



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GEMLİK ZEYTİN ÇEŞİDİ'NİN DÜŞÜK SICAKLIK KOŞULLARINDA  
FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER AÇIDAN  
KARAKTERİZASYONU**

**Asuman CANSEV**

**DOKTORA TEZİ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**BURSA-2008**



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GEMLİK ZEYTİN ÇEŞİDİ'NİN DÜŞÜK SICAKLIK KOŞULLARINDA  
FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER AÇIDAN  
KARAKTERİZASYONU**

**Asuman CANSEV**

**Prof.Dr. Atilla ERİŞ**  
**(Danışman)**

**DOKTORA TEZİ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**BURSA-2008**

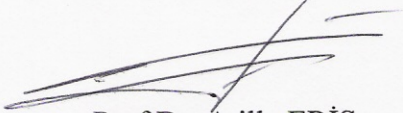
T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

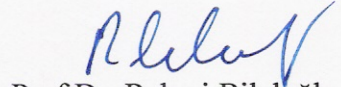
GEMLİK ZEYTİN ÇEŞİDİ'NİN DÜŞÜK SICAKLIK KOŞULLARINDA  
FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER AÇIDAN  
KARAKTERİZASYONU

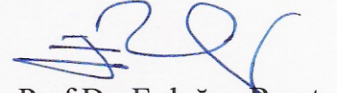
Asuman CANSEV

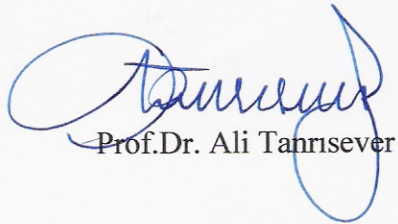
DOKTORA TEZİ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

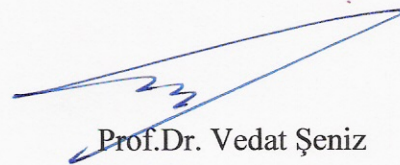
Bu Tez 31/10/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Atilla ERİŞ  
Danışman

  
Prof. Dr. Rahmi Bilaloğlu

  
Prof. Dr. Erdoğan Barut

  
Prof. Dr. Ali Tanrısever

  
Prof. Dr. Vedat Şeniz

## ÖZET

### **Gemlik Zeytin Çeşidi'nin Düşük Sıcaklık Koşullarında Fizyolojik Ve Moleküler Açından Karakterizasyonu**

Zeytin bitkisinde (*Olea europaea* L.) düşük sıcaklıklara dayanım mekanizmasının incelenmesini hedefleyen bu araştırmada, "Gemlik" zeytin çeşidi'ne ait bir yıllık sürgünlerde iki yıl süresince aylık periyotlar halinde yapay düşük sıcaklık testleri (4°C, -5°C, -10°C ve -20°C) uygulanmıştır. Düşük sıcaklık uygulamalarını takiben iyon sızıntısı yöntemi ile yaprak ve kabuk dokularının hücre membranının zararlanma seviyesi belirlenerek her iki dokunun mevsimlere göre düşük sıcaklık toleransları (LT<sub>50</sub>) tespit edilmiştir. Ayrıca mevsimlere ve düşük sıcaklıklara göre yaprak ve kabuk dokularında oluşan fizyolojik ve moleküler biyolojik değişimlerin belirlenebilmesi amacıyla karbonhidrat metabolizmasıyla ilgili olarak toplam çözünebilir şeker (TÇŞ), glukoz (Gİ) ve sukroz (Sİ) içerikleri; antioksidatif savunma mekanizması ile ilgili katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APRX) enzim aktiviteleri saptanmıştır. Öte yandan, zeytinde soğuğa dayanıklılıkta protein metabolizmasının açıklanması ve bu konuda kullanılabilir bir protein belirtecinin araştırılması amacıyla tüm uygulamalarda toplam çözünebilir protein (TÇP) değişimleri ölçülerek SDS-PAGE tekniği ile TÇP profilleri çıkarılmış, ardından yaprak ve kabuk dokularında western-blot tekniği ile Temmuz ve Ocak ayı örneklerinde dehidrin grubu proteinlerin düzey değişimleri belirlenmiştir.

Buna göre, yaprak ve kabuk dokuları tüm aylar itibariyle 4°C ve -5°C uygulamalarında düşük oranda zararlanma göstermiştir. Ancak, mevsimlere bağlı olarak -10°C'den itibaren %50 zararlanma oranının üzerinde değerler tespit edilmiştir. Aylar itibariyle, -10°C ve -20°C uygulamalarında yaprak ve kabuk dokularında en düşük zararlanma oranları kış aylarında; en yüksek zararlanma oranları ise, yaz aylarında belirlenmiştir. LT<sub>50</sub> değerleri de benzer olarak, hava sıcaklıklarının düşmeye başladığı sonbaharda artış göstererek kış ortasında en yüksek noktaya ulaşmış, takiben hava sıcaklıklarının tekrar yükselmeye başladığı bahar aylarından itibaren dereceli olarak azalarak yaz ortasında en düşük seviyeye ulaşmıştır.

Genel olarak zeytinde sonbahar ve kış adaptasyonu sırasında yaprak ve kabuk dokularında TÇŞ, Gİ ve Sİ artış göstermiştir. Düşük sıcaklık uygulamalarına göre ise, genel olarak, her iki dokuda da -10°C ve -20°C uygulamalarında TÇŞ, Gİ ve Sİ artmıştır. Bununla birlikte, gerek mevsimsel olarak, gerekse düşük sıcaklık uygulamalarına göre en keskin artış ve azalışlar Sİ'inde gerçekleşmiştir. LT<sub>50</sub>'nin en düşük olduğu yaz aylarında Sİ'nin çok düşük düzeylerde oluşu ve LT<sub>50</sub>'nin en yüksek olduğu kış aylarında ise Sİ'inde yüksek oluşu zeytinde dona dayanımda sukrozun önemini ortaya çıkarmıştır.

Çalışmada genel olarak, CAT ve APRX enzim aktivitelerinin, sonbahar ve kış aylarında yaz aylarına göre daha yüksek seviyelerde olduğu belirlenmiştir. Öte yandan, araştırmada  $LT_{50}$ 'nin artmaya başladığı sonbahar aylarında CAT ve APRX enzim aktiviteleri artış gösterirken,  $LT_{50}$ 'nin en yüksek olduğu kış aylarında sonbahara göre aktivitede bir miktar azalış gerçekleşmiştir. Bununla birlikte, CAT aktivitesi düşük sıcaklık uygulamaları ile beraber azalmış, oysa APRX aktivitesi  $-5^{\circ}\text{C}$  uygulamasına kadar değişmemiş,  $-10^{\circ}\text{C}$ 'den itibaren ise, aylara bağlı olarak düşüş göstermiştir. Buna göre, zeytinde APRX'in CAT enzimine göre soğuğa dayanımda daha etkili olabileceği düşünülmüştür.

Deneme süresince TÇP sonbahar sonu kış mevsiminde  $LT_{50}$ 'nin artışına paralel şekilde artış göstermiştir. Öte yandan, bahar aylarında özellikle Mart ayında hem yaprak hem de kabuk dokularında TÇP içeriği hızla düşmüştür. TÇP içeriği açısından her iki dokuda da uygulama sıcaklıkları düşüğe aylar arasındaki farklılık daha belirgin hale gelmiştir. Özellikle  $-10^{\circ}\text{C}$ 'den itibaren yaz aylarındaki TÇP içeriği çok azalırken, kış aylarında protein birikiminin çok daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Bununla birlikte, çalışmanın diğer bir amacını oluşturan düşük sıcaklıklarda değişen protein belirteçlerinin araştırılması esnasında immunoblot çalışmaları sonucunda yapraklarda 43 ve 16 kDa, kabuklarda ise 43, 30, 23 ve 16 kDa dehidrin proteinlerinin düşük sıcaklıklara dayanımla ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, zeytin bitkisinin günlük hava sıcaklıklarının kademeli olarak azalması ile birlikte karbonhidrat, protein ve antioksidant enzim metabolizmalarını içeren kompleks mekanizmalar sayesinde hücre membran dayanıklılığını arttırarak düşük sıcaklıklara önemli derecede dayanım kazandığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Zeytin bitkisi (*Olea europaea* L.), düşük sıcaklık stresi, çözünebilir karbonhidratlar, antioksidant enzimler, çözünebilir proteinler, dehidrin.

## ABSTRACT

### **Physiologic and Molecular Characterization of the Olive cv. Gemlik Under Low Temperature Conditions**

In this study, one-year shoots of the olive (*Olea europaea* L.) plant cv. Gemlik were subjected to artificial low temperature tests (4°C, -5°C, -10°C ve -20°C) for two years with monthly periods. Low temperature tolerances (LT<sub>50</sub>) of leaf and bark tissues were determined by measuring the level of cell membrane injury using ion leakage method following low temperature. In order to determine physiologic and molecular biologic changes in leaf and bark tissues due to seasons and low temperature treatments, levels of carbohydrate metabolism elements such as total soluble sugar (TSS), glucose content (GC) and sucrose content (SC); and enzyme activities of antioxidative defence mechanisms such as catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APRX) were measured. In addition, to investigate protein metabolism and identify a protein marker in cold hardiness of olive, total soluble protein (TSP) profiles of all tissues were determined using SDS-PAGE method and levels of dehydrin proteins were analyzed in leaf and bark tissues from January and July using Western Blot method.

Leaf and bark tissues subjected to 4°C and -5°C treatments in all months were injured to a limited extent. However, more than 50% injury was determined by equal to or colder than -10°C treatments depending on the season. Following -10°C and -20°C treatments, the lowest and the highest injury in leaf and bark tissues were detected in winter and in summer, respectively. Similarly, LT<sub>50</sub> values started increasing with decreasing temperatures during fall and peaked in the middle of winter while they started decreasing gradually with increasing temperatures during spring and were the lowest in mid summer.

TSS, GC and SC increased in leaf and bark tissues of olive during adaptation to fall and winter. TSS, GC and SC generally increased in both tissues after -10°C and -20°C treatments. In addition, the sharpest increases and decreases were observed in SC both seasonally and with low temperature treatments. Evidence that SC is involved in cold hardiness of olive comes from the data demonstrating low SC during summer when LT<sub>50</sub> is similarly low and high SC during winter when LT<sub>50</sub> is similarly high.

That CAT and APRX enzyme activities are generally higher during fall and winter compared with those in summer was determined in this study. On the other hand, CAT and APRX enzyme activities started increasing during fall along with increasing LT<sub>50</sub> While CAT and APRX enzyme activities decreased to some extent during winter when LT<sub>50</sub> peaked. In addition, while CAT activity decreased with low temperature treatments, APRX activity did not change until -5°C treatment but decreased with

decreasing temperatures starting from  $-10^{\circ}\text{C}$  depending on the month the tissue was obtained. Thus, APRX may be more effective in cold hardiness of olive compared with CAT.

TSP increased during fall and winter in parallel with increases in  $\text{LT}_{50}$ . On the other hand, TSP decreased both in leaf and bark tissues during spring, particularly in March. Differences between months in terms of TSP became more significant with decreasing treatment temperatures in both tissues. TSP in tissues obtained during summer was very low starting at  $-10^{\circ}\text{C}$  treatment temperature, while TSP was much higher in tissues collected during winter.

Additionally, immunoblot studies for investigating protein markers for cold acclimation revealed that dehydrin proteins of 43 and 16 kDa in leaves and 43, 30, 23, and 16 kDa in barks were associated with cold hardiness of olive.

In conclusion, it was determined that olive plant shows considerable tolerance against low temperatures that are achieved after daily gradual decreases by increasing cell membrane stability through complicated mechanisms including carbohydrate, protein and antioxidative enzyme metabolisms.

**Key Words:** olive plant (*Olea europaea* L.), low temperature stress, soluble carbohydrates, antioxidative enzymes, soluble proteins, dehydrin

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	III
İÇİNDEKİLER.....	V
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
SİMGELER DİZİNİ.....	XIII
GİRİŞ.....	1
1. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	6
1.1. Düşük Sıcaklıklara Dayanım.....	6
1.1.1. Düşük sıcaklıklara dayanımın belirlenmesi.....	10
1.2. Düşük Sıcaklığa Dayanım İle Bazı İçsel Faktörler Arasındaki İlişki.....	14
1.2.1. Çözünebilir şekerler.....	15
1.2.2. Çözünebilir proteinler.....	21
1.2.2.1. Dehidrinler.....	24
1.2.3. Antioksidant savunma mekanizması.....	31
1.2.3.1. Antioksidant enzimler.....	32
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	37
2.1. Materyal.....	37
2.2. Yöntem.....	39
2.2.1. Bitkisel materyalin alınması.....	39
2.2.2. Düşük sıcaklık (don) testleri.....	39
2.2.3. Fizyolojik ve moleküler biyolojik analizler.....	41
2.2.3.1. Hücresel membran zararının belirlenmesi.....	41
2.2.3.2. Düşük sıcaklık toleransının (LT <sub>50</sub> ) belirlenmesi.....	42
2.2.3.3. Çözünebilir şekerlerin analizleri.....	42
2.2.3.3.1. Çözünebilir şekerlerin ekstraksiyonu.....	42
2.2.3.3.2. Toplam çözünebilir şeker miktarının belirlenmesi	43
2.2.3.3.3. Glukoz miktarının belirlenmesi.....	44



2.2.3.3.4. Sukroz miktarının belirlenmesi.....	45
2.2.3.4. Askorbat peroksidaz enzim analizi.....	46
2.2.3.5. Katalaz enzim analizi.....	50
2.2.3.6. Toplam çözünebilir protein analizi.....	53
2.2.3.7. Western blot analizi.....	59
2.2.4. İstatistiksel analizler.....	62
3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI.....	63
3.1. Hüresel Membran Zararının Belirlenmesi.....	63
3.1.1. Yapraklarda hüresel membran Zararının belirlenmesi.....	63
3.1.2. Kabuklarda hüresel membran zararının belirlenmesi.....	65
3.2. Düşük Sıcaklık Toleransı (LT <sub>50</sub> ).....	69
3.2.1. Yapraklarda düşük sıcaklık toleransı (LT <sub>50</sub> ).....	69
3.2.2. Kabuklarda düşük sıcaklık toleransı (LT <sub>50</sub> ).....	71
3.3. Çözünebilir Şeker Analizleri.....	72
3.3.1. Toplam çözünebilir şeker içeriği.....	72
3.3.1.1. Yapraklarda toplam çözünebilir şeker içeriği.....	72
3.3.1.2. Kabuklarda toplam çözünebilir şeker içeriği.....	75
3.3.2. Glukoz içeriği.....	79
3.3.2.1. Yapraklarda glukoz içeriği.....	79
3.3.2.2. Kabuklarda glukoz içeriği.....	83
3.3.3. Sukroz içeriği.....	87
3.3.3.1. Yapraklarda sukroz içeriği.....	87
3.3.3.2. Kabuklarda sukroz içeriği.....	91
3.4. Katalaz Enzim Aktivitesi.....	94
3.4.1. Yapraklarda katalaz enzim aktivitesi.....	94
3.4.2. Kabuklarda katalaz enzim aktivitesi.....	99
3.5. Askorbat Peroksidaz Enzim Aktivitesi.....	102
3.5.1. Yapraklarda askorbat peroksidaz enzim aktivitesi.....	102
3.5.2. Kabuklarda askorbat peroksidaz enzim aktivitesi.....	105
3.6. Toplam Çözünebilir Protein İçeriği.....	110
3.6.1. Yapraklarda toplam çözünebilir protein içeriği.....	110
3.6.2. Kabuklarda toplam çözünebilir protein içeriği.....	113
3.6.3. SDS-PAGE profilleri.....	118

3.6.3.1.Yapraklarda SDS-PAGE profilleri.....	118
3.6.3.2. Kabuklarda SDS-PAGE profilleri.....	120
3.6.4. Western blot analizleri.....	124
3.6.4.1.Yapraklarda western blot analizleri.....	124
3.6.4.2.Kabuklarda Western Blot Analizleri.....	129
TARTIŞMA.....	135
KAYNAKLAR.....	149
EKLER.....	172
TEŞEKKÜR	
ÖZGEÇMİŞ	

## KISALTMALAR DİZİNİ

AD	-	Aktivite değeri
APRX	-	Askorbat peroksidaz
Borax	-	Sodyum tetraborat (Sodium tetraborate)
BSA	-	Sığır serum albumini (Bovine serum albumin)
BU	-	Protein bandının jelin başlangıç noktasına olan uzaklığı
CAT	-	Katalaz
EDTA	-	Etilendiamid tetra asetik asit
Gİ	-	Glukoz içeriği
GR	-	Glutasyon Redüktaz
JB	-	Jel boyu (işaret boyasının ilerleme mesafesi)
KA	-	Katalaz enzim aktivitesi
KİS	-	Kontrol grubunun iyon sızıntısı oranı
LT <sub>50</sub>	-	Düşük Sıcaklık Toleransı
MSA	-	Muhafaza dönemi sonrası soğan ağırlıkları
NA	-	Net aktivite Değeri
OD	-	Absorbans Değeri (Optical Density)
ÖM	-	Örnek miktarı
PAGE	-	Poliakrilamid jel elektroforezi (polyacrylamide gel electrophoresis)
PRX	-	Peroksidaz
PVDF	-	Polivinil diflorid membrane
PMSF	-	Fenilmethylsulfoni florid (Phenylmethylsulfonyl floride)
PVPP	-	Polyvinilpolypyrilidon (Polyvinylpolypyrrolidone)
Rf	-	Oransal ilerleme (Relative mobility)
Rpm	-	Dakikadaki dönme sayısı (Revolution per minute)
SD	-	Serbestlik derecesi
SDS	-	Sodyum dodesil sulfat (Sodium dodecyl sulfate)
SF	-	Örnek seyretme faktörü
Sİ	-	Sukroz içeriği
Sn	-	Saniye
SOD	-	Superoksit Dismutaz
SS	-	Standart sapma
TA	-	Taze ağırlık
TBST	-	Tris-Buffered Saline Tween-20
TCA	-	Trikloro asetik asit (Trichloro acetic acid)
TÇP	-	Toplam çözünebilir protein
TÇŞ	-	Toplam çözünebilir şeker
TEMED	-	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TPM	-	Toplam protein miktarı
UİS	-	Uygulama grubunun iyon sızıntısı oranı

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Toplam çözünebilir şeker miktarının belirlenmesinde kullanılan standart ve örnek hazırlığı.....	44
Çizelge 2.2. Glukoz miktarının belirlenmesinde kullanılan standart ve örnek hazırlığı.....	45
Çizelge 2.3. Sukroz miktarının belirlenmesinde kullanılan standart çözelti hazırlığı.....	46
Çizelge 2.4. Toplam protein miktarının belirlenmesi için standartların hazırlanması.....	48
Çizelge 2.5. Toplam protein miktarının belirlenmesi için örnek hazırlığı.....	49
Çizelge 2.6. Ekstrakte edilen toplam çözünebilir protein miktarının ‘Bradford Assay’ yöntemine göre belirlenmesi için standart ve örneklerin hazırlanması.....	55
Çizelge 3.1. Gemlik zeytin çeşidinde yapraklarda ve kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre zararlanma oranları.....	66
Çizelge 3.2. Gemlik zeytin çeşidinde yapraklarda ve kabuklarda yıllara, aylara göre düşük sıcaklık toleransının ( $LT_{50}$ ) değişimi.....	71
Çizelge 3.3. Gemlik zeytin çeşidinde yapraklarda ve kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre toplam çözünebilir şeker içeriği.....	76
Çizelge 3.4. Gemlik zeytin çeşidinde yapraklarda ve kabuklarda yıllara, aylara ve sıcaklıklara göre glukoz içeriği.....	83
Çizelge 3.5. Gemlik zeytin çeşidinde yapraklarda ve kabuklarda yıllara ve sıcaklıklara göre sukroz içeriği.....	90
Çizelge 3.6. Gemlik zeytin çeşidinde yapraklarda ve kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre katalaz aktivitesi ( $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ).....	98
Çizelge 3.7. Gemlik zeytin çeşidinde yapraklarda ve kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre askorbat peroksidaz aktivitesi....	106
Çizelge 3.8. Gemlik zeytin çeşidinde yapraklarda ve kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre toplam çözünebilir protein içeriği.....	114

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Denemenin yürütüldüğü zeytin bahçesinin genel görünüşü.....	37
Şekil 2.2. Birinci ve ikinci deneme yılları süresince (Mayıs 2003 – Nisan 2005) hava sıcaklıklarının aylık değişim ve dağılımı.....	38
Şekil 2.3. Gemlik zeytin çeşidi'nde meyvelerin olgunlaştığı dönemde dalların görünüşü.....	38
Şekil 2.4. Düşük sıcaklık testleri için örneklerin hazırlanması. A. Düşük sıcaklık uygulaması yapılacak zeytin sürgünleri, B. Örneklerin ıslak havlu kağıt içerisindeki görünümü, C. Örneklerin alüminyum folyo ile sarılmış haldeki görünümü ve thermocouple cihazı.....	40
Şekil 3.1. Gemlik zeytin çeşidinde yapraklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre zararlanma oranları.....	63
Şekil 3.2. Gemlik zeytin çeşidinde kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre zararlanma oranları.....	67
Şekil 3.3. Gemlik zeytin çeşidinde yıllara, aylara göre yaprak ve kabuklarda düşük sıcaklık toleransının ( $LT_{50}$ ) değişimi.....	70
Şekil 3.4. Gemlik zeytin çeşidinde yapraklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre toplam çözünebilir şeker içeriğinin değişimi.....	73
Şekil 3.5. Gemlik zeytin çeşidinde kabuklarda yıllara sıcaklıklara ve aylara göre toplam çözünebilir şeker içeriğinin değişimi.....	77
Şekil 3.6. Gemlik zeytin çeşidinde yapraklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre glukoz içeriğinin değişimi.....	80
Şekil 3.7. Gemlik zeytin çeşidinde kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre glukoz içeriğinin değişimi.....	84
Şekil 3.8. Gemlik zeytin çeşidinde yapraklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre sukroz içeriğinin değişimi.....	88
Şekil 3.9. Gemlik zeytin çeşidinde kabuklarda yıllara, aylara ve sıcaklıklara göre sukroz içeriğinin değişimi.....	92

Şekil 3.10. Gemlik zeytin çeşidinde yapraklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre katalaz enzim aktivitesinin değişimi.....	95
Şekil 3.11. Gemlik zeytin çeşidinde kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre katalaz enzim aktivitesinin değişimi.....	100
Şekil 3.12. Gemlik zeytin çeşidinde yapraklarda yıllara, aylara ve sıcaklıklara göre askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin değişimi.....	103
Şekil 3.13. Gemlik zeytin çeşidinde kabuklarda yıllara, aylara ve sıcaklıklara göre askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin değişimi.....	107
Şekil 3.14. Gemlik zeytin çeşidinde yapraklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre toplam çözünebilir protein miktarının değişimi.....	111
Şekil 3.15. Gemlik zeytin çeşidinde kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre toplam çözünebilir protein miktarının değişimi.....	115
Şekil 3.16. Gemlik zeytin çeşidi yapraklarında aylara göre SDS- PAGE toplam protein profilleri.....	119
Şekil 3.17A. Gemlik zeytin çeşidi yapraklarında aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre SDS- PAGE toplam protein profilleri (Mayıs-Ekim).....	121
Şekil 3.17B. Gemlik zeytin çeşidi yapraklarında aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre SDS- PAGE toplam protein profilleri (Kasım –Nisan).....	122
Şekil 3.18. Gemlik zeytin çeşidi kabuklarında aylara göre SDS- PAGE toplam protein profilleri.....	123
Şekil 3.19 A. Gemlik zeytin çeşidi kabuklarında aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre SDS- PAGE toplam protein profilleri (Mayıs-Ekim).....	125
Şekil 3.19 B. Gemlik zeytin çeşidi kabuklarında aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre SDS- PAGE toplam protein profilleri (Kasım –Nisan).....	126
Şekil 3.20. Gemlik zeytin çeşidi'nde yapraklarda aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre 16 kDa dehidrin proteinin görünümü (A) ve 16	

kDa dehidrin proteinin band yoğunluğu (B).....	127
Şekil 3.21. Gemlik zeytin çeşidi'inde yapraklarda aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre 43 kDa dehidrin proteinin görünümü (A) ve 43 kDa dehidrin proteinin band yoğunluğu (B).....	128
Şekil 3.22. Gemlik zeytin çeşidi'inde kabuklarda aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre 16 kDa dehidrin proteinin görünümü (A) ve 16 kDa dehidrin proteinin band yoğunluğu (B).....	131
Şekil 3.23. Gemlik zeytin çeşidi'inde kabuklarda aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre 23 kDa dehidrin proteinin görünümü (A) ve 23 kDa dehidrin proteinin band yoğunluğu (B).....	132
Şekil 3.24. Gemlik zeytin çeşidi'inde kabuklarda aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre 30 kDa dehidrin proteinin görünümü (A) ve 30 kDa dehidrin proteinin band yoğunluğu (B).....	133
Şekil 3.25. Gemlik zeytin çeşidi'inde kabuklarda aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre 43 kDa dehidrin proteinin görünümü (A) ve 43 kDa dehidrin proteinin band yoğunluğu (B).....	134

**SİMGELER DİZİNİ**

ABA	-	Absizik asit
Cm	-	Santimetre
°	-	Derece
dH <sub>2</sub> O	-	Distile su
Dk	-	Dakika
G	-	Gram
ha	-	Hektar
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	Hidrojen peroksit
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	Sülfürik asit
HCl	-	Hidroklorik asit
kDa	-	Kilo dalton
KOH	-	Potasyum hidroksit
K-PO <sub>4</sub>	-	Potasyum fosfat
L	-	Litre
M	-	Molar
mAmp	-	Mili amper
Mg	-	Miligram
Mg/gTA	-	Miligram/Gram Taze Ağırlık
ml	-	Mili litre
mM	-	Mili molar
Mt	-	Milyon ton
MW	-	Moleküler ağırlık standardı (Molecular weight standart)
NaOH	-	Sodyum hidroksit
Nm	-	Nano metre
Ppm	-	Milyonda bir birim (Parts per million)
S	-	Saat
V	-	Volt
W	-	Watt
μl	-	Mikro litre
%	-	Yüzde oran
°C	-	Santigrat derece
β	-	Beta
μg	-	Mikrogram
μmol/mgprotein	-	Mikromol/Miligramprotein



## GİRİŞ

Botanik açıdan zeytinin *Oleaceae* familyasının *Fraxinus*, *Forsythia*, *Forestiara*, *Ligustrum*, *Olea*, *Syringa* gibi bir çok cinsi (genera) söz konusudur. Bu cinsler içinde yağlık türler *Olea* cinsine bağlı olup, bu cinse bağlı 30 kadar değişik tür, tropik ve subtropik iklim şartlarında yetişmektedir. Bu kadar tür arasında ticari anlamda zeytin ve zeytinyağı üretimini mümkün kılan yegane tür *Olea europaea* (kültür zeytini)'dir (Ünsal 2000; Anonim 2006a).

*Olea europaea* L., özellikle Akdeniz ülkelerinin tarım sektöründe önemli rol oynayan ve ekonomik değeri yüksek olan bir meyvedir. Değişik çevresel koşullara adaptasyonun yüksek oluşu, değerli bir besin maddesi olması yanı sıra, sofralık olarak değerlendirilmesi, yağa işlenebilmesi, ve özellikle son yıllarda insan sağlığı açısından öneminin ön plana çıkması nedeniyle dünyada en fazla yetiştiriciliği yapılan bitki türleri arasında yer almaktadır (Bartolini ve ark. 1999; Duman 2003).

Zeytin ağacının kültürel anlamda ilk yetiştiriciliğinin M.Ö. 3000 yıllarında Suriye'de yaşayan Sami ırkından insanlar tarafından yapıldığı ve yağının ticari olarak kullanıldığı kaydedilmektedir (Anonim 2003). Zeytin yetiştiriciliğinin yapıldığı ve ilk yararlanılan yer Akdeniz ülkeleri olmuş ve tüm Akdeniz bölgesi boyunca yayılmıştır. Güneydoğu Anadolu'da ilk yerleşimini tamamlayan zeytin önceleri Batı Anadolu'ya ve oradan da Ege Adaları yoluyla Yunanistan, İtalya, Fransa ve İspanya'ya kadar uzanmıştır. Sicilya yoluyla Kuzey Afrika'ya sıçrayan zeytin, Güneydoğu Anadolu'dan çıkarak Suriye ve Mısır üzerinden ilerleyen bu ikinci kol ile birleşerek, Fas'a kadar uzanıp Akdeniz'in güney kıyılarındaki yayılışını tamamlamıştır (Anonim 2006a).

Dünyada zeytin 7 879 151 ha alan üzerinde yetiştirilmekte olup, zeytin ağacı genellikle ülkemizin de içinde yer aldığı Akdeniz havzası ülkelerinde yoğunlaşmıştır

(Anonim 2008b). Akdeniz kıyısında yer alan İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Portekiz, Fransa, Fas, Tunus ve Cezayir ağaç varlığının %97'sine sahip önemli üretici ülkelerdir. Bunların yanısıra ABD, Arjantin ve diğer bazı ülkelerde de zeytinciliğin küçük çaplı olsa da yayıldığı görülmektedir (Anonim 2003; Anonim 2006b). Dünya zeytinyağı üretiminin %75.3'ü Avrupa Birliği ülkelerinde gerçekleşmektedir. İspanya, İtalya, Yunanistan'ın ardından Türkiye dünya zeytinyağı üretiminde 4.sırada yer almaktadır. Türkiye Dünya sofralık zeytin üretiminde ikinci, siyah sofralık zeytin üretiminde ise ilk sırada bulunmaktadır (Anonim 2003; Anonim 2008a).

Ülkemizde işlenebilen tarım alanlarının % 2.5'ini, bağ ve bahçe alanlarının ise %19.7'sini zeytin alanları oluşturmaktadır. Zeytin üretiminin %76'sı Ege, %14'ü Akdeniz, %5.7'si Marmara, %4'ü Güneydoğu, %0.3'ü Karadeniz bölgesinde yapılmaktadır. Ağaç sayısı ve üretim alanları açısından da bölgeler aynı sırayı izlemektedir. Ürün bazında değerlendirildiğinde ise, üretimin %72'si yağlık olarak değerlendirilen Ege bölgesi ile %83'ünü sofralık olarak değerlendiren Marmara bölgesi ülkemizin iki önemli bölgesidir (Anonim 2003). 2006 yılı itibariyle 1 800 000 ton olan Türkiye dane zeytin üretimi sırasıyla Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde yapılmıştır. Yaklaşık 100 milyon ağaç sayısı giderek artmaktadır (Anonim 2008b).

Gerek ülkemizde ve gerekse bölümümüzde özellikle son 25-30 yıl içerisinde zeytincilik alanında pek çok araştırma yapılmış ve zeytin yetiştiriciliğinde karşılaşılan sorunların çözümüne yönelik önemli adımlar atılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında, zeytin çeliklerinin köklendirilmesi (Dikmen 1969; Uluşkan 1978; Dikmen ve Uluşkan 1982; Ayanoğlu ve ark. 2000; Günver ve ark. 2000), oksinlerin kallus dokusunun yapısı ve fenolik madde değişimi üzerine etkileri (Tanrısever ve ark. 2000), uygun dikim aralıklarının belirlenmesi (Dikmen ve Uysal 1985), tohum çimlendirilmesini kolaylaştıran uygulamalar (Yüce 1979,1985), aşılı köklü zeytin fidanı üretimi (Uluşkan ve Aykas 1986; Tekintaş ve ark. 2000; Özen 2002), çeşitlere göre uygun budama ve terbiye sistemlerinin saptanması (Çavuşoğlu ve Çakır 1978), yine çeşitlere göre verimli ve kaliteli fertlerin belirlenmesi ve bunların üretimlerinin yaygınlaştırılması için seleksiyon çalışmaları (Uslanmaz 1972), çiçek tomurcuğu dolayısıyla meyve oluşumuna yönelik çalışmalar (Barut ve Ertürk 2002), alternatif hasat yöntemlerinin araştırılması

(Çavuşoğlu 1973,1977; Uslanmaz 1977; Caran 1994; Barut 2000), bitkisel fenollerin mevsimsel değişimi ilgili araştırmalar (Akıllıoğlu 1994), periyodisite ile ilgili çalışmalar (Akıllıoğlu ve ark. 1990; Eriş ve Barut 1991; Barut 1992; Barut ve Eriş 1993,2000; Aykas ve ark. 1998a; Varol 2003; Varol ve Tanrısever 2004) ve doku kültürü teknikleri yoluyla zeytinin üretimi (Aykas ve ark. 1998b; Özgen 2000) gibi pek çok değişik araştırma konuları üzerinde durulmuştur.

Zeytinciliğin ülkemiz tarımında çok önemli bir yeri olmasına karşın, üretim miktarları düşüktür ve yıllara göre büyük değişkenlik göstermektedir. Bu durumun nedenleri arasında en büyük payın periyodisite olduğu düşünülmektedir. Bu konunun fizyolojik ve morfolojik temellerini açıklamaya yönelik pek çok araştırma yapılmıştır. Bölümümüzde de bu konuyla ilgili olarak çalışmalar yürütülmüştür (Barut 1992; Eriş ve Barut 1992; Barut ve Eriş 1993,2000). Örneğin Barut ve Eriş (1993), “Gemlik” zeytin çeşidinde bilezik alma, NAA, ile çiçek seyreltmesi ve GA<sub>3</sub> gibi uygulamalarının verim, kalite ve periyodisiteye olan etkilerini belirlemişlerdir. Araştırma sonucunda, sürgünlerdeki somak, somaktaki meyve tutumu, verim, kilogramdaki meyve sayısı ve meyvelerin et/çekirdek oranları açısından bilezik alma ile GA<sub>3</sub> uygulamaları daha başarılı sonuçlar vermiştir. Somaktaki çiçek sayısı yönünden ise, özellikle NAA ile seyreltme çalışmaları ile daha etkili sonuçlar sağlanmıştır. Bugüne kadar yapılan araştırmaların sonuçlarından faydalanılarak yeni araştırmalarla bu sorunların çözülmesine katkıda bulunulmuştur.

Ekonomik anlamda zeytin yetiştiriciliği 30-45° enlemleri arasında yapılmakla birlikte, son yıllarda dünyada zeytin yağına olan talebin hızlı artışı yetiştiricilik sınırlarının her iki yarı kürede de genişlemesine neden olmuştur. Üstelik, sonbaharı serin geçen yeni zeytin üretim bölgelerinde meyve olgunlaşma sürecinin yavaş ilerlemesi zeytinyağı kalitesini arttırmaktadır (Palliotti ve Bonghi 1996; Mancusso 2000). Ancak bu bölgelerde yetiştirilen zeytin ağaçları aynı zamanda don tehlikesi ile karşı karşıya kalmaktadır (Palliotti ve Bonghi 1996). Bir zamanlar dünyanın sayılı üreticisi ile ihratçısı sayılan Fransa’da soğuk zararı nedeniyle zeytin ağacı sayısı 25 milyondan 5.7 milyona gerilemiş ve yetiştirici soğuk zararı sebebiyle zeytinciliği bırakmak zorunda kalmıştır (Burak ve ark. 2000).

