IN *Low Temperature Stress Physiology in Crops*. PH. Li, ed. (Boca Raton: CRC press), pp. 123-137.
- Jia, Z., Deluca, C.L., Chao, H., Davies, P.L., 1996. Structural basis for binding of a globular antifreeze protein to ice. *Nature*, 384: 285-288.
- Kacar, B., 1972. Bitki ve Toprağın Kimyasal Analizleri II. Bitki Analizleri, Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları: 453, Ankara, s596.
- 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 Fakültesi, 2. Baskı, Kütahya.
- Kuroda, H., Sagisaka, S., Asada, M., Chiba, K., 1990. Peroxide-scavenging systems during cold acclimation of apple callus culture. *Plant Cell Physiol.*, 32: 635-641.
- Küden, A.B., Küden, A., Paydaş, S., Kaşka N., İmrak B., 1998. Bazı ılıman iklim meyve tür ve çeşitlerinin soğuğa dayanıklılığı üzerinde çalışmalar. *Tr. J. 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 Chilling, freezing, and high temperature stresses (New York London Toronto: academic Press).
- Muradoğlu, F., 1998. Bazı kayısı çeşitlerinin dona dayanıklılık durumlarının saptanması ve kayısılarda dona tolerans ile bitki besin elementleri arasındaki ilişkinin incelenmesi üzerine bir araştırma, Y.Y.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Van.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 22, 867-880.
- Neven, L.G., Haskell, D.W., Hofig, A., Li, Q.B., Guy, C.L., 1993. Characterization of a spinach gene responsive to low temperature and water stress. *Plant Mol. Biol.*, 21: 291-305.
- Nilsen, E.T., Orcutt, D.M., 1996. Physiology of Plants Under Stress (New York Toronto: John Wiley and Sons, Inc.).
- Orr, W., Keller, W.A., Singh, J., 1986. Induction of freezing tolerance in an embryogenic cell suspension culture of *Brassica napus* by abscisic acid at room temperature. *J. Plant Physiol.*, 126: 23-32.
- 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 frost-stressed 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., Pukacka, S., 1987. Freezing stress and membrane injury of Norway spruce (*Picea abies*) tissue. *Physiol. Plant.*, 69: 156- 160.
- 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.
- Regnell, J.C., 1973. Analytical methods in quality control of processed fruit and vegetables. Technical Report no. 11. From the quality control centre, Olive Culture Reserach Institute. Bornova, İzmir.
- Sakai, A., Larcher, W., 1987. Frost Survival in Plants: Responses and Adaptations to Freezing Stress (New York, USA: Springer-Verlag).
- Sakamoto, T., Murata, N., 2002. Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 206-210.
- 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.
- Smala, S., Yan, J., Baird, V., 1998. Changes in polar fatty acid composition during cold acclimation in 'Midiron' and 'U3' Bermudagrass. *Crop Sci.*, 38: 188-195.
- 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. *Physiologia Plantarum*, 108: 270-278.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Smallwood, M., Bowles, D.J., 2002. Plants in a cold climate. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 357: 831-847.
- Smirnov, N., 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.*, 125:27-58.
- Smirnov, N., 1995a. Metabolic flexibility in relation to the environment. In *Environment and Plant Metabolism Flexibility and Acclimation*. N. Smirnov, ed. (BIOS Scientific Publisher Limited), pp. 1-16.
- Smirnov, N., 1995b. Antioxidant systems and plant response to environment. In *Environment and Plant Metabolism Flexibility and Acclimation*. N. Smirnov, ed. (BIOS Scientific Publisher Limited), pp. 217-243.
- Steponkus, P.L., 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35: 543-586.
- 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 Szegediensis*, 49 (1-2): 121-122.
- Tao, D.L., Öquist, G., Wingsle, G., 1998. active oxygen scavengers during cold acclimation of Scots Pine seedlings in relation to freezing tolerance. *Cryobiology*, 37: 38-45.
- 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.
- Thomashow, M.F., 1990. Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. *Adv. Genet.* 28: 99-131.
- Thompson, G.A., 1989. Molecular changes in membrane lipids during cold stress. In *Environmental Stress in Plants*. J. H. Cherry, ed. (Berlin: Springer Verlag).
- Tseng, M.J., Li, P.H., 1990. Alterations of gene expression in potato (*Solanum commersonii*) during cold acclimation. *Physiol. Plant.*, 78: 538-547.
- Uemura, M., Joseph, R.A., Steponkus, P.L., 1995. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiol.*, 109: 15-30.
- 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.
- Walti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesada, H., Zhou, H., Rajashekar, C.B., Williams, T.D., Wang, X., 2002. Profiling membrane lipids in plant stress responses. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (35): 31994-32002.
- Wisniewski, M., Basett, C., 2003. An overview of cold hardiness in woody plants: Seeing the forest through the trees. *Hortscience*, 38 (5).
- Veerson, J.V., Hess, J.L., Chevone, B.I., 1990. Purification, characterization, and immunological properties for two isoforms of glutathione reductase from eastern white pine needles. *Plant Physiol.*, 94: 1402-1409.
- Yiğit, D., Güleriyüz, M., 1995. Farklı doz ve derinliklerde uygulanan potasyum sulfat gübresinin Kütahya vişne çeşidinin soğuğa dayanımına etkisi üzerinde bir araştırma. II. Bahçe Bitkileri Kongresi I, 253-258.
- Yoshida, S., 1984. Chemical and Biophysical changes in the plasma membrane during cold acclimation of mulberry bark cells (*Morus bombycis* Koidz. cv goroji). *Plant Physiol.*, 76: 257-265.
- 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.