Ülkemizde, zeytincilik yapılan bölgelerde Akdeniz iklimi hüküm sürmekte olup kışlar ılık ve yağışlı, yazlar ise sıcak ve kurak geçmektedir. Bu bölgelerde genel olarak yıllık sıcaklık ortalaması 15°C ve 20°C arasındadır. Maksimum sıcaklığın 40°C' ye yükselmesi zeytin ağaçları için pek zararlı değildir (Eriş ve Barut 2000). Ancak vegetatif gelişme durur. Buna karşın, kış aylarında sıcaklığın ani olarak -10°C'ye düşmesi ağaçların çeşitli organlarında önemli zararlar yaparak önemli verim kayıplarına neden olabilmektedir (Fontanazza 1986). Marmara bölgesi, Karadeniz ile Akdeniz iklimi arasında geçiş özelliği göstermektedir. Bu bölge kuzeyin soğuk rüzgarlarına karşı açık olup sıcaklık dereceleri zaman zaman kritik seviyelere düşerek tarımsal ürünlerde zararlanmalara sebep olmaktadır. Nitekim Bursa yöresinde 1985 yılında kış aylarında ılıman giden hava şartlarının ardından Şubat ayında yaşanan ani sıcaklık düşüşleri (-16.4°C'ye kadar) zeytinlerde büyük zararlanmalara neden olmuştur. Bu dönemde zeytin ağaçlarında %100'e varan yaprak dökümleri, sürgün ve yapraklarda kahverengileşme ve kuruma ve hatta bazı ağaçlarda tacın ve gövdenin tamamının zararlandığı saptanmıştır (Anonim 1985).

Bahçe bitkilerinin düşük sıcaklıklara dayanımlarının temel esasları üzerine çok uzun süreden beri çalışmalar yapılmaktadır (Craker ve ark. 1969; Davis ve Gilbert 1970; Evert ve Weiser 1971; Faw ve Jung 1972; Chen ve Li 1980; Anchordoguy ve ark. 1987; Fischer ve Höll 1991; Eagles ve ark. 1993; Anderson ve ark. 1995; Bartolozzi ve Fontanazza 1999; Beck ve ark. 2004; Foyer ve Noctor 2005). Bu çalışmalarda dona mukavemeti etkileyen içsel ve dışsal faktörlere yönelik çok değişik konulara değinilmiştir. Örneğin, dona mukavemet ile çevre sıcaklığı, bitkinin ve toprağın su içeriği arasındaki ilişkiler, düşük sıcaklıklarda bitkilerde bulunan içsel maddelerin miktar ve değişimleri, dona dayanımının mevsimsel değişimi, düşük sıcaklıklarda üretilen spesifik genlerin değişimi vs. gibi konular ele alınmıştır. Bununla birlikte, düşük sıcaklık stresine karşı bitkilerin tepkilerini moleküler seviyede açıklamaya yönelik olarak çok yıllık yaprağını döken odunsu bitkilerde çok sayıda çalışma (Kuroda ve Sagisaka 1993; Lanham ve ark. 2001; Dhanaraj ve ark. 2005; Johnston ve ark. 2007; Pan ve Lou 2007; Zhou ve ark. 2007; Maghuly ve ark. 2008) bulunmasına rağmen, herdemyeşil türlerde bu konudaki araştırmalar (Arora ve ark.

1992; Marian ve ark. 2004; Chen ve ark. 2006) sınırlı sayıdadır. Bu bitkilerin soğuga uyum mekanizmalarının oldukça kompleks yapıda olması nedeniyle bugüne kadar daha az sayıda moleküler düzeyde çalışmanın yapılmasına yol açmıştır (Arora ve ark. 2004).

Zeytin ağacında dona dayanım hakkındaki mevcut bilgiler daha çok soğuk zararından sonraki bahçe gözlemlerine dayanmaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda zeytin bitkisinin düşük sıcaklıklara toleransını belirlenmesine yönelik laboratuvar araştırmalarını içeren çeşitli bilimsel çalışmalar da (Roselli ve ark. 1989; Antognozzi ve ark. 1990; Roselli ve Venora 1990; Roselli ve ark. 1992; Martin ve ark. 1993; La Porta ve ark. 1994; Soleimani ve ark. 2004) yapılmıştır. Bu araştırmaların yanı sıra mevsimlere bağlı olarak karbonhidratların (Barut ve Eriş 1995; Barranco ve ark. 2005; Rejšková ve ark. 2007) ve toplam proteinlerin (Bartolozzi ve ark. 1999) değişimini inceleyen sınırlı sayıda araştırma vardır. Ancak bu çalışmalar zeytinde dona dayanım mekanizmasının araştırmasına yönelik detaylı moleküler analizleri içermemektedir. Bölümümüzde de zeytinlerde toplam proteinlerin yıllık değişimleri (Eriş ve ark. 2007; Gülen ve ark. 2007) ile bazı zeytin genotiplerinin antioksidatif enzim aktivitelerinin soğuga dayanımla ilişkisini inceleyen çalışmalar yapılmıştır (Cansev ve ark. 2005, 2006, 2008). Zeytinde bugüne kadar yapılan çalışmalarla belirli ilerleme kaydedilmişse de, dona dayanım mekanizmasının tam olarak anlaşılabilmesi için daha detaylı moleküler fizyolojik çalışmaların yapılmasının önemi ülkemiz zeytinciliği açısından ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmada, Türkiye'nin en önemli sofralık zeytin çeşidi olan te düşük sıcaklıklara dayanım mekanizmasının fizyolojik ve moleküler düzeyde incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla "Gemlik" zeytin çeşidi'ne ait bir yıllık sürgünlerde iki yıl süresince yapay düşük sıcaklık testleri uygulanarak, yaprak ve kabuk dokularının mevsimlere göre düşük sıcaklıklara dayanımı belirlenmiştir. Ayrıca mevsimlere ve düşük sıcaklıklara göre yaprak ve kabuk dokularında oluşan fizyolojik ve moleküler biyolojik değişimlerin belirlenebilmesi amacıyla karbonhidratlar, proteinler ve bazı antioksidatif enzim aktiviteleri ile birlikte zeytinde soğuga dayanıklılıkla ilgili kullanılabilecek belirleyici bir protein araştırılmıştır.

## 1. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bu bölümde tez konusu ile ilgili olarak bitkilerde düşük sıcaklıklara dayanım ve dayanımın belirlenmesi, düşük sıcaklıklarda çözünebilir şekerlerin, proteinlerin ve dehidrinlerin rolleri ile, düşük sıcaklıklarda antioksidant savunma mekanizmaları konularında bilgi verilmiş ve bu konularda yapılmış çalışmalar özetlenerek sunulmuştur.

### 1.1. Düşük Sıcaklıklara Dayanım

Bitkilerin yeryüzünde yayılışlarını sınırlayan en önemli faktörlerden biri de düşük sıcaklıklar olarak kabul edilmektedir (Eriş 2003). Dünya üzerindeki kara parçalarının yaklaşık üçte ikisi her yıl donma noktasının altındaki sıcaklıklara maruz kalmaktadır; bunların da yaklaşık yarısını  $-20^{\circ}\text{C}$ 'nin altındaki sıcaklıklar oluşturmaktadır (Beck ve ark. 2004). Boyer'e göre, bitkilerin verim kapasitesi ile ortalama verimleri arasındaki dengesizliğin nedenlerinin %90'ını çevre faktörlerindeki olumsuzluklar oluşturmaktadır. Çevre faktörlerindeki olumsuzluklardan biri olan düşük sıcaklıklar da üretimi sınırlayan en önemli etkenlerden biridir. Don ve soğğun şiddetine göre ürün tamamen zararlanmakta ya da büyük ölçüde verim düşüklüğü meydana gelmektedir. Gerek ıslah programları ve gerekse kültürel işlemler yardımıyla düşük sıcaklık zararını önlemek ya da azaltabilmek tamamen düşük sıcaklık mekanizmasının anlaşılmasına bağlıdır (Li 1984; Streb ve ark. 1999).

Düşük sıcaklık zararlanması, bitkilerde iki ana başlık altında toplanmaktadır. Bunlardan birincisi  $0-13^{\circ}\text{C}$  arasındaki sıcaklıklara maruz kalma sonucu oluşan zararlanamadır. Donma noktasının üzerindeki bu düşük sıcaklıklar tropik ve subtropik iklimlerde yetişen ve soğğa uyum sağlayamayan birçok bitkiyi zorlamakta ve hatta zarar vermektedir. Buna "üşüme (chilling) stresi" adı verilmektedir (Sakai ve Larcher

1987). Bu durum biyomembranların akışkanlıklarında azalmaya bağlı olarak fonksiyon kaybı ve membrana bağlı iyon pompalarının işlevlerinin bozulması ya da en azından sayılarının azalması sonucunda ortaya çıkmaktadır.

Diğer yandan, sıcaklığın 0°C'nin altına düşmesi sonucu oluşan durum “don (freezing) stresi” olarak adlandırılmaktadır. Don stresinin olumsuz etkisi ise, çevre sıcaklığının düşük olmasından çok, hücre suyunun donmasından kaynaklanmaktadır. Donma sıcaklığında hücre metabolizması en aza inmekte ve önemli fizyolojik işlevler durmaktadır (Kaçar ve ark. 2002). Bir bitkinin düşük sıcaklıklara maruz kalması sonucu zararlanıp zararlanmayacağı ve zararlanırsa bunun ne miktarda olacağı birçok faktöre bağlıdır. Örneğin; bitkinin gelişiminin hangi basamağında olduğu, donmanın süresi ve şiddeti, soğuma ve yeniden ısınma hızları ve buz oluşumunun hücre içinde mi (?) yoksa hücreler arası boşluklarda mı (?) ortaya çıktığı gibi faktörler zararlanma şiddetini etkilemektedir (Sakai ve ark. 1968). Don olayının ortaya çıkışında sıcaklık yavaş yavaş düşüyorsa bitkide buz kristalleri, önce hücreler arası boşluklarda oluşur. Şayet, sıcaklık çok hızlı bir şekilde düşerse (örneğin, dakikada 8-10°C'den fazla) buz kristalleri hücre içinde de oluşur ve ani ölüm kaçınılmaz olur. Örneğin, bazı herdemyeşil ibrelili yapraklılar, kışın don yavaş yavaş oluştuğunda -87°C sıcaklıkta zararlanmadıkları halde, aynı yapraklar dakikada 8-10°C'lik hızla düşen sıcaklık sonucu -10°C'de ölmüşlerdir (Eriş 2003). Hücre içi buz oluşumunda hücre membran bütünlüğünün bozulması sebebiyle hücrenin ölümü kaçınılmaz bir sonuç olmaktadır. Bu kuralın tek istisnası ise çok hızlı bir şekilde (10000 K x dk<sup>-1</sup>) dokunun soğutulması sonucu amorf buzun oluştuğu yapay camlaştırmadır (vitrikasyon) (Sakai ve ark. 1968).

Bitkilerde donma sonucu tetiklenen hücresel dehidrasyon, hücrelerde pek çok zarara neden olabilmektedir (Pearce 2001). Bu hücresel dehidrasyon, dehidrasyon-tolerans sınırını aştığı zaman membran yapısı zararlanmaktadır. Bu durum membran permeabilitesinin azalmasına neden olmaktadır (Uemura ve Yoshida 1984). Bundan dolayı, donma kaynaklı dehidrasyona karşı hücre membranlarının korunması donma dayanımında en önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu durum hem membran lipid kompozisyonundaki değişimlerle hem de hücre içinde şeker gibi maddelerin birikimi ile olmaktadır (Xin ve Browse 2000). Nişastanın hidrolizi ile

oluşan sukroz gibi serbest şekerler hücre içinde kryoprotektif rol oynamaktadırlar. Öte yandan, zararlanma başka sebeplerden dolayı da olabilmektedir; hücrelerin soğuyabilme (supercooling) kapasitelerini aşmaları, ya da buzun varlığında ksilem hücrelerinin embolizmi nedeniyle de zararlanma oluşabilmektedir (Pearce 2001). Bitkilerin düşük sıcaklıklara dayanımı ayrıca su durumu, beslenme koşulları, ışık yoğunluğu ve gün uzunluğu gibi çevresel faktörlerden de etkilenmektedir. Bazı yüksek bitkilerde soğuğa adaptasyon ile dona toleransın artmasında ışığın rolü vazgeçilmezdir (Bourion ve ark. 2003; Janda ve ark. 2003). Örneğin, ışık yoğunluğunun içsel absizik asit (ABA) konsantrasyonunu etkilediği, ve genlerin ekspresyonunu değiştirerek düşük sıcaklıklara toleransı artırdığı ya da azalttığı gösteren çalışmalar mevcuttur. Yüksek bitkilerde görülen oldukça karmaşık yapıdaki soğuğa dayanım mekanizması, her türün kendi evrimsel sürecinde maksimum seviyede dona dayanım kazanma çabası sayesinde gelişmiştir (Minami ve ark. 2005).

Dona mukavemet ya da hassasiyet her bitkinin özgün özelliği olup bitkinin genetik eğilimi ile çevresel faktörlerden etkilenmekte ve bu sebeple genellikle zamana bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Beck ve ark. 2004). Ilıman ve kutup iklimlerinde yaşayan birçok çok yıllık bitkinin dona dayanımları mevsimlik değişiklik göstermektedir (Repo 1992; Silim ve Lavender 1994). Doğada bitki dokularının birçoğu aktif büyüme döneminde 0°C'nin hemen altındaki sıcaklıklarda ölürken, ılıman iklim bölgelerinde yetişen odunsu bitkilerin büyük bir bölümü kış aylarında (durgun dönemde) -30°C'den -60°C'ye varan düşük sıcaklıklarda yaşamlarını sürdürebilmektedirler (Arora ve Lim 2005). Bu bitkiler sonbaharın sonlarında ve kış mevsimi başlangıcında düşük pozitif sıcaklıklarda (0-7 °C) kış soğuklarına dayanım kazanmaktadırlar. Dünya üzerinde bitkilerin coğrafik dağılımının belirlenmesinde temel rol alan bu olguya "soğuğa uyum" (cold acclimation) (soğuk adaptasyonu, soğuk aklımasyonu) adı verilmektedir (Arora ve ark. 2004). Nitekim, yaprağını döken ve dökmeyen şeftali türlerinin düşük sıcaklık toleransları arasındaki farklılıkları mevsimlik değişimini incelemek amacıyla yürütülen bir çalışmada, yaprağını döken şeftali türünün düşük sıcaklık toleransı herdemyeşil türe göre daha yüksek bulunmuştur. Mevsimsel olarak değerlendirildiğinde ise, her iki türde de sonbahardaki LT<sub>50</sub> değeri yaza göre çok daha düşük olmuştur. Buna göre LT<sub>50</sub> değerleri, herdemyeşil türde Ağustos ayında -5.8



°C, Ekim ayında -10.3°C; yaprağını döken türde ise Ağustos ayında -7 °C, Ekim ayında -15°C olarak tespit edilmiştir (Arora ve ark. 1996). Bir başka çalışmada, yaz aylarında -10°C'ye maruz bırakılan herdem yeşil bir tür olan İskoç çamının (*Pinus sylvestris* L.) iğne yaprakları ölümcül bir şekilde hasarlanırken, bu ağaçlar kış mevsiminin ortasında -80°C sıcaklıklara maruz kalmalarına rağmen hayatlarını sürdürmüşlerdir (Kontunen-Soppela ve Laine 2001).

Taiz ve Zeiger (2003), odunsu bitkilerin soğuğa uyum sayesinde doğada düşük sıcaklıklara dayanım kazanmalarının temel olarak iki evrede gerçekleştiğini belirtmektedir:

1. Birinci evrede, bitkinin kısa gün ve dondurucu olmayan düşük sıcaklıklar tarafından uyarıldığı ve bu aşamada bitkinin uyum yeteneğini artıran ABA gibi bir faktörün yapraklardan gövdelere floem aracılığıyla taşındığı açıklanmaktadır. Bu dönemde, odunsu türlerde trakelerden su çekilmesi ile sonradan oluşacak donmaya bağlı gövde çapının genişleyerek parçalanmasının önlediği belirtilmektedir. Aynı zamanda uyumun birinci evresindeki hücrelerin 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda yaşayabilmekle birlikte tamamen mukavemet kazanmadıklarına dikkat çekilmektedir.

2. İkinci evrede ise, bilinmeyen bir taşınabilir faktörün donmaya karşı dayanım sağladığı düşünülmektedir. Bu dayanım, donmanın etkisiyle gelişmekte ve bu dönemde hücreler tam dayanım kazanınca 0°C'nin çok altındaki sıcaklıklara da dayanım göstermektedir.

Herdemyeşil bir tür olan zeytin ağacında düşük sıcaklıklara dayanım ile ilgili çeşitli araştırmalar mevcuttur. Bu çalışmaların büyük çoğunluğunu zeytin çeşitlerinin dona dayanımları arasındaki farklılıkları ortaya koymaya yönelik olarak yapılan araştırmalar oluşturmaktadır. Bir sonraki bölümde, zeytinde düşük sıcaklıklara dayanımın belirlenmesi amacıyla yapılmış ve özen gösterilerek seçilen değişik araştırma sonuçları verilmiştir.

### 1.1.1. Düşük Sıcaklıklara Dayanımın Belirlenmesi

Bilindiği gibi, 0°C'nin üzerindeki düşük sıcaklıklar özellikle soğuğa hassas bitkilerde metabolik ve fizyolojik işlevler üzerinde olumsuz etki yaparken aynı zamanda hücre membranlarının yapısını da etkilemektedir. Düşük sıcaklıklara hassas bitkilerin hücre membranındaki lipidler katılaşmakta, bir başka deyişle kristalize olmaktadır. Bu olgu biyomembranların geçirgenliğinin azalmasına ve membran enzim aktivitelerinin yitirilmesine neden olmaktadır. Soğuk stresi, duyarlı bitkilerde K<sup>+</sup>, amino asitler ve şekerler gibi bazı moleküllerin plazma membranından dışarı sızmasına yol açmaktadır (Levitt 1980). Sıcaklığın 0°C'nin altına düşmesi sonucu oluşan don zararı ise, düşük çevre sıcaklığından çok, hücre suyunun donmasından kaynaklanmaktadır. Bitkide sıcaklık 0°C'nin altına düştüğü zaman öncelikle apoplasttaki (hücreler arası boşluk) su donmaktadır. Hücre duvarında ve hücreler arası boşlukta buz kristalleri oluşurken başlangıçta simplastta (hücre içi) bir etkileşim görülmemektedir. Apoplasttaki su tamamen donsa bile dona dayanıklı bitkiler havaların ısınmasıyla tekrar eski durumlarına dönebilmektedir. Ancak apoplasttan sonra simplastta da buz kristallerinin oluşması sonucu eski durumuna dönemeyen bitki yaşamını yitirmektedir. Buz kristallerinin oluşmasından dolayı hücre membranları mekanik olarak zarar görmekte ve sonuçta hücre ölümü gerçekleşmektedir (Steponkus 1984; Pearce 1999, 2001). Yukarıda bahsedildiği gibi düşük sıcaklık zararı ilk olarak plazma membranında etkili olmaktadır (Uemura ve ark. 2006).

Zeytinde dona mukavim çeşitlerin seçimi ve dona dayanımın mekanizmasını anlamaya yönelik olarak yapılan çalışmalar dona toleransın geliştirilmesine büyük katkı sağlamaktadır (Baek ve Skinner 2003). Bu çalışmalarda temel olarak, dona dayanımın belirlenmesi için kullanılan basit ve etkili seçim kriterinin ortaya konulması en önemli amaçlardan birini oluşturmaktadır (Bartolozzi ve Fontanazza 1999; Mancuso 2000). Bugüne kadar zeytin ağaçlarının dona toleransını belirlemek için don zararından sonraki bahçe gözlemleri, canlılık testleri (Fontanazza ve Preziosi 1969), stomadial yoğunluk (Roselli ve ark. 1989), fotosentetik aktivite (Antognozzi ve ark. 1990), stoma büyüklüğü (Roselli ve Venora 1990), fenolik bileşikler (Roselli ve ark. 1992), ayrımsal ısı analizi

(differential thermal analysis, DTA) (Martin ve ark. 1993) ve iyon sızıntısı (La Porta ve ark. 1994) gibi yöntemler kullanılmıştır.

Bu yöntemler arasında “iyon sızıntısı testleri” (elektriksel iletkenlik) hızlı ve kolay uygulanabilirliği sebebiyle en yaygın yöntemdir. Bu yöntem ilk olarak 1932 yılında Dexter ve ark. tarafından önerilmiş, daha sonra Sukumuran ve Wieser ile Zhang ve Willson adlı araştırmacılar tarafından 1972 ve 1987 yıllarında modifiye edilmiştir (Gusta ve ark. 2003). İyon sızıntısı bitkilerde sıcaklıkla ilgili stres türlerine ilişkin zararlanma oranını (membran zararlanması) belirlemek için kullanılmaktadır (Eugenia ve ark. 2003; Gusta ve ark. 2003). Bu test, zararlanmanın bir sonucu olarak ortaya çıkan hücre membranındaki fonksiyon bozuklukları nedeniyle sitoplazmadan apoplastik sıvıya sızan iyonların miktarının belirlenmesi prensibine dayanmaktadır (Eugenia ve ark. 2003). Palta ve ark. (1977), düşük sıcaklık sonucu zararlanan soğan yumrusu hücrelerinden sızan sıvıdaki temel katyonun potasyum ( $K^+$ ) olduğunu ve bu sıvıdaki iletkenliğin hemen hemen tamamını potasyumun sağladığını tespit etmişlerdir. Donma sırasında iyon sızıntısındaki artış (özellikle  $K^+$ ) membran pompasını da içeren hücre membranlarının taşıma (transport) özelliklerinin bozulmasına yol açmaktadır. Potasyum taşınımının H-K-ATPazlar vasıtasıyla gerçekleştirildiği bilinmektedir (Sze 1985). Stres uygulamaları sonrası sözkonusu eriyiklerin sızıntı miktarının tespiti, doku zararlanmalarının belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Palta ve ark. 1982).

Genellikle oransal iyon sızıntısının %50 seviyesi, ya da zararlanma indeksi, basitçe %50 doku ölümüne eşit olarak kabul edilmektedir (Arora ve ark. 1992) ve bu orana karşılık gelen sıcaklık, iyon sızıntısı-test sıcaklığı grafiği ya da regresyon metodu kullanılarak hesaplanmaktadır (Hadley ve Amundson 1992; Repo ve ark. 1996). En son olarak hesaplanan bu sıcaklık bitki dokusunun %50 ölüm sıcaklığı ( $LT_{50}$ ) olarak kabul edilmektedir.

Aşağıda zeytinlerde dona dayanımının belirlenmesi ile ilgili yapılmış bazı çalışmalar özetlenerek sunulmuştur.

Nostrale di Rigali, Frantoio, Leccino ve Moralisio zeytin çeşitlerinin dona dayanımlarını belirlemek amacıyla yürütülen bir çalışmada, zeytin ağaçlarından kış ayları boyunca periyodik olarak alınan örneklerde yaprak, tomurcuk ve sürgün dokularında %50 ölüm sıcaklığı ( $LT_{50}$ ) belirlenmiştir. Buna göre ortalama  $LT_{50}$  yapraklar için  $-12^{\circ}\text{C}$ , tomurcuklar için  $-13^{\circ}\text{C}$  ve sürgünler için  $-18^{\circ}\text{C}$  olarak tespit edilmiştir. Çeşitler arasında yaprak  $LT_{50}$  ölüm sıcaklığında herhangi bir farklılık tespit edilmezken, "Nostrale di Rigali" çeşidinin sürgünleri ve özellikle de tomurcukları soğuk periyodunun başlangıç ve sonunda daha fazla dona dayanım göstermiştir. Tüm çeşitlerde sıcaklıkların düşmesi ile yaprak ve sürgünlerin çözünebilir madde miktarlarında artış olduğu tespit edilmiştir (Antognozzi ve ark. 1990).

Dona hassas bir çeşit olan 'Frantoio' zeytin çeşidine yapraktan sentetik bir büyümeyi düzenleyici olan mefluidide uygulaması yapılmıştır. Bu büyümeyi düzenleyici madde zeytinlerde dona dayanımı artırmıştır. İyon sızıntısı ve bu test sonucunda elde edilen  $LT_{50}$  değeri, uygulama görmemiş bitkilerde daha yüksek bulunmuştur. Uygulama görmüş ve görmemiş gruplarda,  $LT_{50}$  sıcaklığının altında, yapraklarda sulu görünüm ve kalıcı kahverengileşmeler tespit edilmiştir.  $LT_{50}$  sıcaklığı mefluidide uygulaması ile  $-11.1^{\circ}\text{C}$ 'den  $-14.9^{\circ}\text{C}$ 'ye yükselmiştir. Araştırmacılar, hem kontrollerde hem de uygulamalarda  $LT_{50}$  sıcaklık derecesinin altında zeytin yapraklarında iyileşmenin görülmesini, bu sıcaklıklarda plazma membranı ATPaz aktivitesinin tamamen engellenmesi ile açıklamışlardır (Pallioti ve ark. 1996). Ayrıca bu çalışmada, zeytin yapraklarında düşük sıcaklık stresi çalışmalarında zararlanmanın tespiti için 'iyon sızıntısı testi'nin iyi bir belirleyici olduğu belirtilmiştir.

Bartolozzi ve Fontanazza (1999), 12 zeytin çeşidinin (11 İtalyan ve 1 Fransız çeşidi) dona mukavemetlerini belirlemeye çalışmışlardır. Zararlanmanın tespitinde görsel değerlendirmenin yanısıra, iyon sızıntısı ve ayrımsal termal analiz (DTA) tekniklerini de kullanılmıştır. Saksıda yetişen 3 yaşlı bitkilere DTA için  $-8$ ,  $-10$ ,  $-12$  ve  $-14^{\circ}\text{C}$ ; 1 saat, iyon sızıntısı testi için  $0$ ,  $-12$ ,  $-16$  ve  $-20^{\circ}\text{C}$ ; 1 saat düşük sıcaklık uygulaması yapılmıştır. Her iki testte de uygulama sıcaklıkları  $4^{\circ}\text{C}$ 'den başlamak üzere  $2^{\circ}\text{C}/\text{s}$  şeklinde azaltılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, genotiplerin dona mukavemet açısından değerlendirilmesinde DTA yöntemi başarısız olarak belirlenirken; iyon sızıntısı

yöntemi etkili bulunmuştur. ‘Bouteillan’ ( $LT_{50}$ :  $-18.2^{\circ}\text{C}$ ) ve ‘Nostrale di Rigali’ ( $LT_{50}$ :  $-18^{\circ}\text{C}$ ) dona dayanıklı çeşitler olarak belirlenirken, ‘Morcona’ çeşidi ( $LT_{50}$ :  $-11.4^{\circ}\text{C}$ ) ve ‘Borsciona’ ( $LT_{50}$ :  $-12.2^{\circ}\text{C}$ ) en hassas çeşitler olarak tespit edilmiştir. Ayrıca görsel değerlendirmeler için, düşük sıcaklık uygulamalarını takiben tüm bitkiler sera koşullarında 5 ay süresince gözlemlenmiştir ve sonuçların iyon sızıntısı testlerinden elde edilen sonuçları desteklediği belirlenmiştir.

Soğuk koşullara uyum sağlamamış ve sağlamış ( $4^{\circ}\text{C}$ 'de 5–12–19 gün) 4 zeytin çeşidinin (Bouteillan, Nostrale di Rigali, Frontoio ve Moraliolo) dona dayanımları araştırılmıştır. Bitkiler Ekim ayından Mart ayına kadar olan süre boyunca don stresine tabi tutulmuştur. Dona dayanım açısından çeşitler arasında net farklılıklar tespit edilmemiştir (Barttolozzi ve ark. 2002).

İran’da ‘Roghani’, ‘Zard’, ‘Mission’ ve ‘Kroneiki’ zeytin çeşitlerinin soğuğa uyum sağladığı (Aralık sonu) ve sağlamadığı (Ekim başı) dönemlerde dona mukavemetleri belirlenmiştir. Yapraklar iyon sızıntısı testleri için sırasıyla 0, -4, -8, ve  $-12^{\circ}\text{C}$  düşük sıcaklık uygulamalarına tabi tutulmuştur. Çeşitler arasında en mukavim çeşit ‘Zard’ olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, araştırmacılar çeşitleri dona mukavemetleri açısından ayırmak için iyon sızıntısı yönteminin etkin olduğunu belirtmişlerdir (Soleimani ve ark. 2004).

İspanya’da yapılan bir araştırmada 9 zeytin çeşidinde (Arbeqiana, Cornicabra, Frantoio, Hojoblanca, Nevadillo de Jaen, Picual, Empeltre, Manzanilla, Cacereria) doğal koşullarda oluşan donlar ve yapay don testleri sonrası oluşan zararlanmaların birbirleriyle durumlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Yapay don uygulamaları sonrası iyon sızıntısı testleri uygulanarak  $LT_{50}$  belirlenmiştir. Doğal koşullar altındaki bitkiler Mayıs ayında değerlendirmeye tabii tutulmuş ve zararlanan/sağlam sürgün oranı yüzde olarak hesaplanmıştır. Çalışmada  $LT_{50}$ ’lerine göre en dayanıklı olarak belirlenen Cornicabra ( $-13.3^{\circ}\text{C}$ ) ve Picual ( $-13.2^{\circ}\text{C}$ ) çeşitlerinin zararlanan sürgün oranı en düşük,  $LT_{50}$ ’lerine göre en hassas olarak belirlenen Empeltre ( $-9.5^{\circ}\text{C}$ ) çeşitinin ise zararlanan sürgün oranı en yüksek olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, zeytinlerin dona mukavemetlerinin belirlenmesine yönelik yapılacak çalışmalarda iyon sızıntısı

yönteminin,  $LT_{50}$ 'yi belirlemek açısından güvenilir bir yöntem olduğu öne sürülmüştür (Barranco ve ark. 2005).

Bölümümüzde Cansev ve ark. (2006, 2007, 2008), 9 zeytin çeşidinde (Manzanilla, Lecquest, Ascolona, Hojoblanca, Domat, Meski, Uslu, Gemlik ve Samanlı) durgun ve aktif büyüme döneminde yapraklarda düşük sıcaklık testlerini takiben elektriksel iletkenliğin ölçülmesi yoluyla zararlanmanın belirlenmesi ve genotiplerin birbiri ile dona mukavemetleri açısından kıyaslanması amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Zeytin ağaçlarının iki yaşlı sürgünlerinden durgun (Ocak) ve aktif (Temmuz) büyüme döneminde toplanan yaprak örnekleri soğuğa dayanıklılığın belirlenmesi amacıyla, kontrollü koşullarda kademeli olarak düşürülen sıcaklıklarda (4, -5, -10 ve -20°C) 12 saat tutularak düşük sıcaklık testleri gerçekleştirilmiştir. Düşük sıcaklık testlerini takiben yaprak örneklerinde hücre membranındaki zararlanma elektriksel iletkenliğin ölçülmesi yoluyla belirlenmiştir. Buna göre çeşitlerin durgun ve aktif büyüme dönemlerindeki düşük sıcaklıklara toleransları ( $LT_{50}$ ) saptanmıştır. Sonuçlara göre, Manzanilla düşük sıcaklık stresine en hassas çeşit, Domat ise en dayanıklı çeşit olarak belirlenmiştir. Diğer çeşitler ise orta derecede dayanıklı olarak saptanmıştır. Çeşitlerin düşük sıcaklıktaki (özellikle -20°C) zararlanma oranları durgun dönemde (Ocak) en dayanıklı ve en hassas çeşitlerde sırasıyla yaklaşık %50 ve %70 olurken, aktif dönemde bu değerler sırasıyla yaklaşık %65 ve %80 olarak belirlenmiştir. Çeşitlerin durgun dönemde  $LT_{50}$ 'leri ortalama -13.6 °C, aktif dönemde ise  $LT_{50}$  ortalama -7.6 °C olarak saptanmıştır.

## **1.2. Düşük Sıcaklığa Dayanım İle Bazı İçsel Faktörler Arasındaki İlişkiler**

Yukarıdaki açıklamaların ışığı altında bitkilerde soğuğa ve dona dayanımda birçok etmenin rol oynadığı ve pekçok içsel faktörün değişimlerinin konu olduğu görülmektedir. Bitkilerde düşük sıcaklıklara dayanım kazanma sürecinde çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal değişimler birçok araştırma ile ortaya konmuştur. Bu biyokimyasal ve fizyolojik değişimler; çeşitli proteinlerin birikimi (Antikainen ve Griffith 1997; Griffith ve ark. 1997), karbonhidrat metabolizmasındaki değişiklikler (Frankow-Lindberg 2001; Hansen ve Beck 1994; Liu ve ark. 1998), membran lipid

kompozisyonundaki değişimler (Bartolozzi ve ark. 2001), doku suyu içeriğinin azalması (Thomashow 1999), hücrelerin serbest radikal temizleme potansiyelinin arttırılması (Guy ve ark. 1992; Thomashow 1999; Baek ve Skinner 2003), ABA konsantrasyonundaki değişimler (Minami ve ark. 2005) ve bazı genlerin üretiminin düzenlenmesi (Pearce 1999; Chen ve ark. 2002) gibi birçok değişik faktörü içermektedir. Bitkilerdeki bu değişimlerin, genel olarak, hücreler arası boşluklarda oluşan don nedeniyle ortaya çıkan dehidrasyona karşı bitki hücrelerini korumaya katkıda buldukları düşünölmektedir.

Bundan sonraki bölümlerde bu içsel faktörler arasından tez konusu ile doğrudan ilişkili olan çözünebilir şekerler, proteinler, dehidrinler ve antioksidant savunma mekanizması konuları ele alınmıştır.

### **1.2.1. Çözünebilir şekerler**

Şeker dona mukavemette en önemli faktörlerden biri olarak düşünölmektedir. Odunsu bitkiler dona mukavemetlerini artırabilmek için sonbahardan kışa kadar olan dönemde suda çözünebilir şekerleri biriktirmektedir (Sakai ve Yoshida 1968). Buğday (Perras ve Sarhab 1984) ve ispanak (Guy ve ark. 1992) gibi otsu bitkilerde de şekerlerin birikimi ile dona mukavemetin artması arasında korelasyon bulunmaktadır. Örneğin, buğday bitkisinde glukoz, sukroz ve toplam şeker miktarlarının dona mukavemetle yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Nitekim buğdayda yapılan çalışmalar dona mukavemetin, çözünebilir karbonhidrat miktarının artış kapasitesi ile yakın ilişkili olduğunu göstermiştir (Öquist ve ark. 1993; Hurry ve ark. 1995; Vágúfalvi ve ark. 1999). Ancak şeker içerikleri yüksek olduğu halde dona mukavemet açısından bir değişikliğin görülmediği bitkilerin de olduğu unutulmamalıdır. Düşük sıcaklıklarda tutulan patatesten veya zaten yüksek oranda şeker içeren şekerkamışında dona çok az mukavemet olduğu ya da hiç mukavemet olmadığı görölmüştür. *Hedera helix*'te (Kaya sarmaşığı) bitkisinde de, şeker içeriği ile mukavemet arasında bir paralellik gözlenmemiştir (Levitt 1980). Bu bilgiler dona dayanım mekanizmasında şekerlerin fizyolojik rolünün net olmadığını ortaya koymaktadır.

Düşük sıcaklık zararından bitkilerin korunması için karbonhidratların üstlendiği fizyolojik ve biyokimyasal roller uzun süredir tartışılmaktadır. Genel olarak şeker, hücre vakuollerinde birikerek hücrenin su tutma kabiliyetini artırmakta ve dolayısıyla donmanın neden olduğu dehidrasyon derecesini azaltmaktadır. Zaten, şeker hücre öz suyu konsantrasyonunu artırıyor o zaman şekerin vakuollerde birikmesi gerekmektedir. Buna karşın eğer metabolize olursa, protoplazmaya geçmesi gerekmektedir. Bu durumu açığa kavuşturmak için, Samiyama ve Simura, çay sürgünlerini 2 gün süreyle 14-18 °C'de, 0.5 ve 0.1 M'lık sukroz solüsyonu (<sup>14</sup>C etiketli) ile muamele edilmiştir. Bu uygulama dona mukavemette, ozmotik konsantrasyonda ve toplam şeker içeriğinde bir artış sağlamıştır. Hücre özsuyunun ozmotik konsantrasyonu %25-30 ve toplam şeker içeriği de %30 oranında artış göstermiştir (Sakai ve Larcher 1987).

Dona dayanım ile suda eriyen karbonhidratların birikimi arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik yapılan araştırmalar; şekerin dona mukavemet mekanizmasında önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Bu durum farklı yaklaşımlarla açıklanmaktadır :

- Ozmotik Etki: Şekerlerin donma ısısını düşürdüğü ve hücre içi ozmotik potansiyeli artırdığı düşünülmektedir. Bu durum hücre dışı donma olayında dehidrasyon miktarını düşürebilmektedir (ozmoregulasyon) (Levitt 1980; Steponkus 1984; Koster ve Lynch 1992).

- Metabolik Etki: Şekerin düşük sıcaklıklarda protoplazmada metabolizasyonu, diğer koruyucu maddeler veya enerji oluşumuna neden olmaktadır (Trunova 1982; Eagles ve ark. 1993).

- Dondan direkt olarak koruyucu etki: Hücreler ve hücre zarları membran stabilitesini destekleyen molekül olarak kullanılmaktadır (Sakai ve Yoshida 1968; Santarius 1973; Lineberger ve Steponkus 1980; Steponkus 1984).

- Şekerler ve şeker alkolleri, ayrıca, hücre membran ve membran proteinleri için elektrolitleri ve donma süresinde biriken toksik bileşikleri seyrelterek kryoprotektan olarak hareket ederler (O'Neill 1983).

- Dehidrasyon stresinde sukrozun hidroksil grupları membranların fosfolipid baş gruplarına hidrojen bağları ile bağlanarak su yerini alabilmektedir (Anchordoguy ve ark.



1987; Crowe ve ark. 1987). Ayrıca, bazı şekerler suyun yokluğunda spesifik enzimlerin (Carpenter ve ark. 1986) ve proteinlerin yapısını ve fonksiyonunu korumaktadırlar (Crowe ve ark. 1987).

Soğuk koşullara dayanıklı bitkilerin hücrelerinde, hassas bitkilere göre, daha fazla tutulmuş su ve suda eriyebilir şekerler bulunmakta, buna karşın serbest su miktarı daha düşük olmaktadır. Serbest su miktarı fazla olan dokular 0°C’de donmaktadır. Şeker gibi maddelerin fazla olması nedeniyle ozmotik olarak tutulan su, antrifriz gibi görev yaparak, dokuların daha düşük sıcaklıklarda donmasını sağlamaktadır. Hücrelerdeki sitoplazma yoğunluğu veya serbest su miktarı dokuların ve organların donma derecesini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle çiçek tomurcuklarının ilkbahar geç donlarından zararlanmaları gelişme safhasıyla ilişkili olmaktadır (Taiz ve Zeiger 2003).

Soğuğa mukavemet kazanma sürecinde odunsu bitkilerde nişasta düşük moleküler ağırlıklı karbonhidratlara hidrolize olarak şekerler birikmektedir. Birçok bitkide nişasta ile çözünebilir karbonhidratlar ve dona dayanım arasında zıt ilişki bulunmaktadır. (Lasheen ve Chaplin 1971; Jennings ve Carmichael 1975; Raese ve ark. 1977; Kaurin ve ark. 1981; Eriş 2003). Tersine, çözünebilir karbonhidratlar arasında ise pozitif korelasyon mevcuttur. Nitekim *Rubus chamaemorus* L. (ahududu)’da çözünebilir karbonhidratlar ile dona dayanım arasında pozitif korelasyon olduğu ifade edilmektedir (Kaurin ve ark. 1981). Başka bir çalışmada da elmanın [(*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* borkh. (Mansf.))] kabuk dokusunda yüksek toplam şeker ve sukroz seviyesi ile dona dayanım arasında pozitif ilişkili bulunmuştur (Raese ve ark. 1977, 1978). Benzer olarak düşük sıcaklıklara dayanıklı şeftali [*Prunus persica* (L.) Batsch] ve kaysı (*Prunus armenica* L.) çeşitlerinin sürgün ve çiçek tomurcuklarında çözünebilir şekerlerin hassas çeşitlere göre daha fazla biriktiği belirlenmiştir (Lasheen ve Chaplin 1971, Tamassy ve Zayan 1982). Yine şeftali çeşitlerinde yapılan diğer çalışmalarda kış periyodunda çözünebilir şekerlerin tomurcuk ve kabukta arttığı belirlenmiştir (Burak 1989; Burak ve Eriş 1992; Marquat ve ark. 1999). Asma’da (*Vitis vinifera* L.) şekerlerin birikimi hem tomurcukların dona dayanımı hem de dinlenme safhası ile ilişkili bulunmuştur (Wample ve Bary 1992).

Birçok çalışmada bitki dokularındaki çözünebilir karbonhidrat kompozisyonunun dona dayanımının artırılması yönündeki etkisinden bahsedilmektedir (Fischer ve Höll 1991). *Ajuga* (mayasilotu), *Forsythia* (altın çanağı) ve *Medicago* (yonca) bitkilerinde rafinozun yazın en düşük, sonbahar ve kış aylarında ise yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir (Bachmann ve ark. 1994; Flinn ve Ashworth 1995; Castonguay ve ark. 1995). Rafinoz ve staçiyoz herdemyeşil olan ibrelilerde soğuk periyotta birikmektedir (Kandler ve Hopf 1982), ve bazı koniferlerde (çamgiller) yapraklardaki rafinoz ve sukroz konsantrasyonu düşük sıcaklıklara tepki olarak artmaktadır (Hinesley ve ark. 1992). *Forsythia* (Altın çanağı) (Flinn ve Asworth 1995), asma (Hamman ve ark. 1996) ve *Lonicera caerulea* L. (Hanımeli) (Imanishi ve ark. 1998) gibi çeşitli türlerde oligosakkarit ailesinin bir üyesi olan rafinoz soğuğa uyum süresinde birikmektedir.

Yıllarca yapılan ölçüm ve araştırmalar sonucunda, genel olarak gerek odunsu gerekse otsu bitkilerde, suda eriyen karbonhidratların sonbahardan kışa doğru arttığı ve ilkbaharda düştüğü vurgulanmıştır. Örneğin, Kışlık buğdayda (*Triticum aestivum*) mevsimsel olarak çözünebilir şekerlerin seyri izlenmiştir. Araştırma sonucunda bu bitkide çözünebilir şekerlerin sonbahardan kışa kadar arttığı, sıcaklıkların yükselmeye başladığı bahar aylarından itibaren ise düştüğü belirlenmiştir (Stupnikova ve ark. 2002).

Palonen (1999), ahududu (*Rubus idaeus*) bitkisinin tomurcuk ve sürgünlerinde soğuğa dayanım ve karbonhidratlar arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Ekimden Nisan ayına kadar tomurcuk ve sürgünlerdeki karbonhidrat içerikleri kontrollü don testlerinden sonra analiz edilmiştir. Araştırma sonucunda hem tomurcuk hem de sürgün dokularında nişasta, sukroz, glukoz, fruktoz ve az miktarda da rafinoz ve staçiyoz belirlenmiştir. Tomurcuklarda kış aylarında glukoz ve fruktoz şekerleri baskın olarak tespit edilirken, sürgünlerde ise kış aylarında tüm şekerler içerisinde sukroz'un tomurcuklardan daha fazla olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda araştırmacı karbonhidratlardaki mevsimsel değişimlerin, soğuğa dayanımdaki değişiklikler ile ilgili olduğunu vurgulamıştır.

Zeytinde yapılan bir çalışmada, İran'da 'Roghani', 'Zard', 'Mission' ve 'Kroneiki' zeytin çeşitlerinin soğuğa uyum sağladığı (Aralık sonu) ve sağlamadığı (Ekim başı) dönemlerde dona mukavemetleri ve çözünebilir karbonhidrat miktarları belirlenmiştir. Tüm çeşitlerin soğuğa uyum sağladığı dönemde çözünebilir karbonhidrat açısından daha zengin olduğu bulunmuştur. (Soleimani ve ark. 2004).

Stres toleransında sukrozdaki değişimlerin fotosentez, taşınım ve solunum gibi fizyolojik olaylarla doğrudan ilişkili olması sebebiyle özel bir önemi vardır. Sukroz, likit-kristal fazda membran fosfolipidlerinin muhafazası için suyun görevini görmekte ve çözünebilir proteinlerin yapısal değişimini önlemektedir (Farrant ve ark. 1993, Leprince ve ark. 1993). Odunsu bitkilerde dona dayanımının artışı ile sukroz arasındaki korelasyonu gösteren çalışmalar mevcuttur (Sauter ve ark. 1996). Parker (1959), altı konifer türünün kabuk ve yapraklarında sonbaharın sonlarından itibaren sukroz, glukoz ve fruktoz konsantrasyonunun arttığını saptamıştır. Gövde ve tomurcuklarda depolanan nişasta düşük sıcaklıklarda önce maltoza daha sonra sukroza dönüşmektedir (Rinne ve ark. 1994). Palonen ve ark. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, soğuğa adapte olmuş 4 ahududu (*Rubus ideaus* L.) çeşidinin sukroz miktarında soğuğa adapte olmamış döneme göre *in vitro* ortamda %124-165, *in vivo* ortamda ise %253-582 oranında artış olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında, bu bitkilerde glukoz ve fruktozun yükseldiği, ancak, bu yükselişin sukrozdaki kadar keskin olmadığı ifade edilmiştir. Deaklimasyon (soğuğa uyumun sona ermesi) uygulamalarında ise şeker miktarlarında hızlı bir azalma gözlenmiştir.

Son yıllarda zeytinde de dona dayanımla sukroz arasındaki ilişkiyi gösteren sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Bartolozzi ve ark. (1999), 6 zeytin genotipinde (Borsciona, Bouteillan, Frantoio, Leccino, Nostre di Rigali, I-79) dona mukavemet ile bazı biyokimyasal parametreler arasındaki bağlantıyı mevsimsel olarak incelemişlerdir. Genotiplerde don testleri sonucu biyokimyasal değişimleri incelemek için her genotipe ait sürgünlerin sıcaklıkları 4°C'den -16 °C'ye 4 °C/s hızla düşürülmüş ve takiben sürgünler -16 °C'de 1 saat düşük sıcaklığa tabii tutulmuştur. Çalışma sonucunda glukozun, sukrozun ve

galaktozun zeytin yapraklarında en önemli çözünebilir şekerler olduğu saptanırken, rafinoz, fruktoz, trehaloz ve ksiloz yalnızca eser miktarda belirlenmiştir. Tüm genotipler arasında dona tolerant olan Leccino, Bouteillan ve Nostre di Rigali çeşitlerinde sukroz miktarı Şubat-Mart aylarında üç kat artmıştır. Bu tarihler arasında deneme yapılan bölgede en soğuk günler yaşanmıştır. Diğer genotiplerde de bu tarihler arasında dona tolerant çeşitler kadar olmasa da sukrozda artış saptanmıştır.

Bartolozzi ve ark. (2001), *in vitro* cv. Maraiolo zeytin sürgünlerinde soğuğa uyum sağlayan ve sağlamayan bitkilerde zararlanmaları ve sukrozun etkisini araştırmıştır. Soğuğa uyum sağlayan sürgünler  $-15^{\circ}\text{C}$ 'de zararlanırken, soğuğa uyum sağlamamış sürgünlerde  $-10^{\circ}\text{C}$ 'de zararlanma olmuştur. Yüzde altı sukroz uygulaması hem soğuğa uyum sağlamış hem de uyum sağlamamış sürgünlerde dona dayanımı artırmıştır.

Bartolozzi ve ark. (2002), soğuk koşullara uyum sağlamamış ve sağlamış ( $4^{\circ}\text{C}$ 'de 5–12–19 gün) 4 zeytin çeşidinin (Bouteillan, Nostrale di Rigali, Frontoio ve Moraliolo) dona dayanımlarını ve sukrozun mevsimsel değişimini incelemiştir. Bitkiler, Ekim ayından Mart ayına kadar olan süre boyunca don stresine tabi tutulmuştur. Dona dayanım açısından çeşitler arasında net farklılıklar tespit edilememiştir. Sukroz seviyeleri açısından değerlendirildiğinde ise, kış aylarında dona mukavemet kazanmış bitkilerin sukroz seviyelerinde belirgin artışlar belirlenmiştir.

Rejšková ve ark. (2007), *in vitro* ortamda Picual zeytin çeşidi sürgünlerinde düşük sıcaklık uygulamaları ( $0$  ve  $4^{\circ}\text{C}$ ) ile toplam çözünebilir karbonhidrat ve sukroz miktarlarında artış olduğunu tespit etmişlerdir.

Dona dayanımda çözünebilir şekerlerin destekleyici rollerini gösterecek genetik çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, *Arabidopsis* bitkisinin *sfr4* mutantında (soğuğa uyum sağlama kabiliyetini yitirmiş, düşük sıcaklıklara hassas), düşük sıcaklıklarda çözünebilir şeker miktarları (sukroz, glukoz) değişmez iken (McKown ve ark. 1996), bunun aksine, *esk1* mutantında (düşük sıcaklıklara dayanıklı) düşük sıcaklık koşullarında şeker birikiminin arttığı belirlenmiştir (Xin ve Browse 2000). Bununla beraber, şekerlerin

dona dayanımı sağlamak için tek başına yeterli olmadığı vurgulanmıştır. Normal olarak soğuğa uyum süresince şeker akümüle eden *sfr* mutantlarının, dona dayanım kazanamadıkları ifade edilmektedir. Bakteriyel pirofosfataz veya invertaz geni aktarılan tütün bitkisinde şeker birikimi olduğu belirlenmiştir ancak bu durumun dona tolerans açısından herhangi bir etkisinin olmadığı ifade edilmiştir (Hincha ve ark. 1996).

### 1.2.2. Çözünabilir proteinler

Çözünabilir proteinler ile dona mukavemet arasındaki ilişki ilk olarak Siminovitch ve Briggs (1949) tarafından akasya bitkisinde yürütülen bir çalışma ile gösterilmiştir. Bu bitkide kabuk dokularında sonbahar ayından itibaren çözünabilir proteinlerin artışının dona mukavemetin artışı ile paralel olduğu ifade edilmiştir (Siminovitch ve Briggs 1953). Kış boyunca proteinlerin yüksek seviyelerde kaldığı ancak bahar aylarının başlangıcı ile hızla düştüğü belirlenmiştir (Sakai ve Yoshida 1968; Pomeroy ve ark. 1970). Çözünabilir proteinlerdeki bu düşüşün dona mukavemetin azalması ile ilişkili olabileceği yargısına varılmıştır (Siminovitch ve ark. 1968). Ardı ardına yapılan bu çalışmalar bu konuda ilk elde edilen veriler olmuştur. Levitt (1980), eriyebilir proteinlerdeki artışın mukavemeti artırabileceğini ileri sürmüştür. İstisnai durumlar da söz konusu olmasına rağmen (Toman ve Mitchell 1968), çözünabilir proteinlerdeki artışın bitkilerde soğuğa uyum süresince ortaya çıkan mekanizmalardan biri olduğu genel olarak kabul edilmektedir (Thomashow 1999).

Çözünabilir proteinlerdeki artış, glisinin suda eriyebilir proteinlere dahil olmasından dolayıdır. Guy (1990), dona uyum sürecinde çözünabilir proteinlerde gerçekleşen bu artışın düşük sıcaklıklarda teşvik edilen enzim artışlarından kaynaklanabileceğini belirtmiştir. Görevleri tam olarak bilinmese de soğukla teşvik edilen proteinlerin hidrofilik olmaları ve yüksek ısıda eriyebilir kalmaları koruyucu rollerine büyük katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (Guy ve Haskell 1989).

Sonbaharda senesens (yaşlanma) sırasında yaprak proteinlerinden türettiği varsayılan azotlu maddeler kabuğa iletilerek burada depo proteinleri olarak sentezlenmektedirler. İlkbaharda bu proteinler yıkılarak sürgünlerin başlangıç

büyümlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca depo proteinlerinin bir bölümünün de bitkide biyotik ve abiyotik streslere karşı kullanıldığı düşünülmektedir. Bu proteinler genel olarak kabuk parankima hücrelerinin ve ksilem hücrelerinin protein depo vakuollerinde biriktirilmektedir (Rowland ve Arora 1997; Eriş 2003; Wisniewski ve ark. 2004).

Kantitatif ölçüme dayanan bir çok çalışmanın ardından, elektroforotik yöntemlerin gelişmesi sayesinde soğuğa uyum sağlamış ve sağlamamış bitkilerde ayrıca proteinlerin kalitatif değişimleri de belirlenebilmiştir (Craker ve ark. 1969; Davis ve Gilbert 1970; Faw ve Jung 1972; Faw ve ark. 1976; Rosas ve ark. 1986). Bu çalışmaların çoğunluğu soğuğa uyum sağlamış bitkilerde yeni tip proteinlerin sentezlendiğini ve bu proteinlerin soğuğa uyum sağlamamış bitkilerde mevcut olmadığını göstermiştir. Örneğin, Uemura ve Yoshida (1984), çeltikte (*Secale cereale* L.) soğuğa uyum sağlamış plazma membranlarında 20 den fazla proteinin azaldığını veya kaybolduğunu, mevcut 11 proteinin arttığını, 26 proteinin ise yeni sentezlendiğini belirlemişlerdir. Yine başka bir çalışmada, Durham ve ark. (1991) soğuğa hassas bir tür olan altıntop (*Citrus grandis*)'da soğuğa uyum sağlamış bitkilerde 160 kDa proteinin sentezlendiğini ve bu proteinin uyum sağlamamış bitkilerde mevcut olmadığını tespit etmişlerdir. Bu protein ayrıca portakal (*Citrus sinensis*) ve ıspanakda da belirlenmiştir (Guy ve ark. 1988). Herdemyeşil bir tür olan zakkumda (*Nerium oleander* L.) soğuğa uyum sağlamış bitkilerin yaprak ve kabuklarında 38 kDa ağırlığında yeni bir proteinin sentezlendiği ve bu proteinin soğuğa uyum sağlamamış bitkilerde mevcut olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca tespit edilen 38 kDa ağırlığındaki bir proteinin düşük sıcaklık uygulamaları (0, -2, -4, -6, -8 °C; 2'şer saat) ile sentezinin arttığı belirlenmiştir (Syros ve ark. 2005). Soğuğa uyum sağlamış ve sağlamamış dokular karşılaştırıldığında uyum sağlamış dokularda protein içeriğindeki artış çok belirgin olmasa dahi minör bantlarda mutlak suretle değişimler belirlenmiştir.

Şeftali bitkisinde (*Prunus persica* (L.) Batsch) yıllık sürgün, 1- yaşlı sürgün ve köklerde 60, 19 ve 16 kDa moleküler ağırlığında 3 proteinin kabuklarda kış mevsiminde biriktiği belirlenmiştir. 16 kDa ağırlığındaki protein yalnızca yıllık sürgünlerde tespit edilirken, 19 kDa ağırlığındaki protein tüm dokularda saptanmıştır. 60 kDa ağırlığındaki protein ise köklerde bulunamamıştır. Bu 3 proteinin amino asit dizinleri belirlendiğinde,

60 kDa'un bir dehidrin proteini ve 19 kDa'un patojenlerle ilişkili bir protein olduğu tespit edilmiştir. 16 kDa moleküler ağırlığındaki protein ise herhangi bir homologu bulunamamıştır. Bu durumda araştırmacılar 16 kDa'un bir kabuk depo proteini olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Artlip ve ark. 1997; Wisniewski ve ark. 2004).

Bitkilerde düşük sıcaklıklarla ilişkili proteinlerde bir örnekliklik sözkonusu değildir. Bu durum soğuga uyum ile ilgili proteinlerin yüksek korunmuş özelliğe sahip yüksek sıcaklık şoku (heat-shock) proteinleri gibi olmadığını göstermektedir. Soğukaklimasyonu ile ilgili sentezlenen proteinlerin karakteristik özelliği geçici olmalarıdır, halbuki diğer protein tipleri daha stabildir ve sentezlenmeleri haftalar almaktadır (Guy ve Haskell 1987).

Herdemyeşil bitkiler tam olarak dinlenmeye girmedikleri için kabuklarda kortikal hücresi depo proteinlere ihtiyaç duymamaktadırlar. Bir araştırmada herdem yeşil bir tür olan kızıl çam bitkisinin yaprak ve kabuklarında kış ayları boyunca çözünebilir proteinlerin arttığı belirlenmiş ve bu artışın bitkinin dona mukavemeti ile paralel olduğu tespit edilmiştir (Pomeroy ve ark. 1970). Bu durum kabuk depo proteinleri dışında düşük sıcaklıklarla ilgili başka proteinlerin sentezlendiğini işaret etmektedir.

Yaprağını döken ve herdemyeşil şeftali genotiplerinin düşük sıcaklık toleransları ve bu toleransın proteinlerle olan ilişkisi mevsimsel olarak ayrıntılı biçimde incelenmiştir (Arora ve ark. 1992,1996). Dinlenmeye giren ve yaprağını döken tiplerinin aksine, herdemyeşil şeftali tipleri uygun çevresel koşullar olduğu sürece sürgün uzamalarını sürdürmektedirler. Çalışmada her iki tipte de sonbaharda dona mukavemetin arttığı ve bahardan itibaren azaldığı tespit edilmiştir. Ancak yaprağını döken tipin dona mukavemetinin herdemyeşil tipe göre yaklaşık iki kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Her iki genotipin de toplam çözünebilir protein miktarları sonbaharda artmaya başlamış, kış aylarında maksimuma ulaşmış ve daha sonra düşüş seyrine girmiştir. Jel-elektroforez çalışmaları, yaprağını döken ve herdemyeşil genotiplerin kabuklarında 19 kDa moleküler ağırlığındaki proteinin kış aylarında biriktiğini, ancak yaprağını döken genotipte birikim miktarının daha fazla olduğunu

göstermiştir. Yine 19 kDa ağırlığındaki kabuk proteinlerinin yaprağını döken şeftali yapraklarında kışa doğru kaybolduğu, ancak kabukta yüksek miktarlarda biriktiği belirlenmiştir. Bu birbirine zıt ilişki herdemyeşil şeftalilerde görülmemiştir. Ayrıca 60 kDa ve 30 kDa moleküler ağırlığındaki proteinlerin yalnızca yaprağını döken türlerde biriktiği belirlenmiştir.

İtalya’ da Bartolini ve ark. (1999) Leccino zeytin çeşidinin iki klonunda (Klon 4 ve Klon 18) düşük sıcaklık uygulamaları sonucu çözünebilir proteinlerdeki değişimleri incelemiştir. Aynı araştırmacılar daha önce yürüttükleri çalışmalarında klon 4’ü düşük sıcaklıklara tolerant, klon 18’i ise hassas bir çeşit olarak belirlemiştir. Araştırma sonuçlarına göre, düşük sıcaklık uygulamalarından sonra çözünebilir proteinler açısından iki zeytin klonu arasında net farklılıklar belirlenememiştir.

Bartolozzi ve ark. (1999), 6 zeytin genotipinde (Borsciona, Bouteillan, Frantoio, Leccino, Nostre di Rigali, I-79) 21 kDa, 30 kDa ve 43 kDa ağırlıklarındaki proteinlerin kış aylarında daha fazla sentezlendiğini saptamışlardır.

Görüldüğü gibi çeşitli bitkilerde çözünebilir proteinlerin mevsimsel değişimi üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Fakat zeytinde çözünebilir proteinlerin mevsimsel değişimi ve bu proteinlerin dona dayanımla olan ilişkileri konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu konuda özellikle spesifik proteinlerin dona dayanımdaki rolleri yönünden daha detaylı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

### **1.2.2.1. Dehidrinler**

Son on yılda, bitkilerde düşük sıcaklıklara dayanım kazanma sürecinde ve düşük negatif sıcaklıklara maruz kaldığı durumlarda birikim gösteren ve hücre fonksiyonlarının korunmasında rol oynadığı düşünülen özelleşmiş bitki proteinleri tanımlanmıştır. Bu proteinler genel olarak COR (cold-responsive) ya da dehidrin (düşük negatif sıcaklıklarla birlikte dehidrate olan hücreler tarafından teşvik edilen proteinler) olarak adlandırılmaktadır. Bu proteinler bitki türleri önemli olmaksızın birçok benzer özellikler ve yapıya sahiptirler (Arora ve ark. 2002).



Bitki proteinlerinin bir grubu olan dehidrinler, hücrel dehidrasyonlarla sonuçlanan kuraklık, düşük sıcaklık, tuzluluk gibi çevresel streslere karşı tepki olarak oluşan proteinlerdir (Close 1997). Bunun yanında dışsal ABA uygulamalarının da bazı dehidrin yazılımlarını ve proteinleri teşvik ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Artlip ve ark. 1997). Dehidrinler temelde LEA (late embryogenesis abundant grubu) olarak tanımlanan proteinlerdir. Bu protein grubu, yüksek bitkiler, algler, maya ve siyonabakteriler gibi birçok organizmada mevcuttur (Borovskii ve ark. 2002; Rorat ve ark. 2006). Dehidrinler glisince zengin, triptofan ve sisteinden fakirdirler ve 100°C'de eriyebilir halde kalabilirler. Bunlara ilaveten, dehidrinler karboksil terminallerinde lizince zengin amino asit sekansları taşımaları ile karakterize edilebilirler (Panta ve ark. 2001). Ayrıca dehidrinler, karboksil terminalinin bitişiğinde yer alan ve terminalin üst kısmında ilave kopyaları da bulunan 15 amino asitlik, hatta birçok durumda hafifçe modifiye olmuş 14 amino asitten oluşan ve 'K-segmenti' olarak da bilinen bir konsensus amino asit sekansı (EKKGIMDKIKEKLP) ile karakterize edilmektedir (Close 1996, Marian ve ark. 2003). Bu amino asit dizinleri polipeptid boyunca sık sık tekrarlanmış olarak bulunmuştur. Bu yapı proteinlerin moleküler şaperon (chaperon) sınıfı ile benzerlikler göstermektedir (Panta ve ark. 2001). Birçok dehidrin aynı zamanda bir dizi serin kalıntısı içermektedir. Bu da 'S-segmenti' olarak adlandırılmaktadır. Bir çoğu ayrıca amino terminalinin yanında bir ya da birden fazla Y-segmenti (konsensus sekansı: {V/T}DEYGNP) içermektedir. Amino-terminal bölgesi içinde ve K segmentleri arasında daha az korunan dizinler bulunmaktadır. Bunlar bazen değişken glisin ve treonin kalıntıları içeren glisince zengin dizinlerden ibarettirler. Diğer dizinlerin en önemli özelliği hidrofilitik olması, yüklü ve polar amino asitler içermesidir. Y ve K segmentlerinin tekrar sayıları ve diğer dizin özelliklerinin varlığı ya da yokluğu dehidrinler arasındaki farklılığı ortaya koymaktadır (Pearce 1999).

Tüm dehidrin proteinlerinde görülen K segmentinin, makromolekülleri ve hücre içi yapıları korumaya yardımcı olan bir amfipatik  $\alpha$ -heliks oluşturduğu tahmin edilmektedir. Serin segmentinin varlığı sinyal polipeptitlerinin bağlanması ile ilişkili olabilen muhtemel bir fosforilasyon bölgesidir. Y segmentlerinin şaperonların nükleotid bağlanma bölgesinin bir kısmı ile dizin benzerliği bulunmaktadır (Pearce 1999).

Dehidlerin düşük sıcaklık ya da diğer stres tiplerindeki görevleri henüz tam olarak anlaşılamamasına rağmen, Close (1997) bunu ‘hariç bırakma (exclusion) teorisi’ ile açıklamaya çalışmıştır. Temel olarak, olağanüstü dehidrasyon koşulları altında makromolekülleri (örn. nükleik asitler ve proteinler) su tabakası ile çevreleyerek koagüle olmalarını veya kuru ortamlarda hidrolitik enzimlerin bozulmasını önlediği düşünülmektedir (Borovskii ve ark. 2002). Ayrıca dehidrin proteinin yapısı ve hücreyel yerleşimi, dehidratif koşullarda hücreyel membranların bozulmasını önlediği görüşünün öne sürülmesine neden olmuştur (Welling ve ark. 2002). Birçok odunsu bitkide dehidrin proteinleri ve bu proteinlerin transkriptleri düşük sıcaklıklara uyum sağlama sürecinde mevsimsel olarak kabuklarda, ksilemde, tomurcuklarda ve sürgün ucunda birikmektedir (Arora ve Wisniewski 1994; Muthalif ve Rowland 1994; Salzman ve ark. 1996; Artlip ve ark. 1997; Marian ve ark. 2003).

Dehidrinler ile ilgili çalışmalar yaygın olarak otsu bitkilerde yürütülmüş olsa da son yıllarda odunsu bitkilerde de çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin, *Prunus Persica* (şeftali) (Arora ve Wisniewski 1994), *Vaccinium* (yaban mersini) türleri (Muthalif ve Rowland 1994), *Malus domestica* (elma) (Wisniewski ve ark. 1996), *Populus* (kavak) türleri (Pelah ve ark. 1997), *Betula pubescens* (kuzgun huş ağacı) (Rinne ve ark. 1994), *Salix caprea* (keçi söğüdü) (Sauter ve ark. 1999) ve *Rhododendron* (orman gülü) türleri (Lim ve ark. 1999) üzerinde çalışmalar mevcuttur. Bu bitkilerin kış aylarında ya da düşük sıcaklık stresi koşullarında dehidrin seviyelerindeki değişimler incelenmiştir. Dehidrin proteinleri *Prunus persica*’da sitoplazma, plastidler ve nukleusta (Wisniewski ve ark. 1999), *Betula pubescens*’de nukleus ve aminoplastlarda (Rinne ve ark. 1999) olduğu gibi hücre içi yapılara dağılmışlardır. Borovskii ve ark. (2002), hücre içinde bu protein grubunun genel olarak nukleus, sitoplazma, mitokondri ve plazma membranında bulunduğunu belirtmektedir. Odunsu bitkilerde dehidrinler için *Vaccinium* (Levi ve ark. 1999), *Picea glauca* (Richard ve ark. 2000), *Prunus persica*, *Citrus unshiu* (mandarin) (Hara ve ark. 2001) türlerinde moleküler biyolojik çalışmalar yapılmıştır. Bu bitki türlerinde düşük sıcaklık veya kuraklık stresi koşullarında dehidrinler birikmektedir. *Picea glauca* (ladin) bitkisinde dehidrinlerin birikimi yalnızca kuraklık ya da düşük sıcaklık koşullarında değil, aynı zamanda yaralanma, etilen, jasmonik asit ve metil jasmonit uygulamaları ile de teşvik edildiği belirlenmiştir. Bu durum odunsu bitkilerde

dehidrin genlerinin üretilmesinin karmaşık düzenleme mekanizmalarına bağlı olabileceğini göstermektedir. *Prunus* dehidrini donmayı engelleme (antifreeze) özelliği gösterirken (Wisniewski ve ark. 1999), *Betula* dehidrini polietilen glikolde  $\alpha$ -amilaz aktivitesini artırmıştır (Rinne ve ark. 1999). Bu yöndeki *in vitro* çalışmalar aynı zamanda dehidrinlerin *in vivo* ortamlarda enzimleri koruduğuna işaret etmektedir.

Dehidrin proteinlerinin düşük sıcaklığa dayanımdaki rolleri üzerine yapılan çalışmalarda genel olarak dehidrinlerin düşük sıcaklık uygulamalarına göre değişimi (Hara ve ark. 2001), çeşit seçiminde seleksiyon belirteci olarak bir dehidrin proteinin aranması (Giorni ve ark. 1999), farklı fotoperiyod rejimlerine göre dehidrinlerin durumu (Marian ve ark. 2004), mevsimlere göre dehidrinlerin değişimleri (Muthalif ve Rowland 1994), dehidrinlerin bitkide buldukları organlar (Rorat ve ark. 2006) ve hücre içinde sentezlendikleri yerler (Borovskii ve ark. 2002) konuları ele alınmıştır.

Yukarıda bahsedilen araştırma konularının hemen hemen hepsini kapsayan ayrıntılı çalışmalar yaban mersini üzerinde yapılmıştır. Buna göre, yaban mersininde (*Vaccinium corymbosum* Linn.) çiçek tomurcuklarında 65, 60 ve 14 kDa moleküler ağırlığındaki dehidrin proteinlerinin birikiminin düşük sıcaklıklarda değişim gösterdiği belirlenmiştir. Söz konusu bu proteinler soğuğa uyum ile artmış, bunu takiben soğuğa uyumun bitişi ve büyüme periyodunun başlaması ile azalmıştır (Muthalif ve Rowland 1994; Arora ve ark. 1997, 1998). Bu çalışmaların ışığı altında Panta ve ark. (2001), yaban mersininin 3 genotipinde düşük sıcaklık (4 °C) ve kuraklık koşullarında dehidrin proteinlerin yaprak, gövde ve kök gibi organlardaki birikimini SDS-PAGE ve bunu takiben immunoblotting yöntemleri kullanarak araştırmışlardır. Çalışma sonucunda dehidrinlerin bitkide hem düşük sıcaklık koşullarında hem de kurak koşullarda biriktiği tespit edilmiştir. Ancak dehidrin proteininin moleküler ağırlığı çeşitlere bağlı olarak değişmiştir. Dehidrinler düşük sıcaklıkta gövde ve köklerde yapraklara göre daha fazla, kurak koşullarda ise gövdede kök ve yapraktan daha fazla birikmiştir. Düşük sıcaklık ve karanlık uygulaması ile dehidrinler, düşük sıcaklık ve uzun gün koşulu uygulamasına göre daha fazla birikmiştir. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak dehidrinlerin fotoperiyoda duyarlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Düşük sıcaklık uygulamasında her

üç genotipte de dehidrinlerin birikim seviyesinin, bitkinin düşük sıcaklıklara mukavemeti ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Dehidrinlerle ilgili araştırmalarda tahıllar en yaygın çalışılan bitki grubudur. Crosatti ve ark. (1996)'nın, arpa (*Hordeum vulgare* L.) genotiplerinde yaptıkları bir çalışmada, düşük sıcaklık uygulamaları sonrası dayanıklı çeşitlerin soğuğa hassas çeşitlere göre COR75 proteinini daha hızlı biriktirdiklerini belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada, düşük sıcaklıklara dayanıklı kışlık arpa çeşitlerinde yüksek oranda COR14 proteini birikirken, dayanıksız bahar çeşitlerinde bu proteinlerde tutarsızlık saptanmıştır. Araştırmacılar COR14 proteininin yüksek birikim kapasitesine sahip arpa çeşitlerinde soğuğa dayanım açısından iyi bir seleksiyon belirteci (markör) olabileceğini belirtmişlerdir (Giorni ve ark. 1999). Yine arpada, Dhn5 ve P-80 dehidrin proteinlerinin makromolekülleri ve dona hassas yapıları don zararına karşı koruduğu düşünülmektedir. P-80'nin yaprak ve gövdenin epidermis tabakasında ve vasküler silindirin çevresinde yerleşmiş olduğu tespit edilmiştir (Bravo ve ark. 2003).

Borovskii ve ark. (2002), kışlık buğday, pirinç ve mısırdaki 5 farklı moleküler ağırlıkta dehidrin proteini tespit etmişlerdir. Bu proteinlerden 52 kDa ve 63 kDa dehidrin proteinlerinin ısıya dayanıklı (thermo-stable) olduğu belirlenmiştir. 63 kDa dehidrin proteini, her üç türün mitokondrisinde de kuraklık, don, soğuk ve dışsal ABA uygulamalarıyla artış göstermiştir. 52 kDa proteini ise soğuğa uyum süresince ve ABA uygulaması ile artmıştır. Tespit edilen diğer 3 polipeptidin ise ısıya duyarlı (heat-sensitive) olduğu saptanmış ve üç uygulama ile (düşük sıcaklık, kuraklık ve dışsal ABA) ya çok az biriktiği ya da hiç değişmediği tespit edilmiştir.

Kışlık buğdayda (*Triticum aestivum*) mevsimsel olarak dehidrinlerin seyri izlenmiştir (Stupnikova ve ark. 2002, 2004). Araştırma sonucunda bitkinin adaptasyon sürecinde (Ekim'den Ocak'a kadar) 209, 196, 66, 50 ve 41 kDa ağırlığındaki proteinlerin, kış ayında (Ocak) ise, 24, 22, 17, 15 ve 12 kDa ağırlığındaki dehidrin-benzeri proteinlerin sentezlendiği ve biriktiği saptanmıştır. Bu proteinlerin seviyeleri bahar aylarında bitkinin dona mukavemetinin düşmesine paralel olarak keskin bir şekilde azalmıştır. Çalışma sonucunda, düşük moleküler ağırlığa sahip dehidrin

proteinlerinin düşük sıcaklık adaptasyonunun ikinci safhası ile ilişkili olduğu ve çok düşük sıcaklıklarda hücre yapısının korunmasında rolü olabileceği vurgulanmıştır.

Günümüze kadar zeytinde dehidrin proteinleri ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle burada zeytin bitkisine fizyolojik açıdan yakın olduğu düşünülen herdemyeşil türlerde yapılan araştırmalar sunulmuştur.

Herdemyeşil bir tür olan mandarinde (*Citrus unshiu*) düşük sıcaklıklarda rol oynadığı belirlenen dehidrin proteini (CuCOR19) ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan bir tanesinde *C. unshiu* düşük sıcaklık (4°C), NaCl (50-200 mmol/L) ve ABA (0.1-10 µmol/L) uygulamalarına tabii tutulmuştur. Düşük sıcaklık uygulaması ile CuCOR19 proteininin birikimi önemli oranda artarken, diğer uygulamalarda çok az bir değişim gözlenmiştir. Araştırmacılar bu proteinin yalnızca düşük sıcaklık uygulaması sonucu artmasını mandarin yapraklarında dehidrin üretimi için düşük sıcaklıkların kritik bir öneme sahip olması ile açıklamışlardır (Hara ve ark. 2001).

Artlip ve ark. (1997), yaprağını döken ve herdemyeşil şeftali genotiplerin (*Prunus persica* [L.] Batsch) mevsimsel olarak soğuğa uyum kapasitelerini ve dehidrin proteinin değişimini belirlemeye çalışmışlardır. Her iki genotipte de bu proteinin üretiminin en fazla kış aylarında, en az da Mayıs-Temmuz ayları arasında olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında herdemyeşil olan genotipte (daha düşük sıcaklık toleransına sahip) yazılım seviyesi diğer genotipe göre daha geride kalmıştır. Araştırmacılar bu durumu soğuğa uyum süresince dehidrin proteinin değişik düzenleme seviyelerine sahip olması ile açıklamışlardır.

Finladiya'da bir grup araştırmacı tarafından herdemyeşil bir bitki olan İskoç çamında (*Pinus sylvestris* L.), aylık periyodlar halinde yaprak, kabuk ve tomurcuklarda dehidrin proteinlerinin değişimleri incelenmiştir. Tüm dokularda immunolojik olarak 60 ve 56 kDa ağırlıklarında dehidrin proteinleri tespit edilmiştir. 60 kDa dehidrin proteini tomurcuk ve kabukta en yoğun olarak kış aylarında (Ekim-Şubat) saptanırken, yapraklarda ilkbaharın başlangıcında (Mart-Mayıs) artış belirlenmiştir. Araştırmacılar, bu

proteinin bahar aylarında yaprakta artmasının yaprakta düşen ozmotik basınçla ilişkili olabileceğini ifade etmişlerdir (Kontunen-Soppela ve Laine 2003).

Herdemyeşil bir bitki olan *Rhododendron* cv. *Chionodies*'de 25 kDa dehidrin proteininin birikimi ve soğuk-aklimasyonu üzerine gün uzunluğunun ve sıcaklığın etkisi Eylül-Ocak ayları arasında incelenmiştir (Marian ve ark. 2003,2004). Denemede bitkilere 4 farklı sıcaklık ve fotoperiyod rejimi uygulanmıştır. Bu uygulamalar 1)-dış koşullar ve doğal fotoperiyod (kısa gün) 2)-dış koşullar ve uzun gün 3)-sera ve doğal fotoperiyod (kısa gün) 4)-sera ve uzun gün şeklinde gerçekleştirilmiştir. Düşük sıcaklıklara mukavemet ve 25 kDa birikiminin en fazla kısa gün/düşük sıcaklık kombinasyonu ile teşvik edilirken, uzun gün ve oransal olarak daha yüksek sıcaklık koşullarına maruz bırakılan bitkilerin yapraklarında düşük sıcaklıklara mukavemet belirgin olarak artmamıştır. Kısa gün koşulları hem soğuğa uyumun ilk safhasını hem de 25 kDa dehidrin proteininin birikimini tetiklemek için yeterli olmuştur. Ayrıca çalışmada dış koşullarda yetiştirilen bitkilerin yaprak oransal su kapsamının serada yetiştirilen bitkilerdekine göre daha az olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar 25 kDa dehidrin proteininin soğuğa uyumun erken safhasında artmaya başlamasını kısa gün koşullarında doku dehidrasyonunun daha fazla olması ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. 26 kDa ve 32 kDa moleküler ağırlığındaki diğer iki dehidrin proteini ise, kısa günle ilişkili bulunmamış ancak 20 kDa ağırlığındaki protein daha sonraki aylarda sıcaklıkların düşmesine paralel olarak artmaya başlamıştır. Buna göre *Rhododendron* cv. *Chionodies* yapraklarında 26 kDa ve 32 kDa ağırlığındaki proteinlerin birikiminin fotoperiyottan bağımsız olduğu ve yalnızca düşük sıcaklıklar tarafından teşvik edildiği görüşü öne sürülmüştür.

Bu çalışmaların yanında düşük sıcaklıklara tepki veren genlerin izolasyonu ile soğuğa dayanımın anlaşılmasında yeni bir çığır açılmıştır (Pearce ve ark. 1996). Örneğin, *Arabidopsis* bitkisi üzerinde yapılan bazı çalışmalar dehidrin genleri ile düşük sıcaklık toleransı arasındaki ilişkiyi kanıtlar niteliktedir. Bu çalışmalardan bir tanesinde araştırmacılar soğukla düzenlenen (cold-regulated), diğer ismiyle COR genlerinin teşvikinden sorumlu *CBF1* düzenleyici genlerini izole etmişleridir. Bu araştırmacılar *CBF1* genini fazla üretilmesi amacıyla yeniden yapılandırarak, düşük sıcaklık ve kuraklık

stresi olmayan durumlarda dahi COR geninin üretiminin arttığı genetiği değiştirilmiş bitkiler geliştirmişlerdir. Soğuğa mukavemet aşamasını yaşamadan *CBF1* geninin aktive olduğu bu transgenik bitkilerin, soğuğa mukavemet kazanmamış kontrol bitkilerine göre daha fazla, soğuğa mukavemet sağlayan bitkilere göre ise aynı oranda dona dayanım gösterdikleri tespit edilmiştir (Jaglo-Ottosen ve ark. 1998).

### 1.2.3. Antioksidant savunma mekanizması

Normal koşullarda belirli bir seviyeye kadar hücrelerde oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) organizmalarda sinyalizasyonda görev almaktadırlar. Ancak ROS'un normalden fazla üretilmesi veya bu üretilen reaktif oksijen türlerinin aktivasyonunun engellenememesi durumunda bitkilerde zararlanmalar meydana gelmekte ve hatta hücrel ölüm oluşmaktadır (Bowler ve ark. 1992; Apel ve Hirt 1999; Lee ve Lee 2000; Baek ve Skinner 2003; Foyer ve Noctor 2005; Suzuki ve Mittler 2006).

Bitkilerde düşük sıcaklık stresi sonucunda artan ROS bitki hücrelerine zarar vermektedir. Mitokondri ve kloroplastta elektron taşınım sisteminde superoksit ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikalleri (OH) ve singlet oksijen ( $O_2^1$ ) gibi ROS formları oluşmaktadır. Bu formlar oldukça toksik olup DNA, RNA, protein ve lipidler gibi önemli hücrel yapılara zarar vermektedir (Tao ve ark. 1998; Lee ve Lee 2000; Baek ve Skinner 2003; Janda ve ark. 2003; Mahajan ve Tuteja 2005; Pennycooke ve ark. 2005; Johnston ve ark. 2007). OH doğada en fazla bulunan reaktif radikallerinden biridir ve don zararını oluşturan etkenlerden biri olarak düşünülmektedir (Johnston ve ark. 2007). Anderson ve ark. (1995), mısır bitkisinde soğuğa adapte olmuş fidelerdeki düşük sıcaklık zararının ROS'ların artması sonucu oluşabileceğini belirterek, soğuğa adapte olmuş fidelerin antioksidant sistemlerinin uyarılması nedeniyle soğuğa daha toleranslı olduklarını ortaya koymuşlardır.

Bitkiler ROS'ları kontrol edebilmek için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidant sistemler geliştirmişlerdir. Tüm bitki türleri için özellikle de stres koşullarında antioksidant sistemlerinin düzenlemesi ile ROS'ların konsantrasyonlarındaki değişimler hayati önem taşımaktadır. ROS'lar hem hücreler için

toksik bileşiklerdir hem de stres toleransının teşvikinde aracı olarak hareket etmektedir. (Tao ve ark. 1998; Janda ve ark. 2003). Antioksidantlar 3 sınıfa ayrılabilir: 1) lipid çözünebilir ve membranlarla ilişkili tokofenoller, 2) askorbik asit ve glutatyon gibi suda çözünebilir indirgeyiciler, 3) superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (PRX), askorbat peroksidaz (APRX) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidant enzimler. Bu bileşiklerin ve enzimlerin yüksek aktivitesinin bitkilerin abiyotik stres toleransını artırabileceği düşünülmektedir (Bowler ve ark. 1992; McKersie ve ark. 1993; Lee ve Lee 2000). Allen (1995)'a göre stres koşulları altında bitkiler genellikle bir ya da daha fazla antioksidant enzim aktivitesini artırarak stres toleransı geliştirmektedirler.

### 1.2.3.1. Antioksidant enzimler

Enzimlerin soğuğa dayanıklılıktaki rolleri yadsınmaz bir gerçektir. Biyokimyasal reaksiyonlarda önemli rol oynayan enzimlerin miktarı ne kadar yüksekse o bitkinin düşük sıcaklıklara direnci de o kadar artmaktadır. Ancak her bitkide aynı enzimin aynı yoğunlukta ve güçte olduğu, yani belli enzimlerin mutlak mukavemeti sağlayacağı reaksiyona girdiği söylenemez. Örneğin, asmalarda amilaz, peptidaz, peroksidaz, katalaz, ve sakkaraz enzimlerinin aktiviteleri yükselmektedir (Eriş 2003). Dona mukavemet gösteren yoncalarda dehidrogenaz, elmalarda ve söğütlerde peroksidaz, katalaz, invertaz ve NADP redüktaz enzimlerinin artış gösterdiği saptanmıştır (Levitt 1980). Kışlık çeltik bitkisinde düşük sıcaklık uygulaması (4°C) CAT aktivitesini güçlü bir şekilde engellemektedir (Streb ve ark. 1999). *Arabidopsis* bitkisinde düşük sıcaklık, APRX ve GR enzimlerinin dokularda aktive olmasına neden olurken; çeltikte katalaz enzimini engellenmiştir (Fadzillah ve ark. 1996).

Bizim bilgilerimize göre, zeytinlerde düşük sıcaklık stresinde antioksidant enzimlerin rollerine dair mevcut bir çalışma bulunmamaktadır. Bunun yanında herdemyeşil türlerde de çok sınırlı sayıda araştırma mevcuttur. Bu nedenle, burada tez konusu ile doğrudan ilgili olarak gerek otsu gerekse odunsu bitki türlerinde mevsimlere ve düşük sıcaklık koşullarına göre APRX ve CAT enzim aktivitelerinin değişimini gösteren çalışmalar özetlenmiştir.



Herdemyeşil bir tür olan Sarı çam (*Pinus sylvestris* L.) fidelerinde soğuk adaptasyonu ile dona mukavemetin artması ile APRX, dehidroaskorbat redüktaz gibi enzimlerin arttığı tespit edilmiştir (Tao ve ark. 1998).

Lee ve Lee (2000), hıyar (*Cucumis sativus* L.) yapraklarında düşük sıcaklık ile teşvik edilen antioksidant enzimlerin değişimlerini belirlemek amacıyla bir araştırma yapmışlardır. Düşük sıcaklık stresi ile belirgin olarak APRX ve PRX, enzimlerinin aktivitelerinde artış olmuş, CAT aktivitesinde ise azalma meydana gelmiştir. Hıyar yapraklarında APRX'in 5 izoenzim formu tespit edilmiştir. APRX-4 ve APRX-5 yoğunluklarının düşük sıcaklık stresi ile arttığı belirlenmiştir. Ancak APRX-3 izoenziminin yoğunluğunda stresten sonra belirgin şekilde azalma görülmüştür. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, düşük sıcaklık stresi SOD/askorbat-glutatifon döngüsünü aktive ederken CAT'i engellediği ortaya konulmuştur. Ancak çeşitli çevresel streslere karşı bu antioksidant enzimlerin harekete geçme zamanının tüm izoenzim formları için aynı olmadığı da vurgulanmıştır.

*Euphorbia esula* L. (sütlegen) bitkisinde yüksek sıcaklık (48 saat 41°C), düşük sıcaklık (25 gün 5°C), kuraklık (5 gün) ve böcek zararı (*Apthona lacertosa*) (biyotik stres) ile oluşan stresler sırasındaki bazı enzimlerin aktivite değişimleri incelenmiştir (Davis ve Swanson 2001). Buna göre, bitkide CAT aktivitesi tüm stres tiplerinde azalış göstermiştir. APRX aktivitesi yüksek sıcaklık stresi sırasında artmıştır. APRX aktivitesi kuraklık stresinde önce bir artış olmuş bir müddet sonra kontrol seviyelerine inmiştir. Biyotik streste APRX aktivitesi engellenmiştir. Düşük sıcaklık stresinde ise bu enzim aktivitesi tam olarak belirlenememiştir.

Rivero ve ark. (2002), karpuzun (*Citrullus lanatus*) oksidatif metabolizması üzerine termal stresin etkilerini belirlemek amacıyla araştırma yapmışlardır. Çalışmada bitkiler 30 gün boyunca 10 ve 35°C'de yetiştirilmiştir. Bu bitkilerin yapraklarında antioksidant bileşikler, enzimatik aktiviteler (SOD, CAT, APRX, dehidroaskorbat redüktaz ve GR) ve toplam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonları incelenmiştir. Düşük sıcaklık stresi

sonucu bitkilerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i indirgeyici enzim aktivitelerinde artış tespit edilmiştir.

Lukatkin (2002), düşük sıcaklıklara duyarlı olan mısır, hıyar ve patates fidelerinde hücre içi APRX ve CAT aktivitelerindeki değişimleri araştırmıştır. Araştırmada bitkiler 2°C'de 1-24 saat arasında tutulmuştur. Uygulamalar sonucunda 1-2 saatlik düşük sıcaklık uygulamasında hıyar ve mısır bitkisinde enzim aktiviteleri önemli miktarda azalmıştır. Daha uzun süreli düşük sıcaklık uygulamalarında ise, türlere bağlı olarak dereceli artış gözlenmiştir. Üşüme sıcaklıklarına maruz bırakılan bitkiler normal sıcaklıklara alındıktan bir gün sonra enzim aktiviteleri başlangıç seviyesine dönmüştür. Sonuç olarak, soğuğa dayanım faktörlerinden birinin, bitkilerin üşüme sıcaklıkları sırasında antioksidant enzim kapasitelerini muhafaza etmeleri ve normal hava koşullarına döndükleri zaman hızlı bir şekilde enzim aktivitelerini yeniden sağlayabilmeleri olabileceği ifade edilmiştir.

*Festuca pratensis* Huds. 'Skra' (Çayır yumağı), *Hordeum vulgare* L. 'Mobek' (arpa) ve *Brassica napus* L. var. *Oleifera* 'Gorrezanski' (kolza) bitkilerinde soğuğa uyum sırasında CAT aktivitesi azalırken, bu bitkilerin soğuğa uyumdan çıkarılması ile (deacclimation) enzim aktivitesinin artış gösterdiği belirlenmiştir. Arpa ve turp bitkilerinde düşük sıcaklık uygulamaları ile CAT aktivitelerinde belirgin bir azalış belirlenmiştir. Benzer şekilde düşük sıcaklıklarda hıyarda da CAT aktivitesi azalmıştır (Lee and Lee 2000). Tersine, başka çalışmalarda, düşük sıcaklıklara maruz kalan mısır (Leiper ve ark. 1999; Pastori ve ark. 2000), patates (Seppanen ve Fagerstedt 2000) ve buğdayda (Scebba ve ark. 1998) CAT aktivitesinde artış tespit edilmiştir (Plazek ve Zur 2003).

Soğuğa uyum sağlamış ve sağlamamış tahıllarda antioksidant enzimlerdeki (CAT, APRX, PRX) değişimler dona mukavemet açısından incelenmiştir. Çalışmada soğuğa uyum sağlayan bitkilerin yapraklarında APRX aktivitesinin, soğuğa uyum sağlamamışlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. CAT aktivitesi ise soğuğa uyum sağlamış bitkilerde daha düşük bulunmuştur. Enzim aktivitesi ve dona mukavemet arasındaki ilişki en belirgin olarak APRX enziminde tespit edilmiştir.

Enzim aktivitesi ve dona mukavemet arasındaki en yüksek korelasyon soğuga uyum sağlamış bitkilerde belirlenirken, soğuga uyum sağlamamış bitkilerde önemli ölçüde pozitif bir ilişki belirlenememiştir (Janda ve ark. 2003).

Parvanova ve ark. (2004), tütünde düşük sıcaklık sonucu oluşan oksidatif strese yer alan bazı etkenleri incelemiştir. Bu çalışmada ozmoprotektanların (prolin, fruktan ve glisin betain) sentezinde yer alan enzimleri kodlayan genlerin aktarıldığı tütün hatları ile gen aktarılan ve soğuga adapte edilen bitkilere 12 ve 24 saat süreyle -2°C sıcaklık uygulanmıştır. Sonuçta, genetiği değiştirilmemiş bitkilerde 24 saatlik düşük sıcaklık uygulamasında şiddetli zararlanma tespit edilmiştir. Bu bitkilerde, iyon sızıntısında, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de ve PRX enzim aktivitesinde artış belirlenirken, CAT enzim aktivitesinde azalış saptanmıştır. Aynı parametreler için eğilimler genetiği değiştirilmiş bitkilerde oldukça düşük bulunmuştur. Çalışmada uzun süreli düşük sıcaklık uygulamasında CAT aktivitesi düşerken, PRX aktivitesi oldukça yükselmiştir. CAT enzimidaki bu baskılanma tam olarak açıklanamamaktadır. Ancak bu konu ile ilgili olarak çeşitli öngörüler ileri sürülmüştür; a) CAT enziminin üretilmesinin azalması; b) yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu tarafından enzim aktivitesinin engellenmesi; c) içsel CAT engelleyicilerin (inhibitörlerin) birikimi. Bu çalışmada ise araştırmacılar CAT aktivitesindeki düşüşü H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesindeki artışa bağlamışlardır (substrat inaktivasyonu). PRX enzim aktivitesindeki yükseliş ise, düşük sıcaklık stresinin neden olduğu aktif oksijen türlerinin üretilmesi ile açıklanmıştır. CAT'in aksine, PRX (lar) elektron donörlerini kullanarak etki göstermektedir; bu da PRX'in okside olabilen bileşiklere bağımlı olduğu anlamına gelmektedir. Bitki hücreleri öldüğünde ise, bu metabolitlerin yolları inaktive olmaktadır.

-30°C sıcaklıklarda yaşayabilen herdemyeşil türler *Sabina przewalskii* Kom. ve *Sabina chinensis* (Lin.) Ant.'in düşük sıcaklıklara toleransları ile antioksidant enzim aktiviteleri arasındaki ilişki incelenmiştir (Chen ve ark. 2006). Çalışmada örneklemeler yazdan ilkbahara kadar olan dönemde 1 aylık aralıklarla yapılmıştır. Araştırma sonucunda yapraklarda antioksidant enzim aktivitelerinin sıcaklıklar düştükçe ve yükseldikçe değiştiği tespit edilmiştir. PRX, APRX ve CAT enzim aktivitelerinin sıcaklıklar düşmeye başladığı sonbahar aylarında (soğuga uyumun ilk safhası) artış

eğilimde olduğu, kış aylarında aktivitenin bir miktar düştüğü (soğuğa uyumun ikinci safhası), ilkbahar aylarında (soğuğa uyumdan çıkış) ise tekrar yükseliş gösterdiği belirlenmiştir. Araştırcılar, herdemyeşil odunsu *Sabina* bitkisinin dona mukavemetinin antioksidant enzim aktivitelerinin artış kapasitesi ile ilişkili olduğunu ileri sürmüştür.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma, 2003-2005 yılları arasında Bursa-Görükle Köyü'nde bulunan "Gemlik" çeşidi zeytin bahçesi ve Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Fizyoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

### 2.1. Materyal

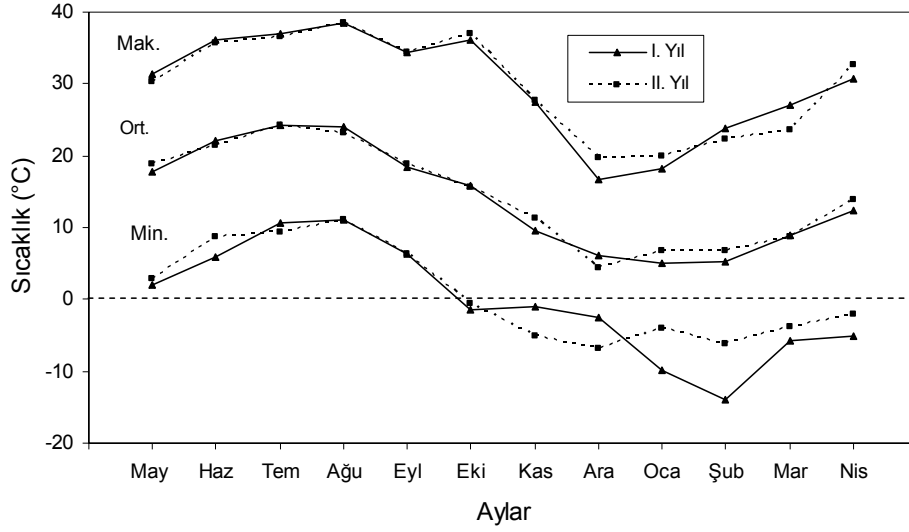
Denemede bitkisel materyal olarak "Gemlik" zeytin çeşidi kullanılmıştır. Örneklemeler için Uludağ Üniversitesi kampüsüne yakın Görükle Köyü'nde bulunan ve 13 yaşlı ağaçlardan oluşan bir bahçe seçilmiştir (Şekil 2.1). Deneme süresince bu bahçeye ait en yüksek, en düşük ve ortalama sıcaklıkların aylara göre değişim ve dağılımları Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Denemenin yürütüldüğü zeytin bahçesinin genel görünüşü.

6x6 m dikim aralıklarının mevcut olduğu bahçede, kültürel işlemler düzenli olarak uygulanmakta; ancak sulama yapılmamaktadır. Ağaçlar ilk deneme yılında "var" (~35 kg/ağaç), 2. deneme yılında "yok" (~25 kg/ağaç) dönemlerini yaşamışlardır. Her iki yıl içinde elde edilen ürün miktarı ve iki yılın farklılığı buradaki bitkilerde periyodisitenin çok şiddetli olmadığını göstermektedir.

Gemlik çeşidi, Marmara bölgesi ağaç varlığının %80'ini, Türkiye genelindeki ağaç varlığının %11'ini temsil etmektedir ve Bursa, Tekirdağ, Kocaeli, Bilecik,



Şekil 2.2. Birinci ve ikinci deneme yılları süresince (Mayıs 2003 – Nisan 2005) hava sıcaklıklarının aylık değişim ve dağılımı.

Kastamonu, Zonguldak, Sinop, Samsun, Trabzon, Balıkesir, İzmir, Manisa, Aydın, İçel, Adana, Antalya illerinde yetiştirilmektedir. Siyah sofralık bir zeytin çeşididir. Parlak siyah renkte, tad ve tekstür açısından üstün özelliktedir. Sofralık kalite dışı ürünler yağlık olarak da işlenebilmektedir. Ağaç orta büyüklükte ve yuvarlak bir taç oluşturmaktadır. Ana dallar dik açılı genç dallar ise, geniş açılı olup, etek dalları ağaca sarkık bir görünüm vermektedir. Ağaçlar, 12 Mayıs-9 Haziran tarihleri arasında çiçeklenmekte; somaktaki çiçek adeti 10–23 arasında olup ortalama 14'dür. Meyve bağlama dönemi 1–15 Kasım arasındadır. Meyveleri orta büyüklükte, 1 kg'daki meyve sayısı ortalama 268'dir. Meyvede et oranı ortalama %85.86, yağ oranı ortalama % 29.97'dir. Şekil 2.3'de "Gemlik" zeytin çeşidi'nde meyvelerin olgunlaştığı dönemde dallar görünmektedir. Kısmen kendine verimlidir (Canözer 1991).



Şekil 2.3. "Gemlik" zeytin çeşidi'nde meyvelerin olgunlaştığı dönemde dalların görünüşü.

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Bitkisel materyallerin alınması

Örnek alma işlemi, Mayıs 2003 - Nisan 2005 tarihleri arasında ayda bir defa ve her ayın ikinci haftasında gerçekleştirilmiştir. Örnekler, 5 ağaçtan farklı yönlerde ve tesadüfi olacak şekilde, sabah erken saatlerde, 1 yıllık sürgünlerden (30-40 cm uzunluğunda) alınarak zaman kaybetmeden buz kutusu içerisinde laboratuara getirilmiştir.

Bu örneklerden kontrol grubu (hiç bir uygulama yapılmayan) olarak seçilenlerin bir kısmı don testlerinden sonra iyon sızıntısı ve canlılık testleri için; geri kalan kısmı ise fizyolojik ve moleküler biyolojik analizler için ayrılmıştır.

Moleküler ve fizyolojik analizler için; sürgünlerin taze olan uçları yaprakları ile beraber alınmıştır. Yapraklarda yapılacak analizlerde kullanılmak üzere sürgün üzerindeki yapraklar yaprak sapı hariç; kabuktan yapılacak analizlerde ise, sürgünlerin kabuk dokusu keskin bir bisturi yardımıyla sıyrılmıştır. Daha sonra yaprak ve kabuk örnekleri alüminyum folyo ile paketlenerek sıvı azot içerisinde şok dondurma yapılmış ve analizlerin yapılacağı zamana kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

### 2.2.2. Düşük sıcaklık (don) testleri

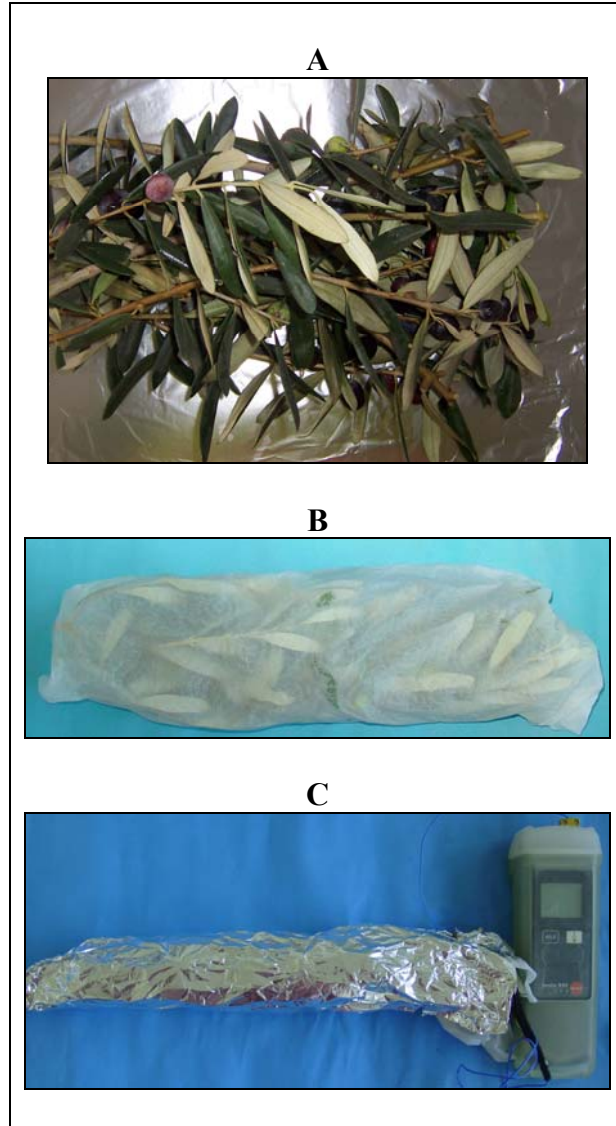
Düşük sıcaklık uygulamaları için Arora ve ark. (1992)'nin önerdikleri yöntem zeytin örneklerine adapte edilerek uygulanmıştır.

Düşük sıcaklık testleri için sürgünler, önce nemli havlu kağıtlara, daha sonra alüminyum folyolara sarılarak hazırlanmışlardır. Paketlenen örneklerin bir yaprağına thermocouple cihazı takılarak sıcaklıkları takip edilmiştir (Şekil 2.4).

Hazırlanan örnekler 12 saat süreyle, kademeli olarak  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  sıcaklıklarda tutulmuşlardır. Sıcaklık yaklaşık olarak  $-5^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar  $1.5^{\circ}\text{C/s}$ ;  $-20^{\circ}\text{C}$ 'ye

kadar ise 5 °C/s hızda azalmıştır. Düşük sıcaklık uygulama sürelerini tamamlayan örnekler yavaş çözünmeyi sağlamak amacıyla yaklaşık 12 saat 4 °C’de bekletilmişlerdir.

Bu örneklerden bir kısım yaprak ve kabuk, membran zararlanmasının tespiti için hemen kullanılırken bir kısım örnek diğer moleküler (enzim ve protein) ve fizyolojik (çözünebilir şekerler) analizler için ayrılarak kullanılıncaya kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.4. Düşük sıcaklık testleri için örneklerin hazırlanması. A. Düşük sıcaklık uygulaması yapılacak zeytin sürgünleri, B. Örneklerin ıslak havlu kağıt içerisindeki görünümü, C. Örneklerin alüminyum folyo ile sarılmış haldeki görünümü ve thermocouple cihazı.



### 2.2.3. Fizyolojik ve moleküler biyolojik analizler

#### 2.2.3.1. Hücresel membran zararının belirlenmesi

Düşük sıcaklık uygulamaları sonucu oluşan hücre membran zararını tespit edebilmek amacıyla “iyon sızıntısı” (electrolyte leakage) testleri yapılmıştır (Gülen ve Eriş 2003). Yöntemde, kontrol grubu ve düşük sıcaklık uygulamalarını tamamlayan çeliklerden 3 tekerrürlü olarak yaprak örnekleri bir disk yardımı ile 1 cm çapında; kabuk örnekleri ise, keskin bir bisturi ile kesilerek 1x1 cm olacak şekilde alınarak saf su ile temizlemiş ve test tüplerine konularak üzerlerine 20 ml saf su eklenmiştir. Hazırlanan örnekler vakuma tabi tutulmuş ve 250 rpm hızındaki çalkalayıcıda oda sıcaklığında ( $24 \pm 1$  °C) 4 saat boyunca inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonun tamamlanmasından sonra örneklerin kondaktivitemetre (WTW TetraCon 325 model, InoLab Cond Level 1, Weilheim, Germany) ile ilk ölçümleri yapılmış; otoklavlama işleminden sonra tamamen ölen hücrelerde ikinci ölçümler yapılmıştır.

Alınan veriler ile hücresel zararın belirlenmesi için gerekli hesaplamalar Arora ve ark. (1992)'ye göre yapılmıştır % iyon sızıntısı hesaplanmıştır (Arora ve ark. 1992).

$$\% \text{ İyon Sızıntısı} = \frac{\text{İlk ölçüm}}{\text{Son ölçüm}} \times 100$$

Daha sonra, “iyon sızıntısı oranları (%)” kullanılarak membranlarda oluşan zararlanma miktarları aşağıda belirtilen formüle göre kontrol baz alınarak hesaplanıp, “%” olarak ifade edilmiştir.

$$\% \text{ Zararlanma} = \frac{\% \text{ UİS} \times \% \text{ KİS}}{100 - \% \text{ KİS}} \times 100$$

%UİS : Uygulama grubunun iyon sızıntısı oranı (%)

%KİS : Kontrol grubunun iyon sızıntısı oranı (%)

### **2.2.3.2. Düşük sıcaklık toleransının (LT<sub>50</sub>) belirlenmesi**

Düşük sıcaklık toleransı (LT<sub>50</sub>), %50 ölüm oranının gerçekleştiği sıcaklık değerini (°C) ifade etmektedir. Bu da deneme boyunca her aya ait % zararlanma oranları kullanılarak belirlenmiştir.

### **2.2.3.3. Çözünabilir şekerlerin analizleri**

Çözünabilir şekerler ekstraksiyondan sonra toplam çözünabilir şeker, sukroz ve glukoz şeklinde değerlendirilmeye alınmıştır.

#### **2.2.3.3.1. Çözünabilir şekerlerin ekstraksiyonu**

Yaprak ve kabuk örneklerinde çözünabilir şekerlerin ekstraksiyonu, Van Handel (1968)'in önerdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Herbir tekerrür için 100 mg örnek tartılarak, içerisinde 5ml % 80'lik etanol bulunan payreks tüplere aktarılmış ve üzerleri alüminyum folya ile kapatılarak 85°C'lik su banyosuna alınmıştır. Böylece etanolün buharlaşması sağlanmıştır. Su banyosu işlemi 4 aşamalı olarak (1 saat, 30 dk, 15 dk, 15 dk) gerçekleştirilmiştir. Her aşamada tüpler içerisine 5ml % 80'lik etanol ilave edilmiş ve böylece bir örnek ekstraksiyonu için toplam 20ml ethanol kullanılmıştır. Son 15 dakikalık su banyosu işleminden sonra payreks tüplerin üzerleri açılarak kalan etanol, 55°C su banyosunda, çeker ocak altında uçurulmaya bırakılmıştır. Payreks tüpler içerisinde bulunan ethanol uçtukten ve örnekler tamamen kuruduktan sonra tüpün taban kısmında bulunan bitki doku kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Tüplerin taban ve çeperlerinde kalan tortu tabakasının (şeker) çözündürülmesi amacıyla 1ml saf su ilave edilerek vortex yapılmıştır. Bu şekilde ekstrakte edilmiş olan örnek solüsyonu 1,5 ml'lik ependorf tüpler içerisine alınarak ölçüm aşamasına kadar -20°C de muhafaza edilmiştir.

Ekstrakte edilmiş ve -20°C de muhafaza edilen örneklerin analize hazırlanması aşamasında; örnekler çözündürüldükten sonra 10 000 g hızda 10 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra ölçümler için kullanılmıştır.

### 2.2.3.3.2. Toplam çözünebilir şeker miktarının belirlenmesi

Toplam çözünebilir şekerlerin belirlenmesi amacıyla yapılan analizler için Van Handel (1968)'in önerdiği yöntem temel alınarak, bazı değişikliklerle zeytin yaprak ve kabuk örneklerine adapte edilmiştir. Buna göre aşağıdaki işlem gerçekleştirilmiştir.

Toplam şeker miktarının belirlenmesi için kullanılan solüsyonlar;

- % 0.04 Glukoz
- Anthron solüsyonu ( $C_6HCO.C_6H_4.CH_2$ )

Anthron solüsyonunu oluşturan bileşenler ( $4^\circ C$ )

- |             |          |
|-------------|----------|
| • $H_2SO_4$ | 1000 mL  |
| • Saf su    | 333.3 ml |
| • Anthron   | 1300 mg  |

Anthron çözeltisinin hazırlanması aşamasında cam beher içerisine konulan saf su, 10 dak. buz içerisinde bekletilerek soğuması sağlanmış ve sonra 1L  $H_2SO_4$  yavaş yavaş eklenmiştir. Gaz çıkışı bitinceye kadar 10–20 dk karışması sağlandıktan sonra antron eklenmiştir. Daha sonra çözelti 1 saat süreyle karıştırıldıktan sonra kullanım aşamasına kadar  $+4^\circ C$  de muhafaza edilmiştir.

Toplam şeker miktarının belirlenmesinde standart olarak % 0.04'lük glukoz çözeltisi kullanılmıştır. Çizelge 2.1.'de standartların ve örneklerin hazırlanmasına ilişkin ayrıntılar verilmiştir. Örnek ve standart çözeltilerin hazırlığı aşamasından sonra tüplerin üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak 10 dk boyunca  $100^\circ C$  su banyosunda tutulmuştur. Oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildikten sonra 'Beckman UV-DU 530 model' spektrofotometrede (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Calif) cam küvet kullanılarak 620 nm dalga boyunda absorbans okumaları yapılmıştır. Burada temsili olarak sadece bir örnek hazırlığı verilmiş olup tüm örneklerde aynı yöntem kullanılmıştır. Toplam çözünebilir şeker miktarı standartlar esas alınarak mg/gTA olarak hesaplanmıştır.

**Çizelge 2.1. Toplam çözünebilir şeker miktarının belirlenmesinde kullanılan standart ve örnek hazırlığı (Van Handel 1968).**

Standartlar	Glukoz solüsyonu (µl)	dH <sub>2</sub> O (µl)	Antron solüsyonu (m)
S0	0	1000	5
S1	100	900	5
S2	200	800	5
S3	300	700	5
S4	400	600	5
Örnek 1	25	975	5

### 2.2.3.3.3 Glukoz miktarının belirlenmesi

Glukoz miktarının belirlenmesi amacıyla yapılan analizler için Miller (1959)'in önerdiği yöntem temel alınmıştır ve bu yöntem bazı değişikliklerle zeytin yaprak ve kabuk örneklerine adapte edilmiştir.

Glukoz miktarının belirlenmesi için kullanılan solüsyonlar;

- % 0.04 Glukoz
- Samner Solüsyonu

Samner solüsyonunu oluşturan bileşenler (1 L, 1X);

- Potasyum sodyum tartarat (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNAO<sub>6</sub>.4H<sub>2</sub>O) 300 g
- NaOH (2 N) 200 ml
- 3,5 Dinitrosalisilik asit 10 g

Samner solüsyonunun hazırlanması aşamasında cam beher içerisine konulan 500 ml saf su ısıtıcı-karıştırıcı yardımıyla hafif ısıtılıp üzerine 300g potasyum sodyum tartarat eklenmiştir. Potasyum sodyum tartarat çözüldükten sonra 200 ml 2N NaOH ve 10g 3,5-dinitrosalisilik asit ilave edilerek solüsyonun çok iyi bir şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra çözelti saf su ile 1 L'ye tamamlanmış ve kahverengi bir şişeye konularak oda sıcaklığında kullanım aşamasına kadar muhafaza edilmiştir.

Glukoz miktarının belirlenmesinde standart olarak % 0.04'lük glukoz kullanılmıştır. Çizelge 2.2.'de standartların ve örneklerin hazırlanmasına ilişkin ayrıntılar verilmiştir.

Örnek ve standart çözeltileri hazırlandıktan sonra üzerlerine 1 ml samner çözeltisi ilave edilerek tüplerin üzeri aliminyum folyo ile kapatılmış ve 10 dk süreyle 100°C su banyosunda tutulmuştur. Daha sonra standart ve örnekler oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletilmiş ve 'Beckman UV-DU 530 model' spektrofotometrede (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Calif) cam küvet kullanılarak 550nm dalga boyunda absorbans okumaları yapılmıştır. Burada temsili olarak sadece bir örnek hazırlığı verilmiş olup tüm örneklerde aynı yöntem kullanılmıştır. Glukoz miktarı standartlar esas alınarak mg/gTA olarak hesaplanmıştır.

**Çizelge 2.2. Glukoz miktarının belirlenmesinde kullanılan standart ve örnek hazırlığı (Miller 1959).**

Standartlar	Glukoz solüsyonu (µl)	dH <sub>2</sub> O (µl)	Samner solüsyonu (ml)
S0	0	1000	1
S1	100	900	1
S2	200	800	1
S3	300	700	1
S4	400	600	1
Örnek 1	25	975	1

#### 2.2.3.3.4. Sukroz miktarının belirlenmesi

Sukroz içeriğinin belirlenmesi amacıyla yapılan analizler için Van Handel (1968)'in önerdiği yöntem temel alınmıştır ve bu yöntem bazı değişikliklerle zeytin yaprak ve kabuk örneklerine adapte edilmiştir.

Sukroz miktarının belirlenmesi için kullanılan solüsyonlar;

- %30 KOH
- Sukroz solüsyonu (%1) (4°C)
- Anthron solüsyonu (C<sub>6</sub>HCO.C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>.CH<sub>2</sub>)

Sukroz içeriğinin belirlenmesinde standart olarak %1'lik sukroz kullanılmıştır. Çizelge 2.3.'da standartların ve örneklerin hazırlanmasına ilişkin ayrıntılar verilmiştir.

Payreks tüpler içerisine alınan örneklere %30 KOH ve su eklendikten sonra üzerleri alüminyum folya ile örtülmüş ve 10 dakika süreyle 100°C sıcaklıktaki su banyosunda tutulmuştur. Su banyosundan çıkarılan örnekler oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulmuştur. Standartlara ise KOH ekleme ve su banyosu işlemi yapılmamıştır. Örneklere ve standartlara 2.5 ml antron solüsyonu ilave edilip, 1 saat bekletildikten sonra 'Beckman UV-DU 530 model' spektrofotometrede (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Calif) cam küvet kullanılarak 620 nm dalga boyunda absorbans okumaları yapılmıştır. Burada temsili olarak sadece bir örnek hazırlığı verilmiş olup tüm örneklerde aynı yöntem kullanılmıştır. Sukroz miktarı standartlar esas alınarak mg/gTA olarak hesaplanmıştır.

**Çizelge 2.3. Sukroz miktarının belirlenmesinde kullanılan standart çözelti hazırlığı (Van Handel 1968).**

Standartlar	Sukroz (µl)	%30 KOH	dH <sub>2</sub> O (µl)	Antron solüsyonu (ml)
S0	0	-	500	2.5
S1	25	-	475	2.5
S2	50	-	450	2.5
S3	100	-	400	2.5
S4	150	-	350	2.5
S5	200	-	300	2.5
Örnek 1	300	150	50	2.5

#### 2.2.3.4. Askorbat peroksidaz enzim analizi

##### *Askorbat Peroksidaz Enzim Ekstraksiyonu*

Askorbat peroksidaz ekstraksiyonu işleminde Moran ve ark. (1994)'nın kullandıkları yöntem esas alınmış ve bu yöntem zeytin yaprak ve kabuk örneklerine adapte edilmiştir.

-80 °C'de saklanan 400 mg yaprak ve 200 mg kabuk örnekleri enzim ekstraksiyonundan önce sıvı azot içerisinde, seramik havan kullanılarak toz haline gelinceye kadar öğütülmüştür. Bu şekilde toz haline getirilen örnekler askorbat peroksidaz ekstraksiyon solüsyonu ile karıştırılıncaya kadar yine -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Askorbat peroksidaz ekstraksiyon solüsyonu için kullanılan bileşenler

- 50 mM K-PO<sub>4</sub> Solüsyonu pH 7.8                      100 ml
- 50 mM Askorbik asit stok                                      2 ml

Her bir örneğin üzerine yukarıdaki şekilde hazırlanan ekstraksiyon solüsyonundan yaprak örnekleri için 4ml, kabuk örnekleri için 2 ml ve çok az bir miktar PVPP ile kuvarz kum eklenerek havanda homojenize edilmiştir. Tüm aşamalar 4°C'de gerçekleştirilmiştir.

Yukarıdaki işlemde sonra, örnekler 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 10 000 g devirde 4 °C'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi biter bitmez tüplerin üst kısmındaki sıvı 1.5 ml'lik ephendorf tüpler içerisine alınarak aktivite belirlenmesinde kullanılmıştır.

#### ***Askorbat Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi***

Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde aşağıdaki solüsyonlar kullanılmıştır. Askorbat stok ve hidrojen peroksit çözeltileri analiz sırasında taze hazırlanmıştır (Nakano ve Asada 1980).

- 50 mM Reaksiyon solusyonu K-PO<sub>4</sub> pH 7.0
- 5 mM Askorbat solusyonu
- 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solusyonu

Enzim aktivite ölçümleri 290nm absorbanstan kuvarz spektro küveti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler için kuvarz spektrofotometre küveti kullanılmıştır.

Aktivite ölçümleri, 60 saniye süreyle 10 saniye aralıklarla gerçekleştirilmiş ve 10. ve 50. saniyedeki absorbans değerleri kaydedilmiştir.

Kör okuma için örnekler hariç reaksiyonda kullanılan tüm çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

1900  $\mu$ l Reaksiyon solüsyonu + 150  $\mu$ l 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 200  $\mu$ l 5 mM Askorbat

Örneklerin enzim aktivitesini belirlemek için reaksiyonda yer alan bileşen miktarları ise aşağıdaki şekildedir.

1850  $\mu$ l Reak. solüsyonu + 150  $\mu$ l 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 200  $\mu$ l 5 mM Askorbat + 50  $\mu$ l örnek

Askorbat Peroksidaz Enzim Aktivitesi için örneklerdeki toplam protein miktarı Bradford (1976)'a göre BSA standart olarak kullanılarak spektrofotometrede ölçülmüştür. Protein standardı olarak BSA (Bovine Serum Albumine) 100 mg BSA/100 ml dH<sub>2</sub>O olacak biçimde hazırlanmıştır. Çizelge 2.4. ve 2.5.'de örneklerin ve standartların hazırlanmasına ilişkin ayrıntılar verilmiştir. Bu yöntem için geliştirilmiş Excel programı kullanılarak sonuçlar hesaplanmıştır.

**Çizelge 2.4. Toplam protein miktarının belirlenmesi için standartların hazırlanması**

Standartlar	Konsantrasyon $\mu$ g/ $\mu$ l	BSA Standart ( $\mu$ l)	dH <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	Protein Boya Solüsyonu (ml)
STD 0	0	0	100	2
STD 10	10	10	90	2
STD 20	20	20	80	2
STD 40	40	40	60	2
STD 60	60	60	40	2



**Çizelge 2.5. Toplam protein miktarının belirlenmesi için örnek hazırlığı**

Örnekler ( $\mu$ l)	dH <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	Protein Boya Solusyonu (ml)
100	100	1

***Askorbat Peroksidaz Enzim Aktivitesi Hesaplaması***

Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin hesaplanmasında enzim aktivite değeri belirlenmiş ve toplam protein miktarı ile oranlanarak  $\mu$ mol/mg protein olarak ifade edilmiştir. Enzim aktivite miktarının hesaplamasında spektrofotometre okumaları sırasında belirlenen aktivite değerlerinde öncelikle aktivite ve net aktivite değerleri belirlenmiştir.

$$\text{Aktivite} = \frac{(2. \text{OD} - 1. \text{OD})}{1 \text{ dakika}}$$

1. OD : 10. sn absorbans

2. OD : 50. sn absorbans

$$\text{Net Aktivite Değeri} = \text{Aktivite} - \text{kör okuma (blank)}$$

Bu şekilde belirlenmiş olan net aktivite değerleri kullanılarak enzim aktivite değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{AD } (\mu\text{mol/gTA}) = \left[ \frac{\text{NA} \times \text{SD} \times (\text{SF} / \text{ÖM})}{1000} \right]$$

AD : Aktivite değeri ( $\mu$ mol/gTA)

NA : Net aktivite Değeri

SD : Standart değer (803.25)

SF : Örnek seyretme faktörü

ÖM : Örnek miktarı (mg)

Bu formüle göre hesaplanan aktivite değerleri, toplam protein miktarları ile oranlanarak belirlenmiştir.

$$\text{Ask.Perok. Enzim Akt. } (\mu\text{mol/mg protein}) = \frac{\text{AD } (\mu\text{mol/gTA})}{\text{TPM (mg protein/gTA)}}$$

APRX : Ask.Perok. Enzim Akt. ( $\mu\text{mol/mg protein}$ )

AD : Aktivite değeri ( $\mu\text{mol/gTA}$ )

TPM : Toplam protein miktarı ( $\text{mg protein/gTA}$ )

### 2.2.3.5. Katalaz enzim analizi

#### *Katalaz Enzimi Ekstraksiyonu*

Katalaz ekstraksiyonu işleminde Moran ve ark. (1994)'nin kullandıkları yöntem esas alınmıştır ve bu yöntem zeytin yaprak ve kabuk örneklerine adapte edilmiştir.

-80 °C'de saklanan örneklerden her bir tekerür için 500 mg yaprak ve 200mg kabuk sıvı azot içerisinde, seramik havan kullanılarak toz haline gelinceye kadar öğütölmüştür. Bu şekilde toz haline getirilen örnekler katalaz enzimi solüsyonu ile karıştırılincaya kadar yine -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Katalaz enzimi ekstraksiyon solüsyonu için kullanılan bileşenler

- 0.1 M K-PO<sub>4</sub> Solüsyonu pH 7.0      100 ml
- 0.1 M EDTA      200µl
- Triton      200µl

Her bir örneğin üzerine yukarıdaki şekilde hazırlanan ekstraksiyon solüsyonundan yaprak örneklerine 5 ml, kabuk örneklerine 2 ml ve çok az bir miktar PVPP ile kuvarz kum eklenerek havanda homojenize edilmiştir. Tüm aşamalar 4°C'de gerçekleştirilmiştir.

Yukarıdaki işlemten sonra, karışım 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 760 g devirde 4°C'de 10 dakika süreyle santifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi biter bitmez tüplerin üst kısmındaki sıvı 1.5 ml'lik ephendorf tüpler içerisine alınarak aktivite belirlenmesinde kullanılmıştır. Dipte kalan tortu kısım ise atılmıştır.

### ***Katalaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi***

Katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde aşağıdaki solüsyonlar kullanılmıştır. Hidrojen peroksit çözeltisi aktivite ölçümleri sırasında taze hazırlanmıştır.

- 0.1 Ekstraksiyon solüsyonu K-PO<sub>4</sub> pH 7.0
- 150 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu

Enzim aktivite ölçümleri 260nm absorbans değerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler için kuvarz spektrofotometre küveti kullanılmıştır. Aktivite ölçümleri, 60 saniye süreyle 10 saniye aralıklarla gerçekleştirilmiş ve 10. ve 50. saniyedeki absorbans değerleri kaydedilmiştir.

Kör okuma için örnekler hariç reaksiyonda kullanılan tüm çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

1900 µl Reaksiyon solüsyonu + 750 µl 150 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0 µl Örnek

Örneklerin enzim aktivitesini belirlemek için reaksiyonda yer alan bileşen miktarları ise aşağıdaki şekildedir.

1800 µl Reak. solüsyonu + 750 µl 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100 µl örnek

Katalaz enzim aktivitesi için örneklerdeki toplam protein miktarının belirlenmesi Askorbat peroksidaz enzim analizinde belirtildiği şekilde yapılmıştır.

### *Katalaz Enzim Aktivitesi Hesaplaması*

Katalaz enzim aktivitesinin hesaplanmasında enzimin aktivite değeri belirlenmiş ve toplam protein miktarı ile oranlanarak  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein olarak ifade edilmiştir. Enzim aktivite miktarının hesaplamasında spektrofotometre okumaları sırasında belirlenen aktivite değerlerinde öncelikle aktivite ve net aktivite değerleri belirlenmiştir.

$$\text{Aktivite} = \frac{(2. \text{OD} - 1. \text{OD})}{1 \text{ dakika}}$$

1. OD : 10. sn absorbans  
2. OD : 50. sn absorbans

$$\text{Net Aktivite Değeri} = \text{Aktivite} - \text{kör okuma (blank)}$$

Bu şekilde belirlenmiş olan net aktivite değerleri kullanılarak enzim aktivite değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{AD } (\mu\text{mol}/\text{gTA}) = \frac{[(\text{NA} \times \text{SD} \times (\text{SF} / \text{ÖM}))]}{1000}$$

- AD : Aktivite değeri ( $\mu\text{mol}/\text{gTA}$ )  
NA : Net aktivite Değeri  
SD : Standart değer (39.40)  
SF : Örnek seyretme faktörü  
ÖM : Örnek miktarı (mg)

Bu formüle göre hesaplanan aktivite değerleri, toplam protein miktarları ile oranlanarak belirlenmiştir.

$$\text{Katalaz Enzim Aktivitesi } (\mu\text{mol/mg protein}) = \frac{\text{AD } \mu\text{mol/gTA}}{\text{TPM (mg protein/gTA)}}$$

KA : Katalaz Enzim Aktivitesi ( $\mu\text{mol/mg protein}$ )

AD : Aktivite değeri ( $\mu\text{mol/gTA}$ )

TPM : Toplam protein miktarı ( $\text{mg protein/gTA}$ )

### 2.2.3.6. Toplam çözünebilir protein analizi

#### *Toplam Çözünebilir Protein Ekstraksiyonu*

Toplam çözünebilir protein ekstraksiyonu için Gülen (2000)'in uyguladığı yöntem esas alınarak zeytin yaprak ve kabuk örneklerine adapte edilmiştir. Bunun için,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen yaprak ve kabuk örneklerinden 1g tartılarak sıvı azot içerisinde, seramik havan kullanılarak toz haline gelinceye kadar öğütülmüştür. Öğütülmüş örnekler toplam protein ekstraksiyon aşamasına kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Ekstraksiyonun tüm aşamaları  $4^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon solüsyonunu oluşturan bileşenler aşağıda verilmiştir.

Toplam protein ekstraksiyon solüsyonu (Borate Buffer) oluşturan bileşenler;

- 50 mM sodyum tetra borate
- 50 mM askorbik asit
- %1  $\beta$ -mercaptoethanol
- 1mM PMSF
- pH 9.0

Solüsyonun hazırlanmasında 50 mM sodyum tetra borate ile 50 mM askorbik asit karıştırılarak temel solüsyon hazırlanmıştır. Kullanımdan hemen önce ise  $\beta$ -

mercaptoethanol ve PMSF, kullanılacak miktarlardaki solüsyon içerisine belirlenen miktarlarda eklenerek taze solüsyon hazırlanmıştır.

Ayrı bir kapta ise PVPP (polyvinylpolyprolydon) solüsyonu hazırlığı yapılmıştır. Bu amaçla her bir örnek için 0.44 g PVPP tartılmış ve buna 3.52 ml borate solüsyonu eklenerek iyice karıştırılmış ve yarı katı bir hal alması sağlanmıştır.

Toplam çözünebilir protein ekstraksiyonu için bitki dokusu: ekst. solüsyonu: PVPP solüsyonu, 1:5:2 oranında (1 g: 5 ml: 2 g) 36ml'lik santrifüj tüpüne konularak 4 °C'de tüp çalkalayıcıya yerleştirilerek 15 dak süre ile iyice karışması sağlanmıştır.

Daha sonra örnekler 26 000 g devirde 4°C'de 1.5 saat süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda üstteki sıvı kısım filtre edilerek (0.22 µm) alınmış, dipte kalan tortu kısım ise atılmıştır.

#### ***Ekstrakte Edilen Toplam Çözünebilir Protein Miktarının Belirlenmesi***

Toplam çözünebilir protein miktarının belirlenmesinde Gülen (2000) tarafından belirtilen "Bradford Protein Assay" yöntemi kullanılmıştır.

Protein standardı olarak kullanılan 5 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumine), ekstraksiyon solüsyonu (PMSF hariç tutulmuştur) içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Renk değişimi için ise, boya maddesi olarak "Protein Assay Dye" (Bio-Rad, 500-0006) tüm örnekler ve standartlara eklenmiştir. Spektrofotometredeki ('UV-DU 530 model' Beckman Coulter, Inc., Fullerton, Calif) absorbans okumaları örnek ve standartlara boya maddesi eklendikten sonra hızlı bir şekilde 595 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Çizelge 2.6'da örneklerin ve standartların hazırlanması özetlenmiştir. Burada temsili olarak sadece bir örnek hazırlığı verilmiş olup tüm örneklerde aynı yöntem kullanılmıştır. Toplam protein miktarı standartlar esas alınarak mg/gTA olarak hesaplanmıştır.

**Çizelge 2.6. Ekstrakte edilen toplam çözünebilir protein miktarının ‘Bradford Assay’ yöntemine göre belirlenmesi için standart ve örneklerin hazırlanması (Gülen 2000).**

Örnek ve Standartlar	Konsantrasyon $\mu\text{g}$	BSA Standart ( $\mu\text{l}$ )	Ekstraksiyon Solüsyonu ( $\mu\text{l}$ )	HCl ( $\mu\text{l}$ )	dH <sub>2</sub> O ( $\mu\text{l}$ )	Protein Boya Solüsyonu (ml)
A	0	0	10	10	80	3.5
B	10	2	8	10	80	3.5
C	20	4	6	10	80	3.5
D	30	6	4	10	80	3.5
E	40	8	2	10	80	3.5
F	50	10	0	10	80	3.5
Örnek 1	10	-	-	10	80	3.5
	20	-	-	10	70	3.5

### ***Örneklerin SDS-PAGE İçin Hazırlanması***

Ekstraksiyon sonucu elde edilen toplam protein solüsyonundaki proteinin çökeltilmesi için Gülen (2000)’nin önerdiği şekilde bir dizi yıkama ve santrifüj işlemi yapılmıştır. İlk olarak bu solüsyondan mikro santrifüj tüpler içerisine 1ml alınarak üzerine %10 TCA (Tricloro acetic asit) eklenmiş ve iyice vortexlenerek 30 dakika süresince buz içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Böylece proteinleri çökeltmesi sağlanmıştır. İnkübasyon işleminden sonra örnekler, 4°C’de 16 000 rpm devirde 30 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra tüpdeki sıvı kısım atılarak dipteki protein çökeltisi -20°C’de soğutulmuş aseton ile 3 kez yıkanmıştır. Her yıkamadan sonra 4°C de 30 dakika süreyle 16 000 rpm devirde santrifüj edilmiştir. En son aseton yıkamasından sonra ucu kapatılmış bir mikro pipet yardımı ile protein çökeltisi fiziksel olarak parçalanmıştır. Son olarak protein çökeltisinin kuruması ve asetonun buharlaşması için tüplerin ağzı açılarak oda sıcaklığında yaklaşık 12 saat bekletilmiştir. Elde edilen kuru protein çökeltisi, SDS-PAGE de kullanılmak üzere örnek yükleme solüsyonu içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Bu amaçla aşağıda bileşimi verilen Laemmli (1970) solüsyonu (SDS-PAGE için örnek yükleme solüsyonu) kullanılmıştır.

Örnek yükleme solüsyonu bileşenleri

- 65 mM Tris
- %10 Glycerol
- %2 SDS
- pH: 6.8
- %5  $\beta$ -mercaptoethanol
- Boya maddesi (Bromphenol Blue)

Tris, Glycerol, SDS'den oluşan ve 4°C'de muhafaza edilen solüsyondan, kullanımdan hemen önce her bir örnek için 100 $\mu$ l alınmış ve içerisine %5  $\beta$ -mercaptoethanol eklendikten sonra iyice karıştırılmıştır. Bu karışıma renk maddesi olarak eser miktarda "Bromphenol Blue" eklenmiş ve karıştırılmıştır. Bu karışımdan her bir örnek (kuru protein çökeltisi) üzerine 100 $\mu$ l konulmuştur. Örnek tüpleri tüp taşıyıcısına yerleştirilerek kaynar suda 5 dakika bekletildikten sonra vorteks ile iyice karıştırılmıştır. Son olarak da 16 000g devirde ve oda sıcaklığında 30 sn santrifüj edilmiş ve kaset içerisindeki hazırlanmış jel kuyucukları içerisine, her bir örnek için 30 $\mu$ g protein olacak şekilde bir mikropipet yardımıyla dikkatlice konulmuştur.

### ***SDS-PAGE İçin Jel Hazırlanması***

SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamid jel elektroforez) hazırlanmasında Mini Protean III dikey elektroforez sistemi (Bio-Rad) kullanılmıştır. SDS-PAGE %12.5 ayırma jeli ile %4 örnek yükleme jelinden oluşmaktadır. Jel kaseti hazırlanırken jelin kalınlığı 0.75 mm'lik olacak şekilde ayarlanmıştır.

%12.5 ayırma jeli hazırlanmasında kullanılan bileşenler

- |                                      |              |
|--------------------------------------|--------------|
| • 1 M Tris-HCl stok solüsyonu pH 8.8 | 4400 $\mu$ l |
| • %36 Acrylamide/Bis (29:1)          | 4200 $\mu$ l |
| • Saf su                             | 2000 $\mu$ l |
| • %1 SDS stok solüsyonu              | 1200 $\mu$ l |
| • %3 Amonyum persülfat               | 200 $\mu$ l  |
| • TEMED                              | 8 $\mu$ l    |



Yukarıda verilen kimyasallar sırasıyla karıştırıldıktan hemen sonra mikro pipet yardımıyla bu karışımdan 3.5 ml jel kaseti içerisine dökülmüştür. Jelin üzerine 200 µl saf su eklenerek 45 dakika-1 saat süre ile polimerizasyona bırakılmıştır.

% 4 örnek yükleme jeli hazırlanması için kullanılan bileşenler

•Saf su	3325 µl
•1 M Tris stok solüsyonu pH 6.8	620 µl
•%36 Acrylamide/Bis (29:1)	500 µl
•%3 Amonyum persülfat	50 µl
•TEMED	8 µl

Polimerize olmuş ayırma jeli üzerindeki saf su peçete ile alındıktan sonra taraklar takılarak yukarıdaki şekilde hazırlanan % 4 örnek yükleme jeli, ayırma jeli üzerine eklenmiştir. Polimerizasyon için 45 dakika–1 saat süre beklenmiş daha sonra jel elektroforez işlemi için tank içerisine yerleştirilmiştir.

### ***Elektroforez***

SDS-PAGE’de elektroforez solüsyonu olarak aşağıda bileşimi verilen Tris-Glisin-SDS solüsyonu kullanılmıştır.

Elektroforez solüsyonu hazırlamak için kullanılan bileşenler (1l, 10X)

250 mM Tris Solüsyonu	30 g
1.92 Glycine	144 g
%0.5 SDS	5 g

Verilen sıraya göre saf su içerisinde eritilerek iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Kullanım sırasında ise 40 ml stok solüsyon alınarak 400 ml’ye saf su ile tamamlanmıştır. Bu solüsyon elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiş jellerin üzerini örtecek şekilde boşaltılmıştır. Örneklerin jel içerisindeki kuyucuklara enjekte edilmesi bu aşamada yapılmıştır.

Thermo EC 1000–90 güç kaynağı kullanılan elektroforez işlemi sırasında jelle sürekli olarak 250 V ve 40 mA'lık bir elektrik akımı uygulanmış ve örneklerin jelin sonuna kadar ilerlemesi sağlanmıştır (~1,5 saat).

### ***Jelin Boyanması***

Jel üzerindeki toplam protein bantları “Coomassie Brilliant Blue G–250” sistemine göre boyanmıştır.

Elektroforezin tamamlanmasıyla jel kasetten çıkartılmış ve ilk olarak oda sıcaklığında %12'lik TCA içerisinde konarak 2 saat süreyle sabit ve yavaş hızdaki bir çalkalayıcının üzerinde bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda jel üzerindeki proteinlerin fiske edilmesi sağlanmıştır. Jel üzerindeki TCA kalıntılarını uzaklaştırması için jel 3 defa saf su ile yıkanmıştır. Bunu takiben jel metanolda seyreltilmiş comassie blue G–250 (comassie blue G-250:metanol; 4:1) solüsyonuna alınmıştır. Jellerin boyanması için düşük hızda çalışan çalkalayıcı üzerinde gece boyunca boyama işlemi devam ettirilmiştir. Bu işlem sonunda jel üzerinde bulunan protein bantlarının koyu mavi olarak boyandığı görülmüştür. Boya işleminden sonra jel üzerindeki fazla boyanın alınması için % 25'lik metanol içerisinde çalkalayıcı üzerinde ~5 dakika bekletildikten sonra 3 defa saf su ile yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra protein bantların florasan ışık altında görüntüsü alınmış ve jel'in daha sonraki dönemde incelenebilmesi amacıyla 4 °C'de saf su içerisinde muhafaza edilmiştir.

### ***Protein Bantlarının Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi***

Örneklerin elektroforezi sırasında SDS-PAGE moleküler ağırlık standardı kullanılmıştır (Bio-Rad, SDS-PAGE low molecular weight standard). Böylece molekül ağırlıkları bilinen bantlar temel alınıp, jel boyu ölçülerek, bu bantların jel üzerinde başlangıç noktasına uzaklıkları belirlendikten sonra aşağıdaki formüle göre Rf değerleri hesaplanmıştır.

$$R_f = \frac{BU}{JB}$$

- BU : Protein bandının jelin başlangıç noktasına olan uzaklığı  
 JB : Jel boyu (işaret boyasının ilerleme mesafesi)

Elde edilen protein standartlarının Rf değerleri ile bir protein eğrisi elde edilmiş ve buna göre ilgili bantların molekül ağırlıkları excel programından logaritma hesapları yardımıyla saptanmıştır.

### **2.2.3.7. Western blot analizi**

Spesifik dehidrin proteinlerinin belirlenebilmesi amacıyla Arora ve Wisnieswki (1994)'nin önerdiği şekilde western blot analizleri yapılmıştır. Bu analiz için Ocak ve Temmuz aylarına ait örnekler (her iki yıl örnekleri bulk yapılmıştır) kullanılmıştır. Analizler Massachusetts Institute of Technology'de (Cambridge, Massachusetts, U.S.A) Dr. Richard J. Wurtman'ın laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### ***SDS-PAGE ve Elektroforez***

SDS-PAGE ve elektroforez işlemleri "Toplam çözünebilir protein analizi" bölümünde anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Örnek yükleme aşamasında her kuyucuk için 15 µg örnek yüklenmiştir.

#### ***Membranın Hazırlanması***

Transfer basamağı için polivinil diflorid (PVDF) membranlar (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA) 15 dk. metanol içerisinde bekletilerek aktive edilmiştir. Takiben membranlar Blokaj solüsyonu ile yıkanmıştır. Blokaj solüsyonu olarak TBST solüsyonu kullanılmıştır.

TBST solüsyonu bileşenleri (1L, 10X);

- Tris Baz (100 mM) 12.14 g
- NaCl (1.5 M) 87.7 g

- Tween 20 (%0.5) 5 ml

Solüsyonun hazırlanması için yukarıda verilen sıraya göre saf su içerisinde eritilerek iyice karıştırılmış ve 4 °C muhafaza edilmiştir. Kullanım sırasında ise stok solüsyonundan alınarak 1X olarak kullanılmıştır.

### ***Transfer***

Elektroforezi takiben jeller kasetlerinden çıkarılmış ve proteinlerin yürüdüğü yüzlerinin üzerlerine polivinil diflorid (PVDF) membranlar (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA) yeni kasetlere sandaviç sistemi ile yerleştirilmiştir. Sandaviç sistemini hazırlamak için sünger ve filtre kağıtları 1X blokaj solüsyonu ile önceden ıslatılmıştır. Takiben sünger-filtrekağıdı-jel-membran-filtre kağıdı-sünger olacak şekilde ve aralarında hava boşluğu kalmamasına dikkat ederek “sandaviç sistemi” hazırlanarak kasetlere yerleştirilmiştir ve ardından elektroforez tankına konulmuştur. Bu şekilde jellerdeki proteinlerin PVDF membranlara transfer edilmesi amaçlanmıştır. Elektroforez tankı içerisine kasetlerin üzerini örtecek şekilde 1X transfer solüsyonu boşaltılmıştır.

#### Transfer Solüsyonu bileşenleri (1L, 10X)

- Tris Baz (250 mM) 30.3 g
- Glisin (1.92 M) 144.1 g

Kullanım sırasında ise 40 ml stok solüsyon alınarak 400 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır. Transfer basamağında elektroforez cihazının güç kaynağının voltajı 200 milivolt'a, akımı ise 475'e ayarlanmıştır ve bu basamak 1 saat sürmüştür.

### ***Blokaj***

Transfer basamağının bitiminde PVDF membranlar TBST solüsyonunda çözülen %3'lük jelatin içinde 30 dakika kadar inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemin amacı membran üzerinde dehidrin antikorumun proteinler haricinde bağlanabileceği spesifik

olmayan bağlanma bölgelerini bloke etmektir. Bu sürenin sonunda membranlar yoğun jelatin kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla TBST solüsyonunda çözölen %1'lik jelatin ile 5 kez yıkanmıştır.

### ***Birinci antikor uygulaması***

Blokaj işleminin sonra membranlar TBST solüsyonunda çözölen tavşan dokularında üretilmiş birincil antikor olan anti-dehidrin (1/1000) (Kaliforniya üniversitesi öğretim üyesi Dr. T. J. Close'dan tedarik edilmiştir) içerisinde +4°C'de 1 gece süresince inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda membranlar birincil antikor kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla TBST solüsyonunda çözölen %1'lik jelatin ile 5 kez yıkanmıştır.

### ***İkinci antikor uygulaması***

Birinci antikor uygulamasının sonra membranlar TBST solüsyonunda çözölen (1/5000) tavşan proteinlerine karşı geliştirilmiş peroksidaz-bağımlı ikinci antikor (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) ile 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun bitiminde membranlar tekrar TBST solüsyonunda çözölen %1'lik jelatin ile 5 kez yıkanmıştır.

### ***Bantların Görüntülemesi***

Her iki antikor uygulamasının ardından membranlarda imminoreaktif bantların görüntülenmesi amacıyla ELC (Enhanced Chemiluminescence System) sistemi kullanılmıştır. Bu sistem için geliştirilmiş kitte (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA bulunan) bulunan ve protein-antikor komplekslerinin kemiluminesans vermesini sağlayan solüsyonlarda 1 dakika süre ile inkübe edilmiş ve ardından film kasetlerine aktarılmıştır. Takiben karanlık oda koşullarında üzerlerine fotoğraf filmleri yerleştirilmiştir (Kodak X-AR). Bu şekilde membranlar üzerindeki protein bantları fotoğraf filmlerine aktarılmıştır.

### ***Bantların densitometrik analizi***

Filmler üzerindeki ortaya çıkan immunoreaktif bant görüntüleri bir tarayıcı (UMAX Technologies, Fremont, CA, USA) yardımıyla dijital ortama aktarılmıştır. Bantların densitometrik analizleri ise Amerikan Sağlık Enstitüsü'nün yayınladığı "Image J" adlı program (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) yardımıyla yapılmıştır.

#### **2.2.4. İstatistiksel analizler**

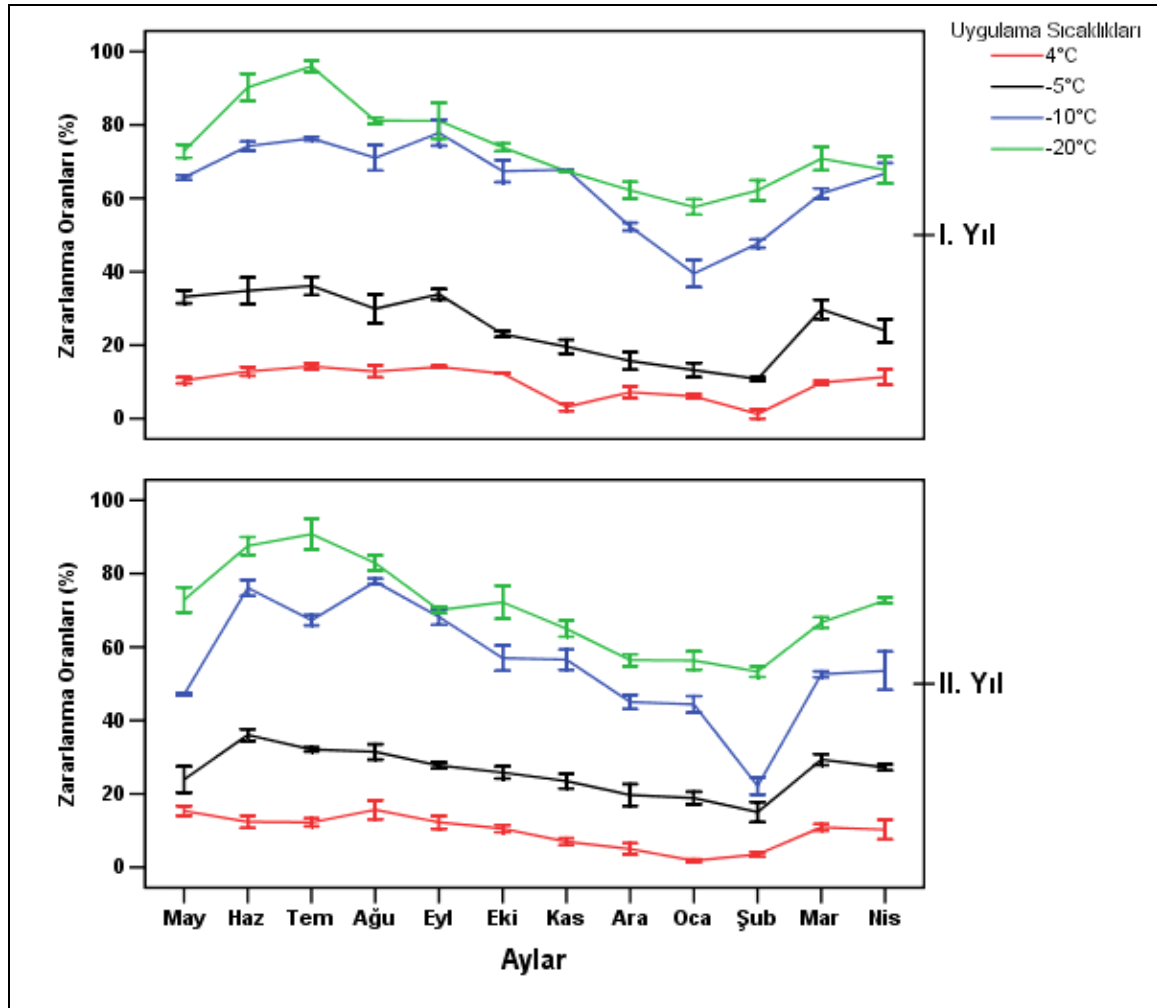
Deneme "Tesadüf Parselleri" deneme desenine göre 3 tekerürlü olarak yürütülmüştür. Araştırmadan elde edilen tüm sonuçlar "SPSS 1.3 for Windows" paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Uygulama ortalamalarının farklılıkları, "Duncan" testi ile ortaya konulmuştur.

### 3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

#### 3.1. Hüresel Membran Zararının Belirlenmesi

##### 3.1.1. Yapraklarda hüresel membran zararının belirlenmesi

“Gemlik” zeytin çeşidi’nin yaprak örneklerinde yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre zararlanma oranlarının değişimi Şekil 3.1 ve Çizelge 3.1’de görülmektedir.



Şekil 3.1. “Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre zararlanma oranları. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  SS'lerini göstermektedir.

Yıllar itibariyle genel olarak, 4°C düşük sıcaklık uygulamasında yapraklarda bir uyum söz konusu iken bazı aylarda istatistiki açıdan farklılıklar bulunmuştur. Buna göre; Mayıs ayından Ekim ayına kadar aşağı yukarı aynı oranda zararlanma görülürken, Ekim ayından itibaren azalma eğilimi olduğu tespit edilmiştir. En düşük membran zararlanması ikinci yılda Ocak ayında (%1.83) ve her iki yılda Şubat ayında (%1.25 ve %3.52) belirlenmiştir. Mart ve Nisan aylarında ise zararlanma oranlarında tekrar artış görülmüştür. Mayıs, Kasım ve Ocak aylarındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli bulunmuştur.

Yıllar itibariyle, -5°C uygulamasında zararlanma oranlarında bir uyum söz konusudur. Buna göre; zararlanma oranları Ekim ayına kadar genel olarak aynı seviyelerde devam ederken, Ekim ayından itibaren doğrusal olarak azalmıştır. En düşük zararlanma oranları birinci yılda %13.23 ile Ocak ayı; ikinci yılda ise %10.77 ile Şubat ayı'nda tespit edilmiştir. Her iki deneme yılında da zararlanma oranları açısından Mart ve Nisan aylarında belirgin bir artış dikkati çekmektedir. Yıllar arasında Mayıs ve Ekim aylarındaki farklılık istatistiki açıdan önemli görülmüştür.

Yıllar itibariyle -10°C uygulamasında zararlanma oranlarında artış ve azalış eğilimleri farklı olmuştur. Buna göre; zararlanma oranları Haziran ayında Mayıs ayına göre belirgin olarak yükselmiştir. Bu zararlanma seviyesi Eylül ayına kadar birinci deneme yılında aşağı yukarı aynı kalmıştır. Ekim ayından itibaren azalış eğilimi başlayarak Şubat ayına kadar devam etmiştir. İkinci deneme yılında ise, Temmuz ayındaki bir azalıştan sonra Ağustos ayında tekrar artarak Haziran ayı seviyesine ulaşmıştır. Eylül ayından itibaren ise, Şubat ayına kadar bir azalış eğilimi belirlenmiş, özellikle de Şubat ayındaki keskin azalış dikkat çekici bulunmuştur. Bu uygulama itibariyle en yüksek zararlanma oranı birinci yılda Eylül ayında (%76.33), ikinci yılda Ağustos ayında (%77.83); en düşük zararlanma oranları ise birinci yılda Ocak ayında (%39.53), ikinci yılda Şubat ayında (%22.16) tespit edilmiştir. Her iki deneme yılında da Mart ve Nisan aylarında hava sıcaklıklarının artmasına paralel olarak (Şekil 2.2) zararlanma oranlarında tekrar artış görülmüştür.



Her iki deneme yılı sonuçları değerlendirildiğinde, -20°C düşük sıcaklık uygulamasında yıllar arasında genel olarak bir uyum söz konusu iken Eylül ve Şubat aylarında istatistiki açıdan farklılıklar tespit edilmiştir. Buna göre, yapraklarda membran zararlanması her iki deneme yılında da Haziran ve Temmuz aylarında belirgin olarak artmış (%87.54 - %95.95) Ağustos ayından itibaren Ocak, Şubat aylarına kadar doğrusal bir azalış göstererek en düşük değerlerine (birinci deneme yılında Ocak ayında %57.63; ikinci deneme yılında Şubat ayında %53.29) ulaşmıştır. Mart ve Nisan aylarında ise, yapraklarda diğer düşük sıcaklık uygulamalarında olduğu gibi zararlanma oranları açısından belirgin bir artış görülmüştür. Bu uygulama sıcaklığında zararlanma oranları tüm aylarda %50'nin altına düşmemiştir.

“Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların zararlanma oranlarına etkileri Çizelge 3.1'de görülmektedir. Çizelge incelendiğinde; yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların zararlanma oranlarına etkileri istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Uygulama sıcaklıkları düştükçe yapraklarda zararlanma düzeyinin arttığı görülmektedir. Buna göre, en yüksek zararlanma oranı -20°C'de (% 72.20) belirlenirken, en düşük zararlanma oranı ise olarak 4 °C'de (% 9.84) tespit edilmiştir. Aylar itibariyle ise yapraklarda zararlanmanın genel olarak yaz aylarında kış aylarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna göre en yüksek zararlanma oranları Haziran ve Temmuz aylarında sırasıyla % 52.89 ve %51.27; en düşük zararlanma oranları Ocak ve Şubat aylarında sırasıyla %29.06 ve %27.56 olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla, zararlanma oranı üzerine ayların, önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Yıl, sıcaklık ve aylar arasındaki tüm interaksiyonlar önemli bulunmuştur (Ek-1).

### **3.1.2. Kabuklarda hücresel membran zararının belirlenmesi**

“Gemlik” zeytin çeşidi'nde kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre zararlanma oranlarının değişimi Şekil 3.2 ve Çizelge 3.1'de görülmektedir.

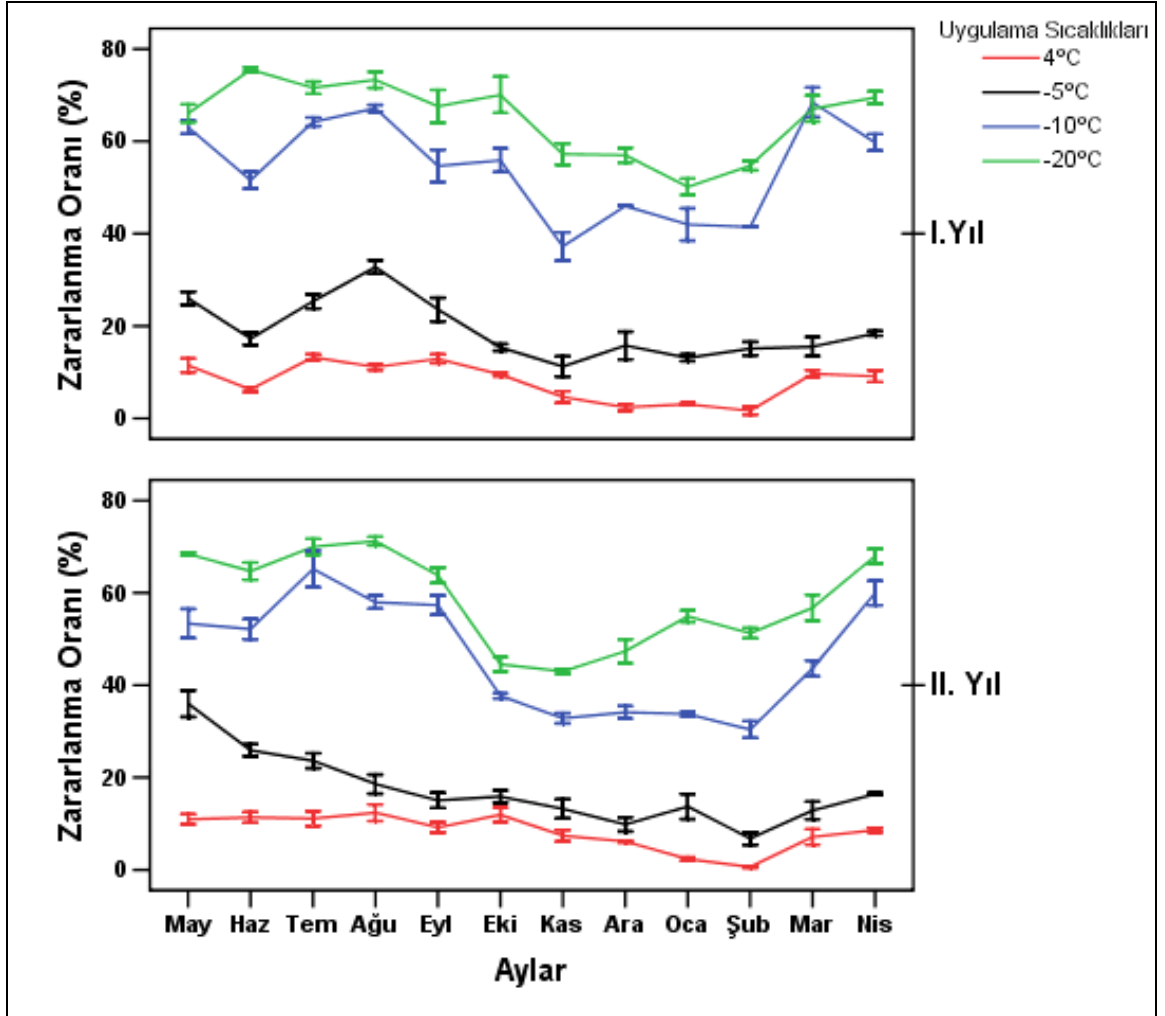
**Çizelge 3.1.”Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda ve kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre zararlanma oranları**

<b>Zararlanma Oranı (%)</b>		
<b>Değişkenler</b>	<b>Yaprak</b>	<b>Kabuk</b>
<b>Yıl</b>		
1. Yıl	42.89 <sup>aZ</sup>	36.10 <sup>a</sup>
2. Yıl	40.11 <sup>b</sup>	31.48 <sup>b</sup>
<b>Uygulamalar</b>		
4°C	9.84 <sup>d</sup>	8.03 <sup>d</sup>
-5°C	25.65 <sup>c</sup>	17.98 <sup>c</sup>
-10°C	60.81 <sup>b</sup>	51.56 <sup>b</sup>
-20°C	72.20 <sup>a</sup>	61.88 <sup>a</sup>
<b>Aylar</b>		
Mayıs	43.49 <sup>d</sup>	42.38 <sup>a</sup>
Haziran	52.89 <sup>a</sup>	36.94 <sup>b</sup>
Temmuz	51.27 <sup>ab</sup>	42.08 <sup>a</sup>
Ağustos	50.34 <sup>bc</sup>	43.06 <sup>a</sup>
Eylül	48.16 <sup>c</sup>	35.07 <sup>b</sup>
Ekim	43.62 <sup>d</sup>	24.55 <sup>ef</sup>
Kasım	36.13 <sup>f</sup>	32.24 <sup>c</sup>
Aralık	33.56 <sup>g</sup>	27.13 <sup>d</sup>
Ocak	29.06 <sup>h</sup>	25.61 <sup>de</sup>
Şubat	27.56 <sup>h</sup>	23.00 <sup>f</sup>
Mart	38.72 <sup>e</sup>	36.36 <sup>b</sup>
Nisan	40.01 <sup>e</sup>	35.99 <sup>b</sup>
<b>ANOVA</b>		
Yıl x Ay	*	*
Yıl x Sıcaklık	*	*
Ay x Sıcaklık	*	*
Yıl x Sıcaklık x Ay	*	*

<sup>Z</sup> Aynı sütun ve değişkenlerde farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında %5 düzeyinde farklılık vardır (Duncan).

ÖD, \* %5 düzeyinde sırasıyla önemli değil ve önemli.

Yıllar arasında genel olarak 4°C’de bir uyum söz konusu iken Haziran, Eylül ve Aralık aylarında istatistiki açıdan farklılıklar tespit edilmiştir. Buna göre, membranlarda gerek yıllara ve gerekse aylara göre zararlanma oranı genel olarak düşük (%12 ve altında) bulunmuştur. Öte yandan bahar ve yaz aylarında zararlanma aşağı yukarı aynı seviyelerde iken kış aylarına doğru (Kasım ayından itibaren) keskin bir biçimde azalarak her iki deneme yılında da Şubat ayı (%1.67 ve %0.63) itibariyle en düşük seviyelere ulaşmıştır.



Şekil 3.2. "Gemlik" zeytin çeşidinde kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre zararlanma oranları. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  SS'lerini göstermektedir.

Genel olarak,  $-5^{\circ}\text{C}$  düşük sıcaklık uygulamasında kabuklarda yıllar arasında uyum söz konusudur. Ancak bazı aylarda farklılıklar görülmüştür. Buna göre; birinci deneme yılında en yüksek zararlanma oranı %32.77 ile Ağustos ayında saptanırken bu aydan sonra zararlanma kademeli olarak azalmıştır. İkinci deneme yılında ise, en yüksek zararlanma Mayıs ayında (%26.05) belirlenmiş; Haziran ve Temmuz aylarında ise, aynı oranlarda zararlanma tespit edilmiştir. Ağustos ayından itibaren zararlanma oranı azalma eğilimine girerek Şubat ayında en düşük seviyesine (%6.79) ulaşmıştır. Her iki deneme yılında da Mart ve Nisan aylarında zararlanma seviyesinde tekrar artış belirlenmiştir.

Şekil 3.2'den de anlaşılacağı gibi,  $-10^{\circ}\text{C}$ 'de iki deneme yılı arasında zararlanma oranları bakımından farklılıklar bulunmakla beraber, temel olarak aylara göre

zararlanma oranlarının değişiminde bir paralellik olduğu dikkati çekmektedir. Buna göre; birinci deneme yılında Haziran ayında zararlanma oranı azalmış; Temmuz, Ağustos aylarında tekrar artarak en yüksek seviyelere (%67.15) ulaşmıştır. Eylül ve Ekim ayından sonra ise, zararlanma oranı azalma eğilimine girerek Ocak ve Şubat aylarında en düşük zararlanma oranı (%41.98- %41.44) belirlenmiştir. Mart ayından itibaren zararlanma tekrar artarak Nisan ayında %57.76 olarak saptanmıştır. İkinci deneme yılında, Mayıs ve Haziran ayları aynı seviyelerde kalmış, Temmuz ayındaki (%65.17) yükselme ile birlikte zararlanma en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Bu ayı takiben Ağustos ve Eylül aylarında aynı seviyede seyretmiştir. Özellikle Ekim ayındaki azalış dikkate değer görülmüştür. Düşük zararlanma seviyeleriyle Kasım, Aralık, Ocak ve Şubat ayları aşağı yukarı aynı oranlarda seyretmiştir. Kabuklarda Mart ve Nisan aylarında zararlanma seviyesinde belirgin bir artış görülmekle beraber birinci deneme yılındaki atış daha göze çarpıcıdır.

Yıllar itibariyle genel olarak, -20°C düşük sıcaklık uygulamasında kabuklarda bir uyum söz konusu iken bazı aylarda istatistiki açıdan farklılıklar tespit edilmiştir. Buna göre; zararlanma Mayıs ayından Eylül ayına kadar %65'in üzerinde iken Ekim ayında birinci yılda aynı seviyelerde seyretmiş ancak ikinci yılda keskin bir azalış meydana gelmiştir. Bu aydan sonra birinci deneme yılında Kasım-Aralık ayları %57.22 ve %50.15 oranlarında; Ocak-Şubat aylarında ise %50.15 ve %54.74 oranlarında membran zararlanması oluşmuştur. İkinci deneme yılında ise, Kasım ve Şubat ayları arasında kalan dönemde %42.99-%51.26 oranlarında zararlanma saptanmıştır. Mart ayından itibaren zararlanma oranlarında her iki deneme yılında da belirgin bir artış olduğu görülmüştür.

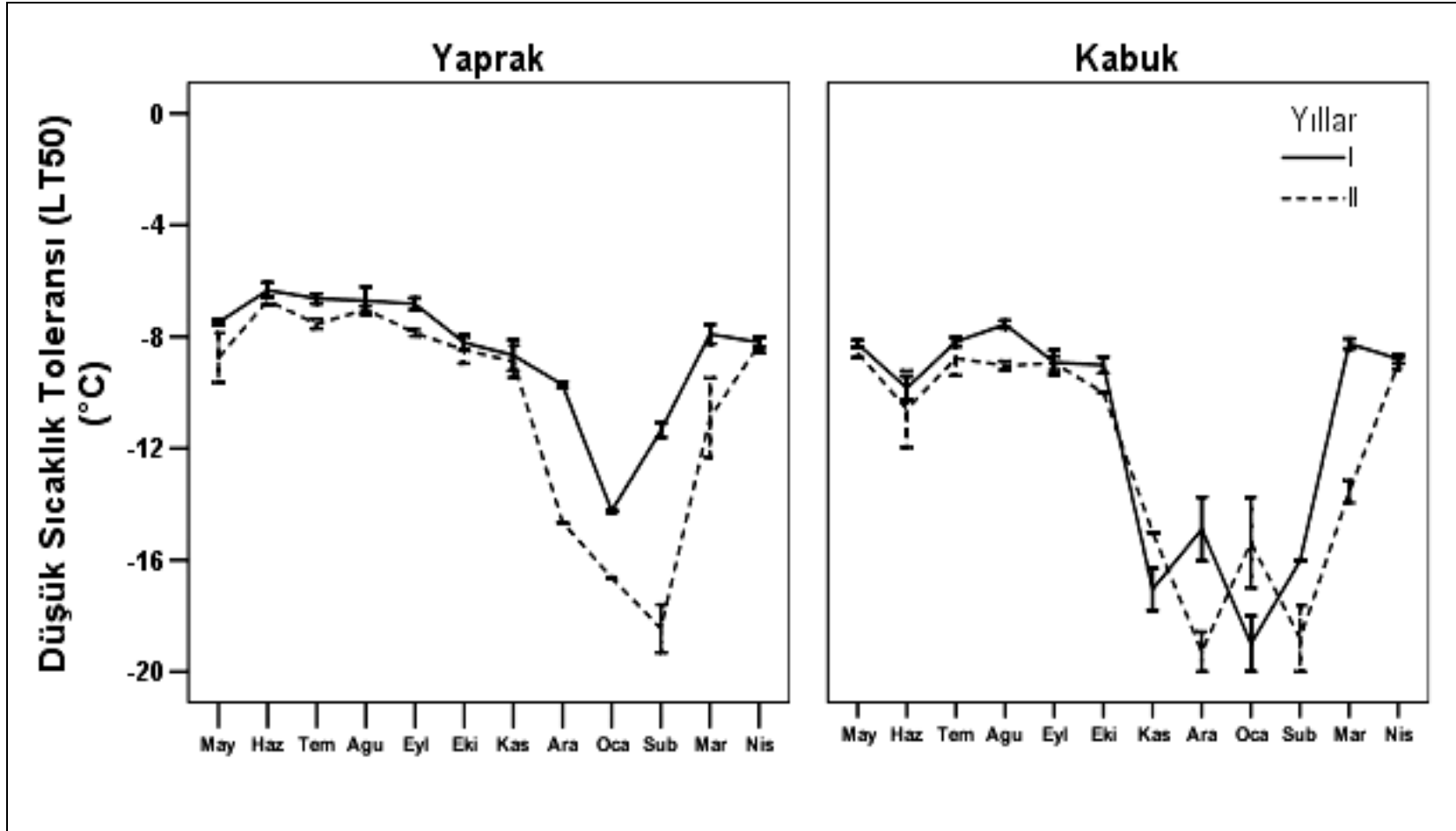
“Gemlik” zeytin çeşidi'nde kabuklarda yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların zararlanma oranlarına etkileri Çizelge 3.1'de görülmektedir. Çizelge incelendiğinde; yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların zararlanma oranlarına etkileri istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Uygulama sıcaklıkları düşükçe kabuklarda zararlanma düzeyinin arttığı görülmektedir. Buna göre, en yüksek membran zararlanması -20 °C'de (% 61.88) belirlenirken, 4 °C'de en düşük olarak (% 8.03) tespit edilmiştir. Kabuklarda aylar itibariyle ise zararlanmanın genel olarak yaz aylarında kış

aylarına göre daha yüksek olduğu açıkça görülmektedir. Buna göre en yüksek zararlanma oranları Temmuz ve Ağustos aylarında sırasıyla %42.08 ve %43.06 olarak belirlenirken, en düşük Ekim, Ocak ve Şubat aylarında sırasıyla %24.55, %25.61 ve %23.00 olarak gerçekleşmiştir. Dolayısıyla, zararlanma oranı üzerine ayların, önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Yıl, sıcaklık ve aylar arasındaki tüm interaksiyonlar önemli bulunmuştur (Ek-2).

### **3.2. Düşük Sıcaklık Toleransı (LT<sub>50</sub>)**

#### **3.2.1. Yapraklarda düşük sıcaklık toleransı (LT<sub>50</sub>)**

Deneme boyunca “Gemlik” zeytin çeşidinde aylık olarak yapraklarda düşük sıcaklık toleransının değişimi Şekil 3.3 ve Çizelge 3.2’de görülmektedir. Buna göre; hava sıcaklıklarının düşmesine paralel olarak (Şekil 2.2) bitkinin soğuğa uyum sağlaması ile birlikte düşük sıcaklık toleransında da belirgin şekilde arttığı görülmektedir. Her iki deneme yılında da yapraklarda, düşük sıcaklık toleransı yaz aylarından başlayarak kış aylarının sonuna kadar artmış, takiben bahar ve yaz aylarında hava sıcaklıklarının artması ile ilişkili olarak kademeli bir düşüş gerçekleşmiştir. Çizelge 3.4’de görülebileceği gibi; her iki deneme yılının ortalamalarına göre, düşük sıcaklık toleransı Ocak (-15.44°C) ve Şubat (-14.90°C) aylarında en yüksek iken Haziran (-6.52°C) ve Ağustos (-6.86°C) aylarında en düşük olmuştur. Yıllara ve aylara göre yaprakların LT<sub>50</sub>’leri arasında istatistikî olarak fark tespit edilmiştir (Ek-3).



Şekil 3.3. “Gemlik” zeytin çeşidinde yıllara, aylara göre yaprak ve kabuklarda düşük sıcaklık toleransının (LT<sub>50</sub>) değişimi. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  SS’larını göstermektedir.

**Çizelge 3.2. “Gemlik” zeytin çeşidi’nde yaprak ve kabuklarda yıllara ve aylara göre düşük sıcaklık toleransının (LT<sub>50</sub> - °C) değişimi.**

Değişkenler	Düşük Sıcaklık Toleransı (LT <sub>50</sub> ) (°C)	
	Yaprak	Kabuk
<b>Yıl</b>		
1. Yıl	-8.36 <sup>az</sup>	-10.76 <sup>a</sup>
2. Yıl	-10.13 <sup>b</sup>	-11.73 <sup>b</sup>
<b>Aylar</b>		
Mayıs	-7.99 <sup>b</sup>	-8.38 <sup>a</sup>
Haziran	-6.52 <sup>a</sup>	-10.22 <sup>b</sup>
Temmuz	-7.08 <sup>ab</sup>	-8.47 <sup>a</sup>
Ağustos	-6.86 <sup>a</sup>	-8.30 <sup>a</sup>
Eylül	-7.34 <sup>ab</sup>	-8.93 <sup>a</sup>
Ekim	-8.34 <sup>b</sup>	-9.41 <sup>ab</sup>
Kasım	-8.78 <sup>bc</sup>	-16.03 <sup>c</sup>
Aralık	-11.69 <sup>d</sup>	-16.65 <sup>c</sup>
Ocak	-15.44 <sup>c</sup>	-17.19 <sup>c</sup>
Şubat	-14.90 <sup>e</sup>	-17.42 <sup>c</sup>
Mart	-9.40 <sup>c</sup>	-10.37 <sup>b</sup>
Nisan	-8.24 <sup>b</sup>	-8.87 <sup>a</sup>
<b>ANOVA</b>		
Yıl x Ay	*	*

<sup>z</sup> Aynı sütun ve değişkenlerde farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında %5 düzeyinde farklılık vardır (Duncan).

ÖD, \* %5 düzeyinde sırasıyla önemli değil ve önemli.

### 3.2.2. Kabuklarda düşük sıcaklık toleransı (LT<sub>50</sub>)

“Gemlik” zeytin çeşidi’nde kabuklarda deneme süresince aylık olarak düşük sıcaklık toleransının değişimi Şekil 3.3 ve Çizelge 3.2’de görülmektedir. Kabukların düşük sıcaklık toleransı; Mayıs ayında ~ -8°C iken, birinci deneme yılında Ocak ve ikinci deneme yılında Aralık ayında ~ -18°C’ye yükselmiş, takiben Nisan ayında her iki deneme yılında tekrar ~ -8 °C’ye düşmüştür. Elde edilen verilere göre kabuklarda en yüksek düşük sıcaklık toleransı Kasım-Şubat ayları arasında (~ -17°C), en düşük düşük sıcaklık toleransı Mayıs-Eylül ayları arasında (~ -8°C) (Haziran hariç) saptanmıştır. Yıllara ve aylara göre kabukların LT<sub>50</sub>’leri arasında istatistikî olarak fark tespit edilmiştir (Ek-4).

### 3.3. Çözünebilir Şeker Analizleri

#### 3.3.1. Toplam çözünebilir şeker içeriği

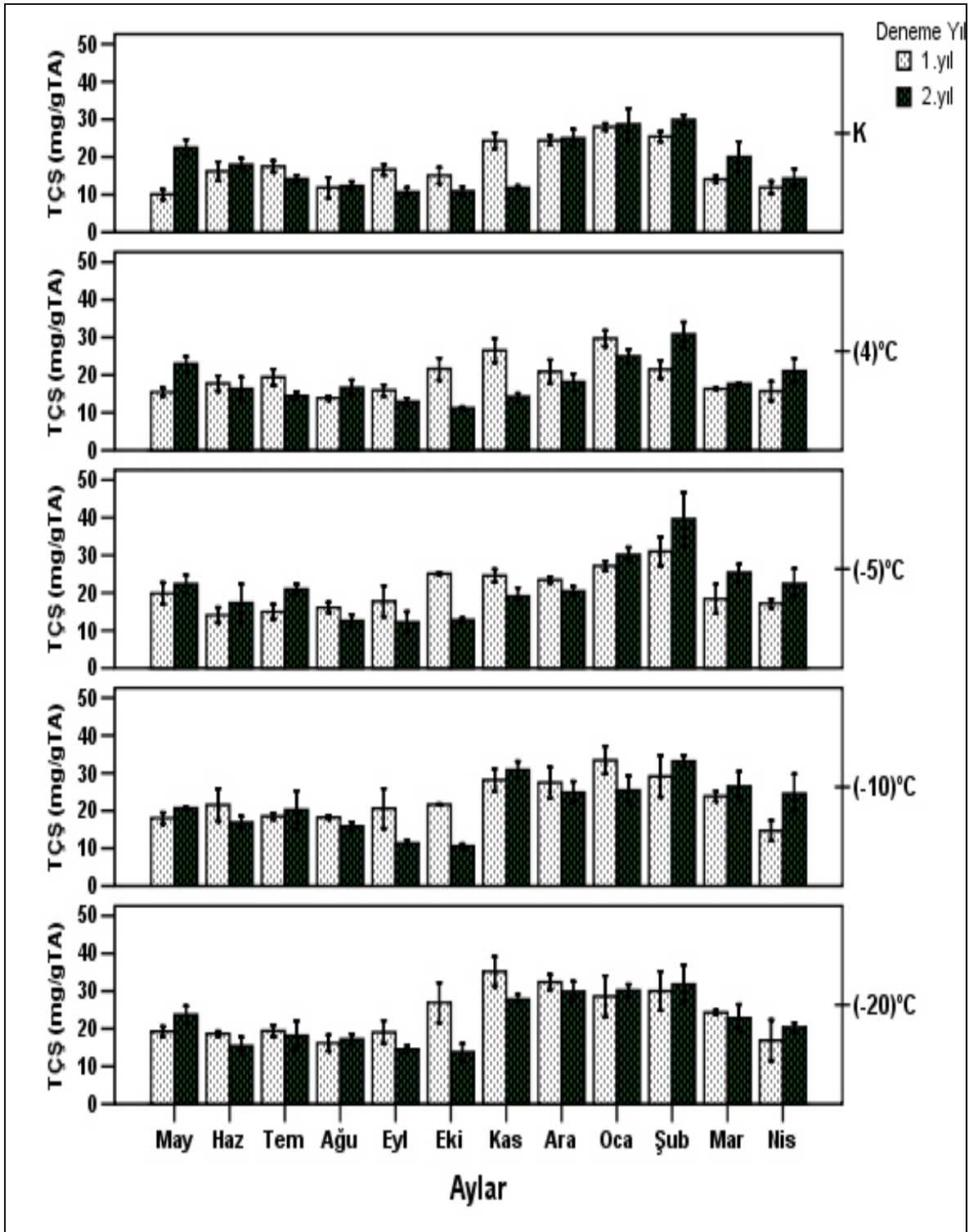
##### 3.3.1.1. Yapraklarda toplam çözünebilir şeker içeriği

“Gemlik” zeytin çeşidi’inde yapraklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre toplam çözünebilir şeker (TÇŞ) içeriğinin değişimi Şekil 3.4 ve Çizelge 3.3’de görülmektedir.

Şekil 3.4 incelendiğinde anlaşılacağı gibi, yapraklarda kontrol grubunda TÇŞ içeriği birinci deneme yılı itibariyle Mayıs ayından Kasım ayına kadar hafif dalgalanmış ancak bu aylarda sonbahar ve kış aylarına göre düşük seviyelerde seyretmiştir. Kasım ayından itibaren keskin bir yükseliş göstererek en yüksek TÇŞ içeriği Ocak (27.99 mg/gTA) ayında tespit edilmiştir. Şubat ayında toplam çözünebilir şeker içeriğinde bir miktar azalma gerçekleşse de bu seviye kış aylarındaki yüksek seviyelerde kalmıştır. İkinci deneme yılında ise, Mayıs ayından Ağustos ayına kadar doğrusal azalan TÇŞ içeriği, Ağustos ayından Aralık ayına kadar stabil durumda kalmıştır. İkinci deneme yılı itibariyle keskin yükseliş Aralık ayında gerçekleşmiş ve birinci deneme yılına paralel olarak kış aylarını yüksek TÇŞ içeriği ile sürdürmüştür. Her iki deneme yılında da Mart ayından itibaren düşüş saptanmış ancak birinci deneme yılındaki azalış daha dikkat çekici bulunmuştur.

Yıllar itibariyle 4°C uygulamasında zararlanma oranlarında artış ve azalış eğilimleri bahar aylarına kadar birbirinden farklı olmuştur. Buna göre; birinci deneme yılında TÇŞ içeriği, Mayıs ayından itibaren Ekim ayına kadar aşağı yukarı aynı seviyelerde kalmış, Ekim ayından itibaren ise bir artış belirlenmiştir. Takiben TÇŞ içeriği kış aylarında dalgalı bir seyir izleyerek Ocak ayında (29.68 mg/gTA) en yüksek seviyeye ulaşmış, Mart ve Nisan aylarında ise, azalma eğilimi gözlenmiştir. İkinci deneme yılında Haziran ayından itibaren düşüş eğilimine giren TÇŞ içeriği en düşük Ekim ayında (11.21 mg/gTA) tespit edilmiş, Kasım ayından itibaren kademeli yükseliş saptanmış; en yüksek seviye Şubat





Şekil 3.4. “Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda yıllara, aylara ve sıcaklıklara göre toplam çözünebilir şeker içeriğinin (TÇŞ-mg/gTA) değişimi. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  SS’lerini göstermektedir.

ayında (30.80 mg/gTA) tespit edilmiştir. Birinci deneme yılında olduğu gibi ikinci yılda da TÇŞ içeriğinde Mart, Nisan aylarında keskin düşüş belirlenmiştir.

Genel olarak -5°C düşük sıcaklık uygulamasında yapraklarda yıllar arasında uyum söz konusudur. Ancak bazı aylarda farklılıklar görülmüştür. Buna göre; her iki deneme yılında da TÇŞ içeriği Haziran ayındaki azalışın ardından Eylül-Ekim aylarında kadar aynı seviyelerde seyretmiş, birinci deneme yılında Ekim ayından; ikinci deneme yılında Kasım ayından itibaren yükseliş eğilimine girmiştir. Bu uygulama itibariyle; en yüksek TÇŞ içeriği birinci deneme yılında Ocak ve Şubat ayları (sırasıyla 27.16 ve 31.00 mg/gTA), ikinci deneme yılında Şubat ayında (39.61 mg/gTA) belirlenmiştir. Her iki deneme yılında birbirine paralel olarak Mart, Nisan aylarında düşüş eğilimi saptanmıştır.

-10°C düşük sıcaklık uygulamasında birinci deneme yılında Mayıs ayından itibaren Ekim ayına kadar aynı seviyelerde seyreden TÇŞ içeriğinde, Kasım ayından itibaren bir yükselme olduğu gözlenmiş, ve bu seviyelerde aşağı yukarı Şubat ayına kadar devam etmiştir. Mart, Nisan aylarına gelindiğinde ise, diğer uygulamalarda olduğu gibi düşüş eğilimi gözlenmiştir. İkinci deneme yılında birinci yılda olduğu gibi Mayıs ayından Ağustos ayına kadar aynı seviyelerde seyretmiş, Eylül-Ekim aylarında düşüş eğilimine girerek en düşük TÇŞ içeriği saptanmıştır. Takiben Kasım ayında görülen yükseliş önemli bulunmuştur. Birinci deneme yılına paralel olarak bu yılda da kış ayları boyunca yüksek seyreden TÇŞ içeriği Mart ayından itibaren bir miktar azalmıştır.

-20°C düşük sıcaklık uygulamasında genel olarak yıllar arasında uyum söz konusudur. Ancak bazı aylarda farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Buna göre; TÇŞ içeriği yaz aylarında aşağı yukarı aynı seviyelerde seyrederken birinci deneme yılında Ekim ayında, ikinci deneme yılında Kasım ayından itibaren artış eğilimi belirlenmiştir. Kış aylarında diğer mevsimlere göre yüksek seyir izleyen TÇŞ içeriği Mart ayından itibaren düşüş eğilimine girmiştir. Bu uygulama itibariyle özellikle ikinci yılda Kasım ayındaki belirgin artış dikkate değer görülmüştür.

“Gemlik” zeytin çeşid’inde yapraklarda yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların TÇŞ içeriği üzerine etkileri Çizelge 3.3’de görülmektedir. Çizelge incelendiğinde; düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların etkileri önemli, yılların etkisi ise, istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur. TÇŞ içeriği uygulama sıcaklıklarının düşmesi ile birlikte artış göstermiştir. Buna göre, en yüksek TÇŞ içeriği aynı istatistiki grupta yer alan  $-10^{\circ}\text{C}$  (22.53 mg/gTA) ve  $-20^{\circ}\text{C}$  (23.02 mg/gTA) uygulamalarında, en düşük TÇŞ içeriği ise yine aynı istatistiki grupta yer alan kontrol (17.86mg/gTA) ve  $4^{\circ}\text{C}$  (18.99mg/gTA) uygulamalarına ait örneklerde belirlenmiştir. Aylar itibariyle incelenecek olursa; düşük sıcaklıklara mukavemetin az olduğu bahar ve yaz aylarında TÇŞ içeriği kış aylarına göre daha düşük olduğu açıkça görülmektedir. Buna göre en düşük TÇŞ içeriği Ağustos (15.19 mg/gTA) ve Eylül aylarında (15.17 mg/gTA) belirlenirken, en yüksek TÇŞ içeriği Ocak (28.61 mg/gTA) ve Şubat (29.87 mg/gTA) aylarında belirlenmiştir. Dolayısıyla, TÇŞ içeriği üzerine aylar ve sıcaklıklar önemli bir etkiye sahip olmuştur. Yıl\*Ay interaksyonları istatistiki olarak önemli, Yıl\*Sıcaklık, Ay\*Sıcaklık ve Yıl\*Sıcaklık\*Ay arasındaki interaksyonlar ise önemsiz bulunmuştur (Ek-5).

### **3.3.1.2. Kabuklarda toplam çözünebilir şeker içeriği**

“Gemlik” zeytin çeşidi’nde kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre TÇŞ içeriğinin değişimi Şekil 3.5 ve Çizelge 3.3’de görülmektedir.

Kontrol grubu kabuk örneklerinde, her iki deneme periyodunda TÇŞ içeriği yaz aylarında düşük bulunurken, genel olarak kış aylarında en yüksek miktarlarda saptamıştır. Öte yandan, sonbahar aylarında bir yükseliş; bahar aylarının başlangıcından itibaren ise her iki deneme yılında bir düşüş olduğu gözlenmiştir. Örneğin, birinci deneme yılında Ağustos ayında TÇŞ içeriği 13.77 mg/gTA iken bu miktar Kasım’da 21.38 mg/gTA; Şubat’ta 27.55 mg/gTA ve Mart’ta da 18.15 mg/gTA olarak saptanmıştır.

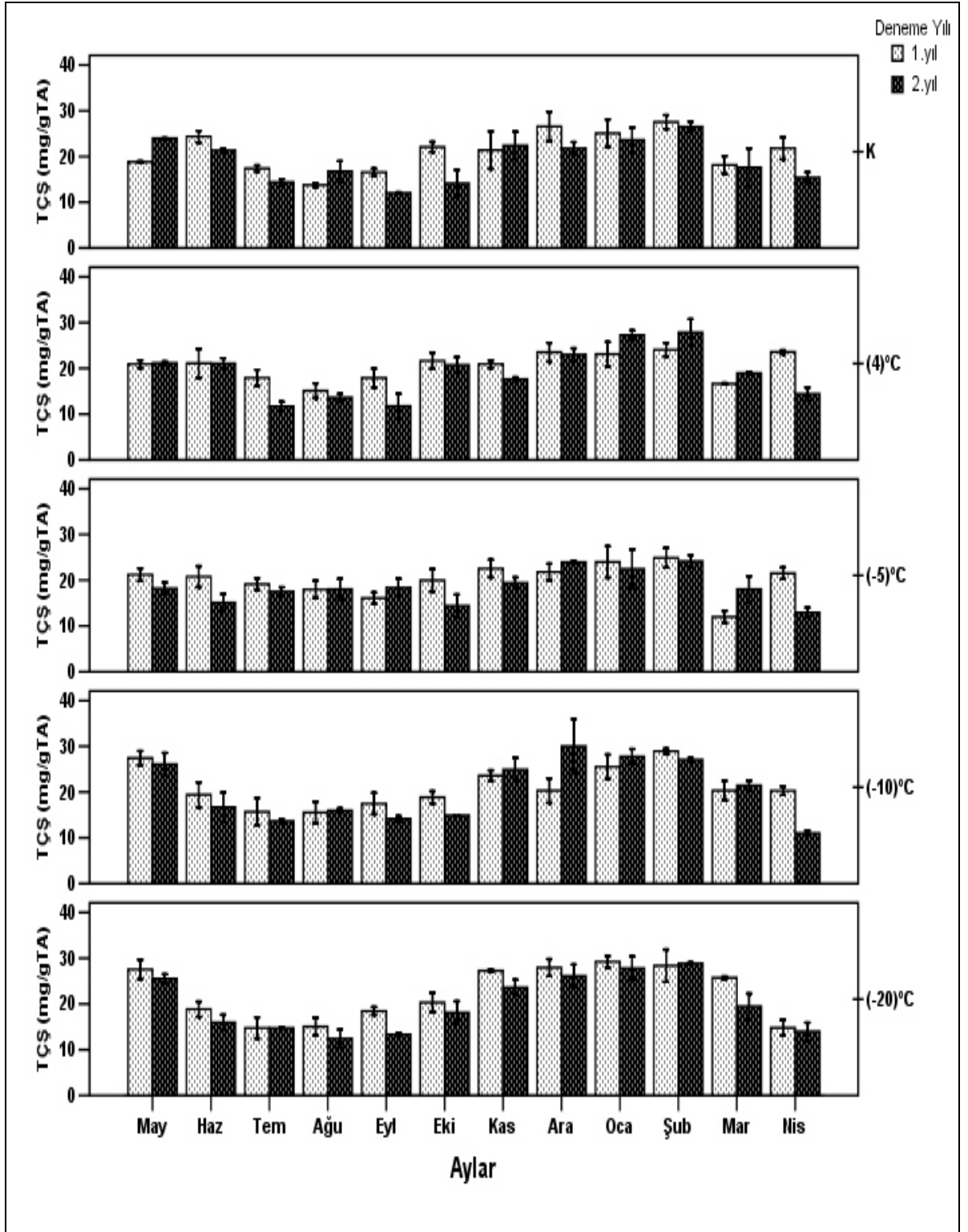
**Çizelge 3.3. “Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda ve kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre toplam çözünebilir şeker içeriği (mg/gTA)**

Değişkenler	Toplam Çözünebilir Şeker İçeriği (mg/gTA)	
	Yaprak	Kabuk
<b>Yıl</b>		
1. Yıl	21.06 <sup>aZ</sup>	21.06 <sup>a</sup>
2. Yıl	20.21 <sup>a</sup>	19.42 <sup>b</sup>
<b>Uygulamalar</b>		
Kontrol	17.86 <sup>c</sup>	20.14 <sup>abc</sup>
4°C	18.99 <sup>c</sup>	19.82 <sup>bc</sup>
-5°C	20.62 <sup>b</sup>	19.28 <sup>c</sup>
-10°C	22.53 <sup>a</sup>	20.71 <sup>ab</sup>
-20°C	23.02 <sup>a</sup>	21.17 <sup>a</sup>
<b>Aylar</b>		
Mayıs	19.38 <sup>cd</sup>	23.09 <sup>cd</sup>
Haziran	17.21 <sup>de</sup>	19.47 <sup>e</sup>
Temmuz	17.77 <sup>de</sup>	15.69 <sup>g</sup>
Ağustos	15.19 <sup>e</sup>	15.42 <sup>g</sup>
Eylül	15.17 <sup>e</sup>	15.60 <sup>g</sup>
Ekim	17.01 <sup>de</sup>	18.52 <sup>ef</sup>
Kasım	24.26 <sup>b</sup>	22.36 <sup>d</sup>
Aralık	24.68 <sup>b</sup>	24.524 <sup>bc</sup>
Ocak	28.61 <sup>a</sup>	25.57 <sup>ab</sup>
Şubat	29.87 <sup>a</sup>	26.82 <sup>a</sup>
Mart	21.21 <sup>c</sup>	18.83 <sup>e</sup>
Nisan	17.90 <sup>d</sup>	16.97 <sup>fg</sup>
<b>ANOVA</b>		
Yıl x Ay	*	*
Yıl x Sıcaklık	Ö.D	*
Ay x Sıcaklık	Ö.D	Ö.D
Yıl x Sıcaklık x Ay	Ö.D	Ö.D

<sup>Z</sup> Aynı sütün ve değişkenlerde farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında %5 düzeyinde farklılık vardır (Duncan).

ÖD, \* %5 düzeyinde sırasıyla önemli değil ve önemli.

Şekil 3.5 incelendiğinde, 4°C düşük sıcaklık uygulamasında her iki deneme yılı arasında miktarlar bakımından çok benzerlikler olmakla beraber; ikinci deneme yılında TÇŞ içeriğinin değişimindeki artışlar ve azalışlar daha belirgin olmuştur. Buna göre, birinci deneme yılında TÇŞ içeriği Mayıs ve Haziran’dan sonra Temmuz ve Ağustos aylarında hafif bir düşme eğilimi belirlenmiş, Eylül ayından itibaren tekrar yükseliş göstererek, Mart ayına kadar stabil durumda kalmıştır. Mart ayında ise, belirgin bir düşüşün ardından Nisan



Şekil 3.5. “Gemlik” zeytin çeşidinde kabuklarda yıllara aylara ve sıcaklıklara göre toplam çözünebilir şeker içeriğinin (TÇŞ-mg/gTA) değişimi. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  SS’lerini göstermektedir.

ayında tekrar bir yükseliş olduğu gözlenmiştir. İkinci deneme yılında en düşük TÇŞ içeriği Temmuz ayında (13.63 mg/gTA); en yüksek miktarlar ise aynı istatistiki grupta yer alan Ocak (27.28 mg/gTA) ve Şubat (27.86 mg/gTA) aylarında saptanmıştır. Mart ayından itibaren ise hava sıcaklığının yükselmesi ile beraber TÇŞ içeriğinde düşüş gerçekleşmiştir (Şekil 3.2).

Kabuklarda  $-5^{\circ}\text{C}$ 'de TÇŞ içeriği birinci deneme yılında Mayıs ayından Mart ayına kadar hafif dalgalanmalar ile beraber hemen hemen doğrusal bir seyir izlemiş, Mart'taki ani bir azalışı takiben Nisan ayında tekrar yükseliş göstererek önceki seviyesine ulaşmıştır. İkinci deneme yılında, ise Mayıs'tan Ekim'e kadar aşağı yukarı aynı seviyelerde seyreden TÇŞ içeriği Kasım ayında Ekim'e göre yükseliş tespit edilmiştir. Aralık ayından itibaren yükseliş seyrine giren TÇŞ içeriği, Mart ayına kadar hemen hemen aynı seviyelerde kalmıştır. Bu yıl itibariyle Mart ayından itibaren kademeli olarak düşüş eğilimi tespit edilmiştir.

Genel olarak  $-10^{\circ}\text{C}$ 'de, Nisan ayı hariç her iki deneme yılında da TÇŞ içeriğinin değişim seyrinde paralellik saptanmıştır. Mayıs ayından sonra ani bir düşüşle beraber yaz aylarında düşük seyir izleyen TÇŞ içeriği Kasım ayından itibaren ise artış göstererek, kış aylarında en yüksek miktara ulaşmıştır (Aralık, Ocak, Şubat). Mart ayından itibaren bariz şekilde azalış belirlenmiş, Nisan ayı için birinci deneme yılında aynı seviyede kalırken, ikinci deneme yılında azalış seyrine devam etmiştir.

Şekil 3.5 incelendiğinde,  $-20^{\circ}\text{C}$  uygulamasında iki deneme yılı arasında paralellik olduğu görülmektedir. TÇŞ içeriği kabuklarda yaz aylarında düşük bulunurken, genel olarak kış aylarında yüksek durumda saptanmıştır. Öte yandan, sonbahar aylarında bir yükseliş; bahar aylarının başlangıcından itibaren ise, her iki deneme yılında da bir düşüş olduğu gözlenmiştir. Örneğin, ikinci deneme yılında Ağustos ayında TÇŞ içeriği 12.44 mg/gTA iken, bu miktar Kasım'da 23.57 mg/gTA; Şubat'ta 28.86 mg/gTA ve Mart'ta da 19.45 mg/gTA olarak saptanmıştır.

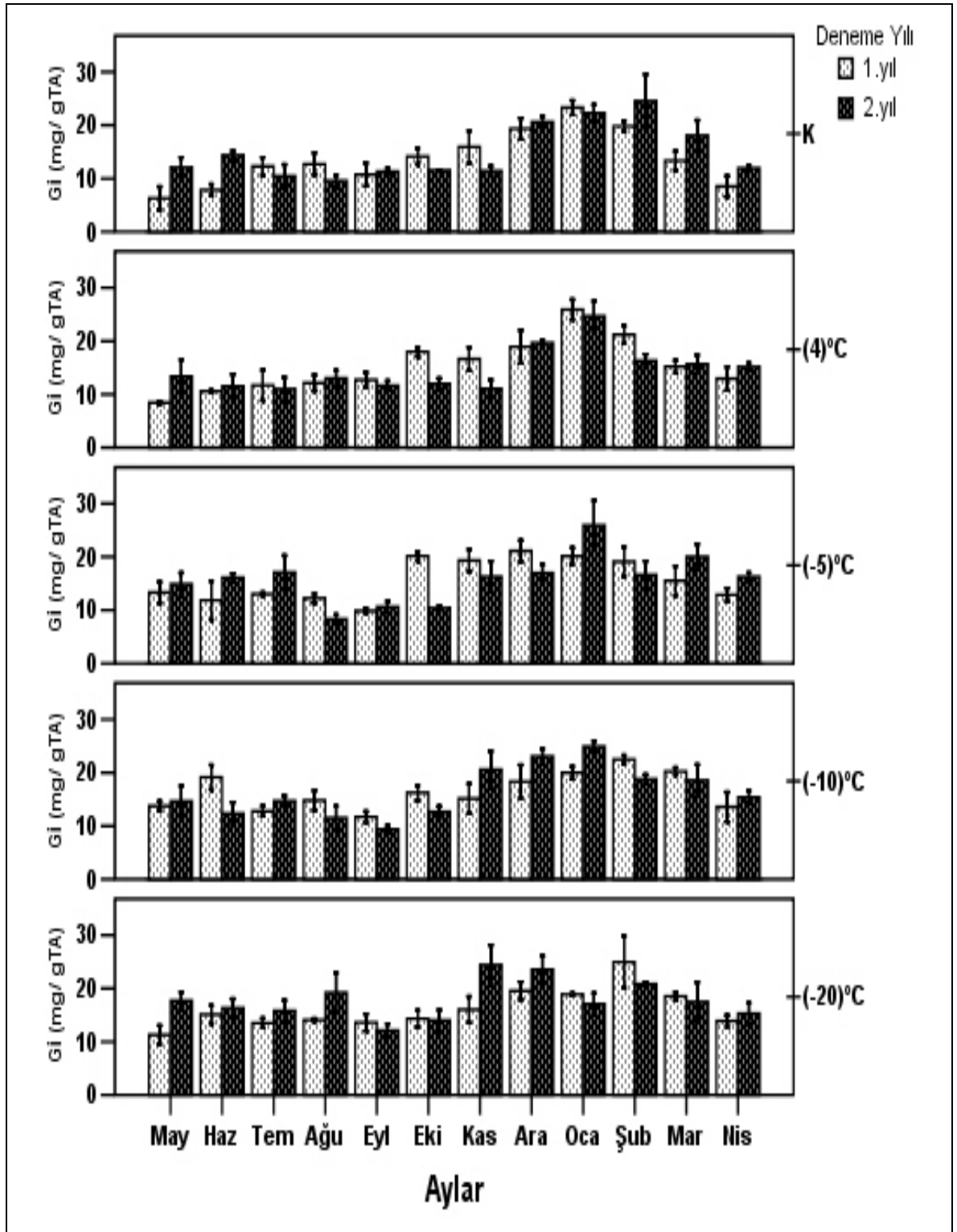
“Gemlik” zeytin çeşidi’nde kabuklarda yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların TÇŞ içeriği üzerine etkileri Çizelge 3.3’de görülmektedir. Çizelgeye göre; düşük sıcaklık uygulamalarının, ayların ve yılların etkileri önemli bulunmuştur. Yıllara göre, birinci deneme yılı (21.06 mg/gTA) ikinci deneme yılına göre (19.42 mg/gTA) daha yüksek TÇŞ içeriğine sahip olmuştur. Düşük sıcaklık uygulamaları dikkate alındığında, en yüksek TÇŞ içeriği  $-20^{\circ}\text{C}$  (21.17 mg/gTA)’de ; en düşük ise  $-5^{\circ}\text{C}$  (19.28mg/gTA) uygulamasına ait örneklerde belirlenmiştir. Aylar itibariyle incelendiğinde; kabuklarda TÇŞ içeriği Haziran ayından itibaren azalarak Temmuz (15.69 mg/gTA), Ağustos (15.42 mg/gTA) Eylül (15.60 mg/gTA) aylarında en düşük seviyeye ulaşmış; Ekim ayından itibaren yükselme eğilimine girerek Şubat ayında (26.82 mg/gTA) en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Mart ayından itibaren ise, tekrar düşüş olduğu gözlenmiştir. Yıl, sıcaklık, ay arasındaki bütün interaksiyonlar içerisinde sadece Yıl\*Ay ve Ay\*Sıcaklık istatistiki olarak önemli, diğer bütün interaksiyonlar ise, önemsiz bulunmuştur (Ek-6).

### **3.3.2. Glukoz İçeriği**

#### **3.3.2.1. Yapraklarda glukoz içeriği**

“Gemlik” zeytin çeşidi yapraklarında yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre glukoz içeriği (Gİ)’ndeki değişim Şekil 3.6 ve Çizelge 3.4’de görülmektedir.

Yapraklarda kontrol grubunda Gİ birinci deneme yılında Mayıs ve Haziran aylarında sabit kalmış, Temmuz’dan itibaren bir miktar artarak devam eden bir seyir izlemiştir. Ocak ayına kadar küçük artışlar ve azalışlar görülse de bunlar istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur. Ocak ayında belirgin bir artış göstererek bu yıl itibariyle en yüksek (23.3 mg/gTA) glukoz seviyesine ulaşmıştır. Şubat ayından itibaren ise, Gİ’nin doğrusal azalma seyrine girdiği tespit edilmiştir. İkinci deneme yılında yapraklarda Gİ, Mayıs ve Haziran aylarında sabit kalmış ancak Temmuz ayından itibaren belirgin bir azalma



Şekil 3.6. “Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre glukoz içeriğinin (GI-mg/gTA) değişimi. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  SS'larını göstermektedir.



gerçekleşmiştir. Aralık ayına kadar aşağı yukarı düşük seviyelerde seyreden Gİ Aralık ayındaki keskin artışı dikkate değer görülmüştür. Düşük sıcaklıklara mukavemetin yüksek olduğu aylarda (Aralık, Ocak, Şubat) en yüksek seviyelere çıkan Gİ; mukavemetin düşmeye başladığı aylarda (Mart, Nisan) ise kademeli olarak azalma eğilimine girmiştir. Yıllar arasında miktarlar arasında farklılıklar görülmekle beraber, Gİ'nin mevsimsel değişimi genel olarak birbirine paralel olmuştur. Buna göre Gİ, ilkbahar, yaz ve sonbahar aylarında nispeten düşük olarak belirlenirken, kış aylarında nispeten yüksek seviyelerde tespit edilmiştir.

4°C düşük sıcaklık uygulamasında, her iki deneme yılında da Ekim ayına kadar aynı seviyelerde seyreden glukoz içeriğinin, birinci deneme yılında Ekim ayından; ikinci deneme yılında ise Aralık ayından itibaren artma eğimine girdiği ve Ocak ayında en yüksek seviyeye ulaştığı; Şubat ayından itibaren ise, azaldığı tespit edilmiştir.

-5°C'de birinci deneme yılında, Mayıs'tan Eylül ayına kadar aynı seviyelerde seyreden Gİ; Eylül ayında azalarak en düşük durumda (9.85 mg/gTA) gelmiştir. Ekim ve Kasım aylarında belirgin artış gerçekleşmiştir. Bu aydan sonra ise, Gİ Mart ayına kadar sabit bir seyir takip etmiştir. Nisan ayında hafif bir azalış saptanmış ancak bu azalış istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. İkinci deneme yılında birinci deneme yılına paralel olarak yaz aylarının başlangıcında aynı seyreden Gİ Ağustos ayında azalarak en düşük seviyede (9.58 mg/gTA) belirlenmiş; Eylül ayından itibaren artış göstererek Ocak ayında (25.90 mg/gTA) en yüksek miktara ulaşmıştır. Özellikle Kasım ayındaki keskin artış dikkat çekici bulunmuştur. Bu deneme yılı itibariyle Gİ Şubat ayından sonra azalmıştır.

Şekil 3.6 incelendiğinde, -10°C düşük sıcaklık uygulamasında her iki deneme yılı arasında miktarlar bakımından çok benzerlikler olmakla beraber; ikinci deneme yılında Gİ'nin değişimindeki artışlar ve azalışlar daha belirgin olmuştur. Buna göre; birinci deneme yılında Eylül ayına kadar aşağı yukarı aynı seviyelerde seyreden (Haziran ayı hariç) Gİ, Ekim ayından itibaren artış eğilimine girerek Şubat ayında (22.49 mg/gTA) en yüksek seviyeye ulaşmış, Mart'tan itibaren tekrar kademeli olarak azalış eğilimi tespit edilmiştir.

İkinci deneme yılında Eylül ayına kadar sabit seyirde kalan Gİ; Eylül ayındaki bir miktar düşüşle birlikte en düşük seviyede (9.34 mg/gTA) saptanmıştır. Ekim ayındaki artışı takiben Kasım'daki keskin artış dikkat çekici bulunmuştur. Bu yüksek Gİ Ocak ayına kadar sürmüştür. Şubat ayından itibaren ise Gİ'inde düşüş gerçekleşmiştir.

Genel olarak -20°C'de Gİ'inde hava sıcaklıklarının yüksek olduğu bahar ve yaz aylarında düşük seviyelerde iken çevre sıcaklıklarının düşmesiyle ters orantılı olarak yükseliş saptanmıştır. Bu uygulama itibariyle; en düşük Gİ birinci deneme yılında Mayıs (11.28 mg/gTA), ikinci deneme yılında Eylül ayı (12.34 mg/gTA); en yüksek Gİ ise, birinci deneme yılında Şubat ayı (24.95 mg/gTA), ikinci deneme yılında Kasım, Aralık ayları (sırasıyla 24.40 mg/gTA ve 23.54 mg/gTA) itibariyle belirlenmiştir.

“Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların Gİ üzerine etkileri Çizelge 3.4'de görülmektedir. Çizelgeye göre; düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların etkileri önemli, yılların etkisi ise istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur. Düşük sıcaklık uygulamaları dikkate alındığında, en yüksek Gİ -20°C (16.98 mg/gTA); en düşük Gİ ise, kontrol (14.26 mg/gTA) uygulamasına ait örneklerde belirlenmiştir. Bu durum yapraklarda uygulama sıcaklıkları düştükçe Gİ arttığının göstergesidir. Aylar itibariyle incelendiğinde; yapraklarda Gİ düşük sıcaklık mukavemetinin düşük olduğu bahar ve yaz aylarında düşük, mukavemetin yüksek olduğu kış aylarında ise yüksek miktarda saptanmıştır. Örneğin; Gİ Haziran ayında 13.51 mg/gTA (en düşük) iken; Kasım ayında 16.68 mg/gTA; Ocak ayında 22.08 mg/gTA'a (en yüksek) yükselmiş; en son Nisan ayında 13.58 mg/gTA'a düşmüştür. Yıl, sıcaklık, ay arasındaki bütün interaksiyonlar içerisinde sadece Ay\*Sıcaklık interaksiyonu istatistiki olarak önemsiz, diğer bütün interaksiyonlar ise önemli bulunmuştur (Ek-7).

**Çizelge 3.4. “Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda ve kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre glukoz içeriği (mg/gTA)**

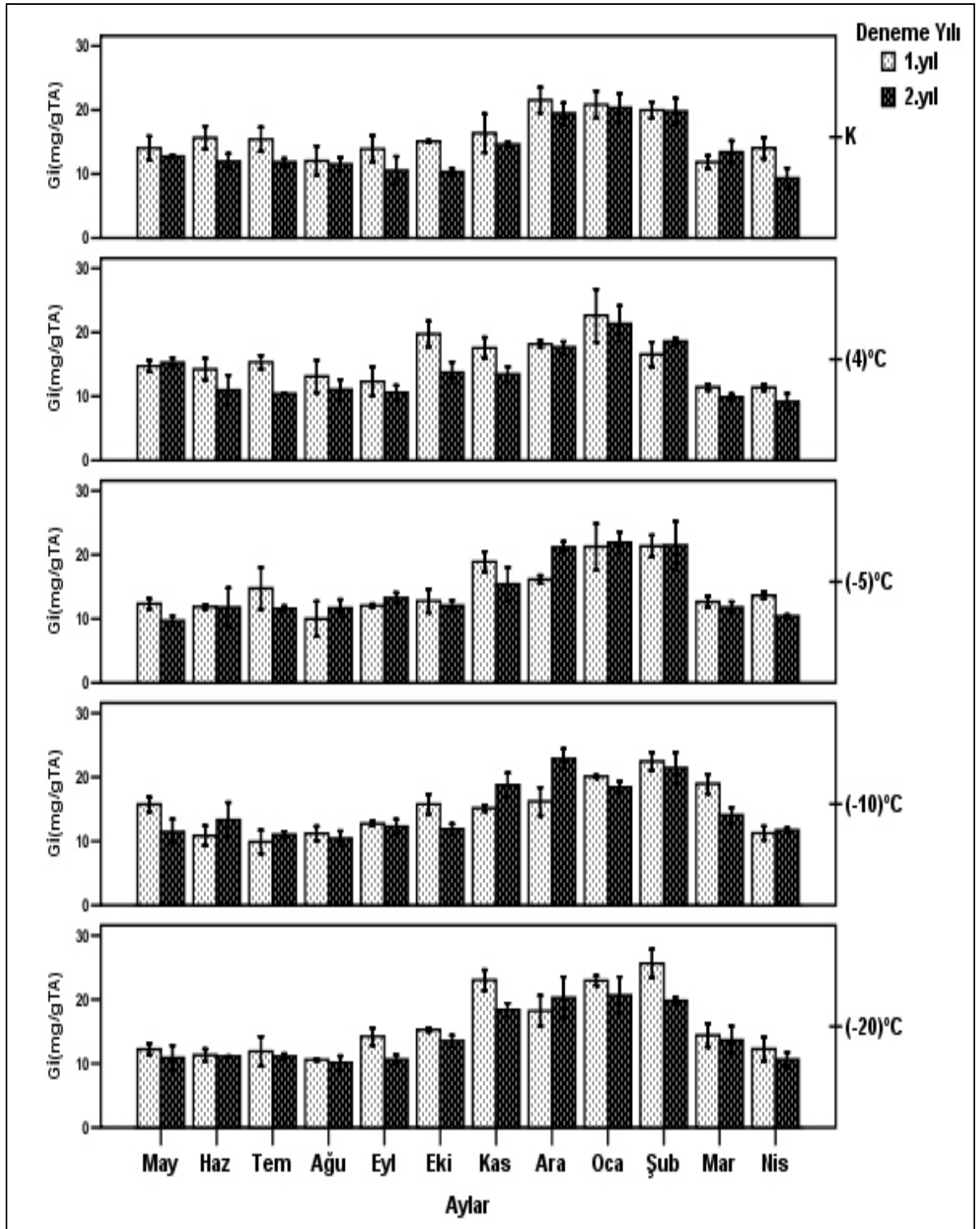
<b>Glukoz içeriği (mg/gTA)</b>		
<b>Değişkenler</b>	<b>Yaprak</b>	<b>Kabuk</b>
<b>Yıl</b>		
1. Yıl	15.48 <sup>a</sup>	15.45 <sup>a</sup>
2. Yıl	15.77 <sup>a</sup>	14.15 <sup>b</sup>
<b>Uygulamalar</b>		
Kontrol	14.26 <sup>d</sup>	15.07 <sup>a</sup>
4°C	14.96 <sup>cd</sup>	14.53 <sup>a</sup>
-5°C	15.60 <sup>bc</sup>	14.43 <sup>a</sup>
-10°C	16.32 <sup>ab</sup>	14.90 <sup>a</sup>
-20°C	16.98 <sup>a</sup>	15.00 <sup>a</sup>
<b>Aylar</b>		
Mayıs	12.57 <sup>de</sup>	12.98 <sup>def</sup>
Haziran	13.51 <sup>d</sup>	12.32 <sup>efg</sup>
Temmuz	13.23 <sup>de</sup>	12.35 <sup>ef</sup>
Ağustos	12.75 <sup>de</sup>	11.21 <sup>g</sup>
Eylül	11.36 <sup>e</sup>	12.20 <sup>efg</sup>
Ekim	14.34 <sup>d</sup>	13.99 <sup>d</sup>
Kasım	16.68 <sup>c</sup>	17.01 <sup>c</sup>
Aralık	20.11 <sup>b</sup>	19.32 <sup>b</sup>
Ocak	22.08 <sup>a</sup>	20.94 <sup>a</sup>
Şubat	20.46 <sup>ab</sup>	20.80 <sup>a</sup>
Mart	17.25 <sup>c</sup>	13.45 <sup>dc</sup>
Nisan	13.58 <sup>d</sup>	11.46 <sup>fg</sup>
<b>ANOVA</b>		
Yıl x Ay	*	Ö.D
Yıl x Sıcaklık	Ö.D	Ö.D
Ay x Sıcaklık	*	Ö.D
Yıl x Sıcaklık x Ay	*	Ö.D

<sup>Z</sup> Aynı sütun ve değişkenlerde farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında %5 düzeyinde farklılık vardır (Duncan).

ÖD, \* %5 düzeyinde sırasıyla önemli değil ve önemli.

### 3.3.2.2. Kabuklarda glukoz içeriği

“Gemlik” zeytin çeşidi kabuklarında yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre glukoz Gİ'nin değişimi Şekil 3.7 ve Çizelge 3.4'de görülmektedir.



Şekil 3.7. “Gemlik” zeytin çeşidinde kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre glukoz içeriğinin (GI-mg/gTA) değişimi. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  SS'larını göstermektedir.

Kabuklarda kontrol grubu örneklerinde Gİ Mayıs ayından birinci deneme periyodunda Aralık ayına, ikinci deneme periyodunda ise, Kasım ayına kadar aşağı yukarı sabit durumda bulunmuştur. Öte yandan birinci yılda Aralık, ikinci yılda Kasım ayından itibaren artma eğilimine giren Gİ, her iki deneme periyodunda da Aralık, Ocak ve Şubat aylarında en yüksek durumda saptamışlardır. Bununla birlikte her iki yılda da Mart ve Nisan aylarında ise, tekrar keskin bir azalış olduğu gözlenmiştir. Örneğin, birinci deneme yılında Gİ Ağustos ayında 12.06 mg/gTA iken bu miktar Ocak ayında 20.84 mg/gTA ve Nisan ayında 14.57 mg/gTA olarak saptanmıştır.

Şekil 3.7'den anlaşılacağı gibi, 4°C düşük sıcaklık uygulamasında kabuklarda birinci deneme periyodu ve ikinci deneme periyodu arasında miktarlar bakımından farklılıklar olmakla beraber; temel olarak her iki deneme periyodundaki Gİ değişiminde bir paralellik olduğu dikkati çekmektedir. Yaz ve ilkbahar aylarında düşük durumda saptanan Gİ, Kasım ayından itibaren bir yükseliş eğilimi göstermiştir. Bu eğilimle beraber Gİ Ocak ayında en yüksek seviyeye ulaşmış, Şubat ayından itibaren ise, tekrar düşüş seyri belirlenmiştir.

-5°C düşük sıcaklık uygulamasında kabuklarda genel olarak yıllar arasında uyum söz konusudur. Ancak bazı aylarda farklılıklar görülmüştür. Buna göre; her iki deneme yılında Gİ Mayıs ayından Kasım ayına kadar aynı seviyelerde seyretmiş, Kasım ayında ise belirgin bir yükseliş belirlenmiştir. Aralık ayında birinci deneme yılında bir miktar azalma gerçekleşirken; ikinci deneme yılında glukoz içeriğinde yükseliş seyri devam etmiştir. Bu uygulama itibarıyla en yüksek Gİ, birinci deneme yılında Ocak ve Şubat aylarında (sırasıyla, 21.26 ve 21.35 mg/gTA); ikinci deneme yılında ise Aralık, Ocak, ve Şubat (sırasıyla 21.16, 21.90 ve 21.49 mg/gTA) aylarında belirlenmiştir. Takiben her iki deneme yılında da Mart ve Nisan aylarında düşüş eğilimi saptanmıştır.

-10°C'de Gİ birinci deneme yılında Haziran ayındaki bir miktar azalışın ardından Ekim ayına kadar sabit durumda kalmış ancak Ekim ayında belirgin bir artış belirlenmiştir. Bu yıl itibarıyla en yüksek Gİ Şubat ayında (22.45 mg/gTA) tespit edilmiştir. Mart ayında

da yüksek seviyelerde bulunan glukoz, Nisan ayında keskin bir şekilde azalmıştır. İkinci deneme yılında ise Gİ Mayıs ayından Ekim ayına kadar aynı seviyelerde seyretmiş, Kasım ayından itibaren artma eğilimine girmiştir. Ocak ayındaki bir miktar azalışın haricinde, Mart ayına kadar yüksek Gİ devam etmiştir. Mart ayından itibaren ise doğrusal olarak azalma eğilimi gözlenmiştir. Şekil 3.7 incelendiğinde görüleceği gibi,  $-10^{\circ}\text{C}$ 'de her ik deneme yılında da Gİ kış aylarında diğer aylara göre nispeten yüksek bulunmuştur.

Kabuklarda  $-20^{\circ}\text{C}$  düşük sıcaklık uygulamasında genel olarak yıllar arasında uyum söz konusudur. Ancak bazı aylarda farklılıklar görülmüştür. Buna göre; Gİ Mayıs ayından birinci deneme yılında Ekim ayına, ikinci deneme yılında Kasım ayına kadar sabit seyir izlemiş; yine birinci deneme yılında Ekim ayından; ikinci deneme yılında Kasım ayından itibaren yükseliş eğilimine girmiştir. Bu uygulama itibariyle; her iki deneme yılında da Kasım, Aralık, Ocak ve Şubat aylarında diğer aylara göre yüksek Gİ belirlenmiştir. Öte yandan kabuklarda Gİ açısından diğer uygulamalarda olduğu gibi Mart ve Nisan aylarında düşüş eğilimi saptanmıştır.

“Gemlik” zeytin çeşidinde kabuklarda yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların Gİ üzerine etkileri Çizelge 3.4'de görülmektedir. Çizelgeye göre; yılların ve ayların etkileri önemli, düşük sıcaklık uygulamalarının etkisi ise istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur. Deneme yılları dikkate alındığında; birinci deneme periyodunda (ortalama 15.45 mg/gTA) ikinci deneme periyoduna (ortalama 14.15 mg/gTA) göre daha fazla Gİ belirlenmiştir. Aylar göz önünde bulundurulduğunda, kabuklarda Gİ yapraklarda olduğu gibi bahar ve yaz aylarında düşük, kış aylarında ise yüksek miktarda saptanmıştır. Bu durum zeytinlerde kabuklarda düşük sıcaklıklara mukavemetin dokularda mevcut bulunan Gİ ile paralellik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Örneğin; Ağustos ayında (11.21 mg/gTA) en düşük Gİ saptanırken; Kasım ayında 17.01 mg/gTA'a yükselmiş; Ocak (20.94 mg/gTA) ve Şubat (20.84 mg/gTA) aylarında ise en yüksek seviye belirlenmiştir. Yıl, sıcaklık ve ay arasındaki bütün interaksiyonlar istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur (Ek-8).

### 3.3.3. Sukroz İçeriği

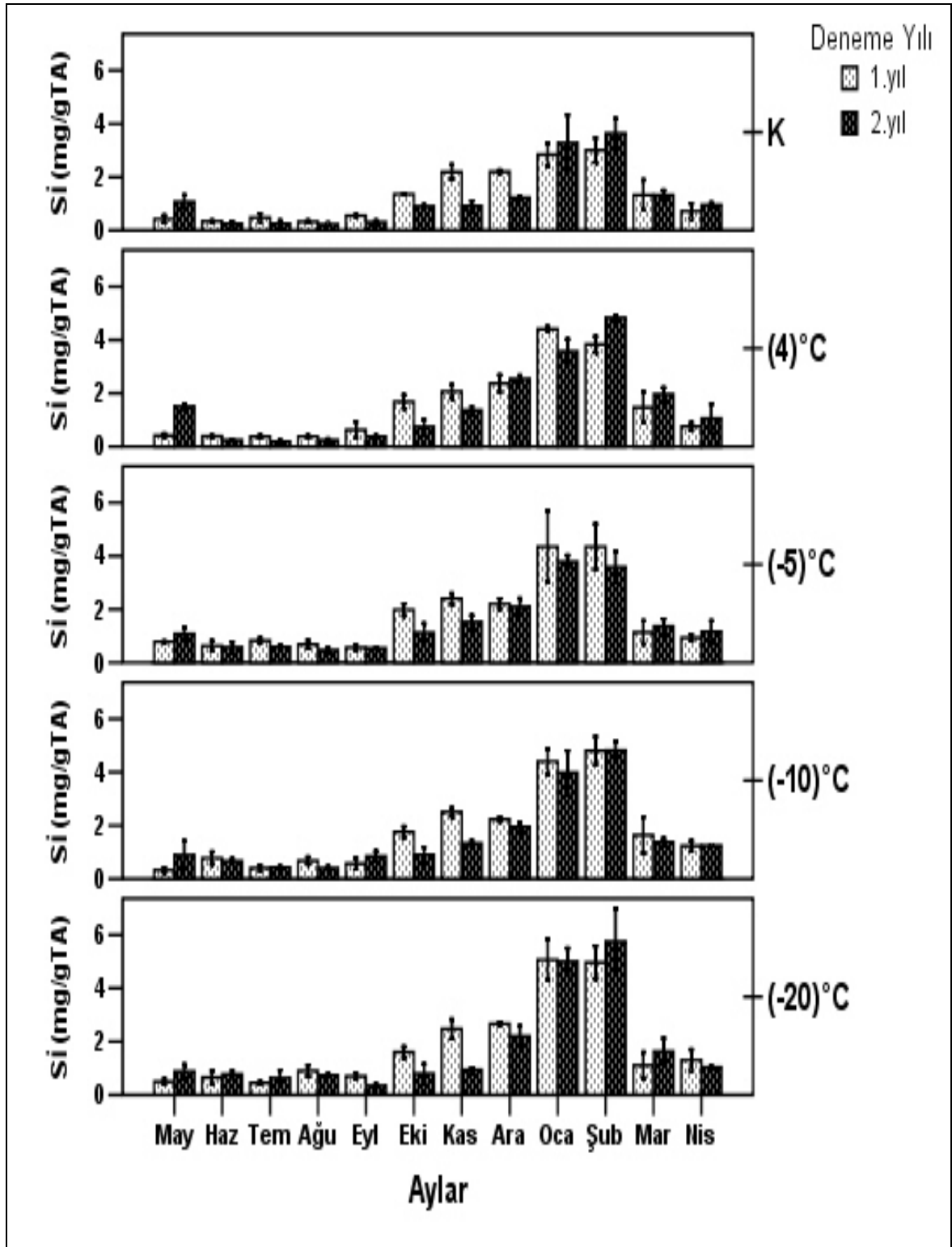
#### 3.3.3.1. Yapraklarda sukroz içeriği

“Gemlik” zeytin çeşidi’nde yapraklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre sukroz içeriğinin (Sİ) değişimi Şekil 3.8 ve Çizelge 3.5’de görülmektedir.

Kontrol grubu yaprak örneklerinde Sİ’nin her iki deneme periyodunda da (ikinci deneme yılı Mayıs ayı hariç) değişim seyri paralellik arzemiştir. Mayıs ayından Ekim ayına kadar aşığı yukarı sabit kalan Sİ, Ekimden itibaren artarak Ocak ve Şubat aylarında en yüksek seviyeye ulaşmış, Mart ve Nisan ise aylarında belirgin bir azalış belirlenmiştir.

4°C düşük sıcaklık uygulaması itibariyle Sİ, birinci deneme yılında, Mayıs ayından Eylül ayına kadar Sİ sabit bir seyir izlemiş, Eylül ayından itibaren ise doğrusal olarak artarak ilk deneme yılından farklı olarak Şubat ayında (4.4 mg/gTA) en yüksek miktara ulaşmıştır. Mart ayından itibaren ise Sİ’nde ani azalma belirlenmiştir. ikinci deneme yılında ise, Haziran ayındaki ani azalışın ardından Eylül ayına kadar sabit bir seyir izlemiş, Eylül ayından itibaren artış eğilimine girerek Şubat ayında (3.65 mg/gTA) en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Yine birinci deneme yılına paralel olarak Mart ayından itibaren Sİ’nde keskin olarak azalma tespit edilmiştir.

Her iki deneme periyodunda da -5°C düşük sıcaklık uygulamasında Sİ Mayıs’tan Eylül’e kadar düşük miktarlarda bulunurken, Ocak ve Şubat aylarında artış göstererek en yüksek durumda saptanmışlardır. Öte yandan, Mart ayından itibaren Sİ’nde keskin bir düşüş olduğu gözlenmiştir. Örneğin birinci deneme yılında Sİ Haziran’da 0.63 mg/gTA iken bu miktar Ekim’de 1.98 mg/gTA; Ocak’ta 4.35 mg/gTA ve Mart’ta 1.13 mg/gTA olarak saptanmıştır.



Şekil 3.8. “Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre sukroz içeriğinin (Sİ.-mg/gTA) değişimi. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  SS'larını göstermektedir.



-10°C’de birinci ve ikinci deneme yılında Sİ’nin değişim seyri birbirine paralellik göstermiştir. Buna göre, birinci deneme yılında Mayıs ayında en düşük seviyede (0.32 mg/gTA) saptanan Sİ; Haziran’dan Ekim ayına kadar aşığı yukarı aynı seviyelerde seyretmiştir. Ekim ayından itibaren hızla yükselişe geçen sukroz, Ocak (4.40 mg/gTA) ve Şubat (4.80 mg/gTA) aylarında en yüksek miktara ulaşmış ancak Mart ve Nisan aylarında tekrar keskin bir azalış saptanmıştır. İkinci deneme yılı itibariyle; Temmuz, Ağustos aylarında en düşük seviyelerde saptanan sukroz; Eylül ayından itibaren doğrusal olarak artarak Ocak (3.97 mg/gTA) ve Şubat (4.81 mg/gTA) aylarında en yüksek miktara ulaşmıştır. Bu deneme yılında da birinci deneme yılında olduğu gibi Mart ve Nisan aylarında tekrar azalış belirlenmiştir.

-20°C’de Sİ açısından genel olarak yıllar arasında uyum söz konusudur. Ancak bazı aylarda farklılıklar görülmüştür. Buna göre; hem birinci deneme yılında hem de ikinci deneme yılında yaz aylarında çok düşük seviyelerde seyreden Sİ birinci deneme yılında Ekim, ikinci deneme yılında ise Aralık ayından itibaren artış göstermiştir. Her iki deneme yılında da Ocak ve Şubat aylarındaki keskin artışla en yüksek seviyeye (4.97-5.75 mg/gTA) ulaşan Sİ’nde; Mart ve Nisan aylarındaki keskin azalış çok dikkat çekici bulunmuştur.

“Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların Sİ üzerine etkileri Çizelge 3.5’de görülmektedir. Çizelgeye göre; yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların etkileri istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Deneme yılları dikkate alındığında; birinci deneme periyodunda (ortalama 1.65 mg/gTA) ikinci deneme periyoduna (ortalama 1.46 mg/gTA) göre daha fazla Sİ belirlenmiştir. Düşük sıcaklık uygulamaları itibariyle, Sİ -20°C uygulamasına ait örneklerde en yüksek durumda; kontrol örneklerinde ise, en düşük durumda saptanmıştır. Aylar göz önünde bulundurulduğunda Sİ’inde kış ayları ile bahar ve yaz ayları arasında çok ciddi farklılıklar olduğu görülmüştür. Örneğin, Sİ Temmuz ayında 0.44 mg/gTA (en düşük) iken; Kasım’da 1.80 mg/gTA; Şubat’ta 4.36 mg/gTA (en yüksek)’a yükselmiş; Nisan ayında tekrar 1.04 mg/gTA seviyelerine düşmüştür. Yıl, sıcaklık, ay arasındaki bütün interaksyonlar

içerisinde sadece Yıl\*Ay ve Ay\*Sıcaklık istatistiki olarak önemli, diğer bütün interaksiyonlar ise önemsiz bulunmuştur (Ek-9).

**Çizelge 3.5. “Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda ve kabuklarda yıllara ve sıcaklıklara göre sukroz içeriği (mg/gTA)**

Değişkenler	Sukroz içeriği (mg/gTA)	
	Yaprak	Kabuk
<b>Yıl</b>		
1. Yıl	1.65 <sup>aZ</sup>	3.39 <sup>a</sup>
2. Yıl	1.46 <sup>b</sup>	3.04 <sup>b</sup>
<b>Uygulamalar</b>		
Kontrol	1.22 <sup>c</sup>	2.84 <sup>c</sup>
4°C	1.54 <sup>b</sup>	3.01 <sup>c</sup>
-5°C	1.53 <sup>b</sup>	3.29 <sup>b</sup>
-10°C	1.71 <sup>ab</sup>	3.52 <sup>a</sup>
-20°C	1.77 <sup>a</sup>	3.42 <sup>ab</sup>
<b>Aylar</b>		
Mayıs	0.78 <sup>gh</sup>	2.69 <sup>f</sup>
Haziran	0.52 <sup>hi</sup>	2.73 <sup>f</sup>
Temmuz	0.44 <sup>i</sup>	1.94 <sup>i</sup>
Ağustos	0.51 <sup>hi</sup>	1.91 <sup>i</sup>
Eylül	0.54 <sup>hi</sup>	2.36 <sup>gh</sup>
Ekim	1.30 <sup>ef</sup>	2.55 <sup>fg</sup>
Kasım	1.80 <sup>d</sup>	3.42 <sup>e</sup>
Aralık	2.20 <sup>c</sup>	4.51 <sup>c</sup>
Ocak	4.01 <sup>b</sup>	5.03 <sup>b</sup>
Şubat	4.36 <sup>a</sup>	5.53 <sup>a</sup>
Mart	1.44 <sup>e</sup>	3.96 <sup>d</sup>
Nisan	1.04 <sup>fg</sup>	2.12 <sup>hi</sup>
<b>ANOVA</b>		
Yıl x Ay	*	*
Yıl x Sıcaklık	Ö.D	Ö.D
Ay x Sıcaklık	*	*
Yıl x Sıcaklık x Ay	Ö.D	*

<sup>Z</sup> Aynı sütun ve değişkenlerde farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında %5 düzeyinde farklılık vardır (Duncan).

ÖD, \* %5 düzeyinde sırasıyla önemli değil ve önemli.

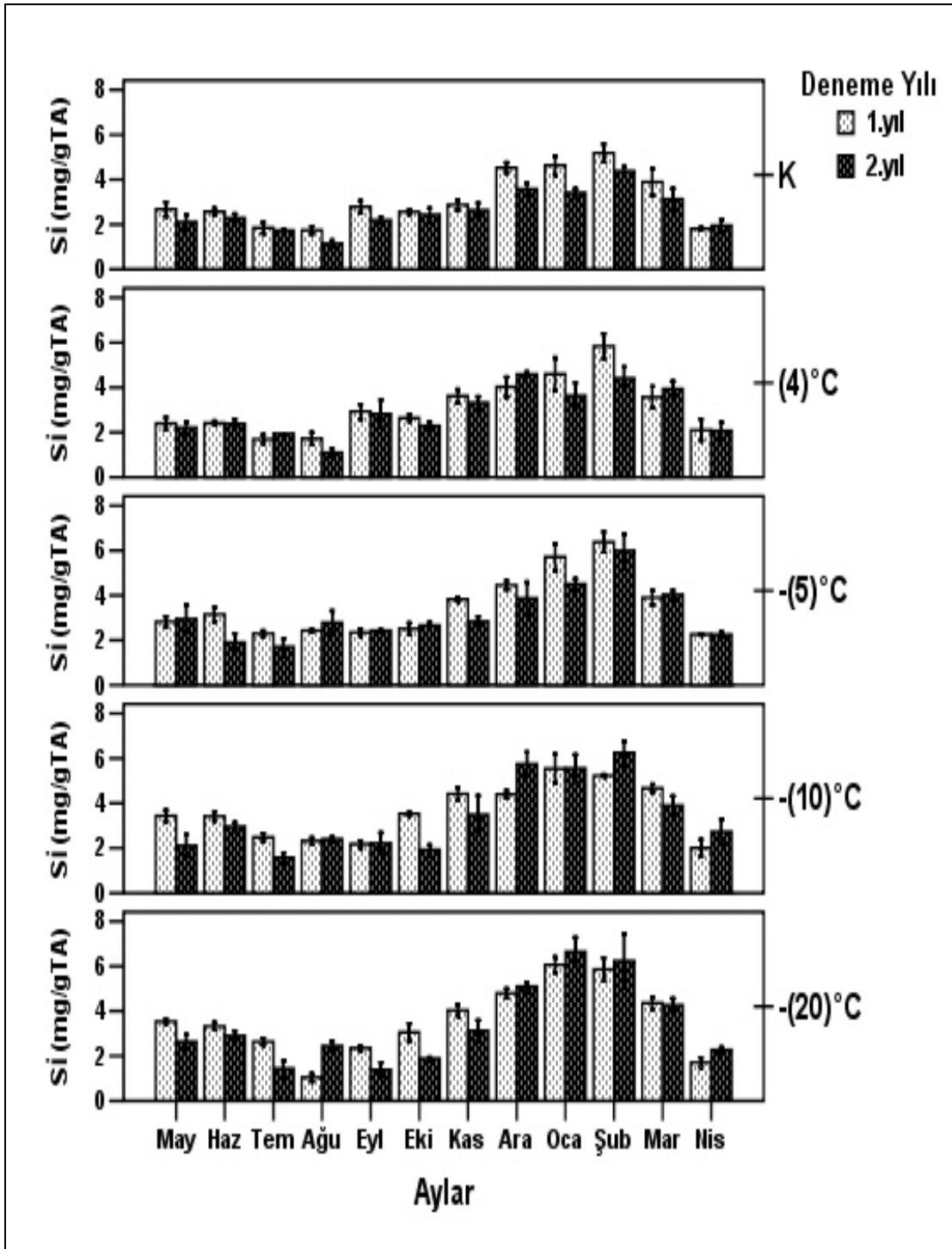
### 3.3.3.2. Kabuklarda sukroz içeriği

“Gemlik” zeytin çeşidi’nde kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre Sİ’nin değişimi Şekil 3.9 ve Çizelge 3.5’de görülmektedir.

Kabuklarda kontrol grubunda yıllar itibarıyla genel olarak Sİ açısından yıllar arasında uyum söz konusudur. Ancak bazı aylarda farklılıklar görülmüştür. Buna göre; her iki deneme yılında da Sİ Mayıs-Haziran aylarında sabit seyir izlemiştir; Temmuz ayında ise bir miktar düşüş gerçekleşmiştir. Ağustos ayında bu seviye değişmemiştir. Eylül ayından itibaren artış belirlenen Sİ’inde, Aralık ayına kadar hemen hemen aynı kalmış, Aralık ayından itibaren artarak birinci deneme yılında Ocak (4.63 mg/gTA) ve Şubat (5.18 mg/gTA) aylarında, ikinci deneme yılında ise yalnız Şubat (4.37 mg/gTA) ayında en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Öte yandan, kabuklarda Sİ’inde Mart, Nisan aylarında düşüş eğilimi saptanmıştır.

Her iki deneme yılında da 4°C düşük sıcaklık uygulaması itibarıyla Sİ, Mayıs ve Haziran aylarına göre Temmuz ayında bir miktar azalmıştır. Ağustos ayına gelindiğinde ise, Sİ birinci yıl aşağı yukarı aynı kalmış ancak ikinci yıl bir miktar azalmıştır. Her iki deneme periyodunda da Eylül ayından itibaren artmaya başlayan sukrozun, birinci deneme yılındaki artış hızı daha yavaş ilerlemiş ve bu deneme yılı itibarıyla Şubat’ta en yüksek miktar (5.84 mg/gTA) elde edilmiştir. Bunu takiben Sİ’inde Mart ayından itibaren azalma eğilimi belirlenmiştir. İkinci deneme yılında ise, Eylül ayından itibaren Şubat ayına kadar dalgalı bir seyir izleyen Sİ en yüksek seviyesine Ocak, Şubat ve Mart aylarında ulaşmıştır. Bu deneme yılı için Sİ’nde Nisan ayında belirgin düşüş belirlenmiştir. Bu uygulama itibarıyla genel olarak, Temmuz ve Ağustos aylarında en düşük Sİ elde edilirken, Aralık, Ocak ve Şubat aylarında ise, en yüksek Sİ belirlenmiştir.

-5°C uygulamasında her iki deneme periyodunda da Mayıs ayı itibarıyla hemen hemen aynı olan Sİ’inde, birinci deneme yılında Temmuz’da; ikinci deneme yılında ise Haziran’da belirgin olarak azalma belirlenmiştir. Her iki deneme yılında da yaz aylarında



Şekil 3.9. “Gemlik” zeytin çeşidinde kabuklarda yıllara, aylara ve sıcaklıklara göre sukroz içeriğinin (Sİ-mg/gTA) değişimi. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  SS'larını göstermektedir.

en düşük seviyelerde seyreden Sİ, birinci deneme yılında Kasım; ikinci deneme yılında ise, Aralık ayından itibaren yükseliş seyri izleyerek, birinci deneme yılında Ocak (5.71 mg/gTA) ve Şubat (6.38 mg/gTA) ayında, ikinci deneme yılında ise, Şubat (5.9 mg/gTA) ayında en yüksek miktara ulaşmıştır. Mart ayından itibaren ise Sİ'nde azalış seyri belirlenmiştir.

Birinci deneme yılında -10°C düşük sıcaklık uygulamasında kabuklarda Mayıs ve Haziran aylarında aynı miktarlarda olan Sİ, Temmuz ayında belirgin olarak azalmıştır. Ekim'e kadar sabit bir seyir izleyen sukroz, Ekim'den itibaren artış seyrine girerek bu deneme yılı itibariyle Ocak (5.53 mg/gTA) ve Şubat (5.23 mg/gTA) aylarında en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Mart ayından itibaren ise tekrar azalış eğilimi saptanmıştır. Özellikle Nisan ayındaki keskin azalış dikkat çekici bulunmuştur. İkinci deneme yılında Mayıs ayından Kasım ayına kadar dalgalı seyir izleyen sukroz, Kasım ayından itibaren artarak Aralık, Ocak ve Şubat aylarında en yüksek miktara ulaşmıştır. Mart ayından itibaren ise sukroz içeriğinde doğrusal olarak azalan bir seyir tespit edilmiştir. Bu uygulama itibariyle, her iki deneme yılında da Sİ'nin hava sıcaklıklarının yüksek seyrettiği (Şekil 2.2) yaz ve son bahar başlangıcında nispeten düşük seviyelerde olduğu görülmektedir.

-20°C uygulamasında genel olarak sukrozun değişim seyri paralellik göstermiştir. Sİ birinci deneme yılında Temmuz ayından itibaren azalma seyrine girerek Ağustos ayında en düşük (1.04 mg/gTA) seviyeye; Eylül ayından itibaren ise doğrusal olarak artarak Ocak (6.06 mg/gTA) ve Şubat (5.86 mg/gTA) aylarında en yüksek seviyelere ulaşmıştır. İkinci deneme yılında Mayıs, Haziran aylarında sabit kalan Sİ, Temmuz ayında bir miktar azalışla beraber Aralık ayına kadar hemen hemen sabit bir seyir takip etmiş, ancak Aralık ayından itibaren artış göstererek Ocak (6.04 mg/gTA) ve Şubat (6.24 mg/gTA) aylarında en yüksek miktara ulaşmıştır. Her iki deneme periyodunda da Mart ayından itibaren kademeli olarak düşüş gerçekleşmiştir.

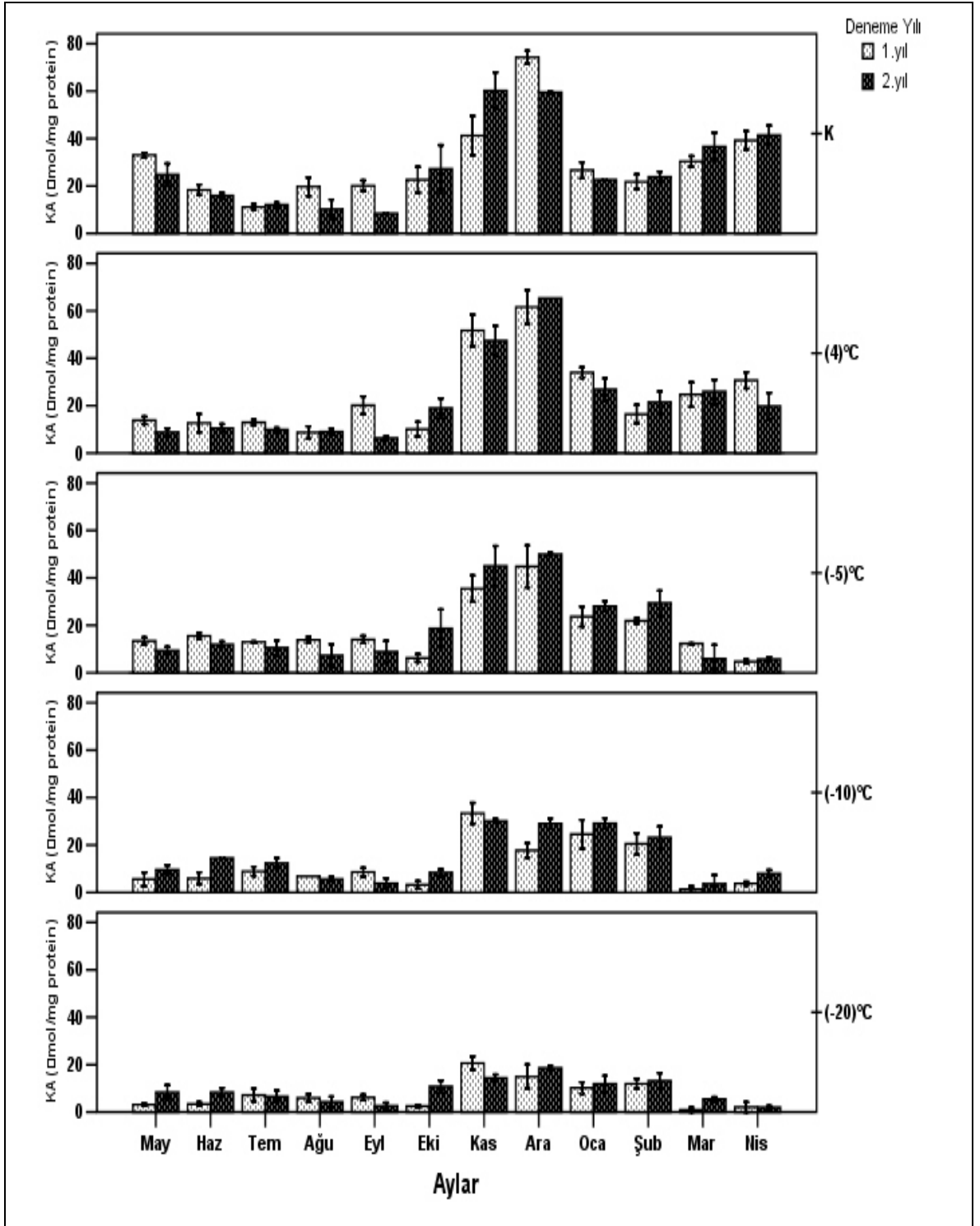
“Gemlik” zeytin çeşidinde kabuklarda yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların Sİ üzerine etkileri Çizelge 3.5’de görülmektedir. Çizelgeye göre; yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların etkileri istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Deneme yılları dikkate alındığında; birinci deneme periyodunda (3.39 mg/gTA) ikinci deneme periyoduna (3.04 mg/gTA) göre daha fazla Sİ belirlenmiştir. Düşük sıcaklık uygulamaları itibariyle, Sİ -10°C ve -20°C uygulamalarına ait örneklerde en yüksek durumda; kontrol ve 4°C uygulamasına ait örneklerde ise, en düşük seviyede saptanmıştır. Sİ’nin aylık değişimi incelendiğinde ise; Şekil 2.2’den görüldüğü üzere deneme yöresindeki hava sıcaklıklarının en yüksek olduğu aylarda (Temmuz ve Ağustos) Sİ’nin en düşük; hava sıcaklıklarının en düşük olduğu aylarda ise Sİ’nin en yüksek olduğu görülmektedir. Aynı şekilde hava sıcaklıklarının düşmeye başladığı sonbahar aylarında sukrozun artma eğiliminde olduğu, tersine hava sıcaklıklarının yükselmeye başladığı ilkbahar aylarında sukrozun azalma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Yıl, sıcaklık, ay arasındaki bütün interaksyonlar içerisinde sadece Yıl\*Sıcaklık interaksyonu istatistiki olarak önemsiz, diğer bütün interaksyonlar ise önemli bulunmuştur (Ek-10).

### **3.4. Katalaz Enzim Aktivitesi**

#### **3.4.1. Yapraklarda katalaz enzim aktivitesi**

“Gemlik” zeytin çeşidi’nde yapraklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre katalaz enzim aktivitesi (CAT) değişimi Şekil 3.10 ve Çizelge 3.6’da görülmektedir.

Kontrol grubu yaprak örneklerinde CAT aktivitesinin, birinci deneme yılında Mayıs ayından itibaren doğrusal olarak azalarak Temmuz ayında en düşük seviyeye (11.11  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ); Ağustos ayından itibaren ise, doğrusal olarak artarak Aralık ayında (sırasıyla 74.24  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Ocak ve Şubat aylarında CAT aktivitesinde ani bir azalış belirlenmiş; ancak bu Temmuz ayından daha yüksek bir seviyede saptanmıştır. İkinci deneme yılında ise, Mayıs ayından itibaren doğrusal bir azalma gösteren CAT aktivitesi, Temmuz ayından Ekim ayına kadar aşağı



Şekil 3.10. “Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda yıllara, aylara ve sıcaklıklara göre katalaz aktivitesinin (CAT-µmol/mgprotein) değişimi. Dikey barlar tekerrürlerin ±SS’lerini göstermektedir.

yukarı sabit bir seyir takip etmiştir. Ekim ayından itibaren artış eğilimine giren CAT aktivitesi Kasım ayındaki keskin atışla birlikte en yüksek seviyeye (60.19  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ) ulaşmıştır. Bu aktivite Aralık ayında da değişmemiş, ancak birinci deneme yılına paralel olarak Ocak ve Şubat aylarında ani bir azalma göstermiştir. Mart ve Nisan aylarında ise tekrar yükseliş saptanmıştır. Her iki deneme yılı itibariyle, ilkbahar aylarından (Mart ve Nisan) itibaren tekrar artış eğilimi belirlenmiştir. Birinci deneme yılında Aralık ayında; ikinci deneme yılında ise Kasım ayında CAT aktivitesinde gerçekleşen keskin artış dikkate değer görülmüştür.

4°C düşük sıcaklık uygulamasında yapraklarda genel olarak yıllar arasında uyum söz konusudur. Ancak bazı aylarda farklılıklar görülmüştür. Buna göre; her iki deneme yılında Eylül ayına kadar sabit seyir izleyen CAT aktivitesi, Eylül'de birinci deneme yılında bir miktar artmış, ikinci deneme yılında ise bir miktar azalmıştır. Ekim ayında ise, birinci deneme yılında tekrar yaz ayları seviyelerine düşen enzim aktivitesi, ikinci deneme yılında yükseliş eğilimine girmiştir. Kasım ayı itibariyle her iki deneme yılında keskin bir yükseliş saptanan CAT aktivitesi, Aralık ayında birinci deneme yılında aşağı yukarı sabit kalmış, ikinci deneme yılında ise yükseliş seyrine devam ederek en yüksek aktivite seviyesine ulaşmıştır. Ocak ayında kontrol örneklerinde olduğu gibi CAT aktivitesinde keskin bir azalış tespit edilmiştir. Şubat ayından itibaren birinci deneme yılında dalgalı bir seyir izleyen CAT aktivitesi, ikinci deneme yılında yaklaşık sabit kalmıştır.

-5°C düşük sıcaklık uygulaması itibariyle CAT aktivitesi birinci deneme yılında, Ekim ayına kadar sabit seyir izlemiş, Ekim ayında ise, bir miktar düşüş gerçekleşmiştir. Kasım ayında (35.46  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ) ani yükseliş belirlenen CAT aktivitesinde Aralık ayı (44.83  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ) ile birlikte en yüksek seviyeye ulaşmıştır. İkinci deneme yılında ise CAT aktivitesi, birinci deneme yılına paralel olarak Ekim ayına kadar yaklaşık aynı seviyelerde seyretmiş ancak Ekim ayından itibaren artarak Kasım, Aralık aylarında (sırasıyla 49.06  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$  ve 50.00  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ) en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Her iki deneme yılında da Ocak ayından itibaren ise keskin bir azalış tespit edilen CAT aktivitesinde, Mart ve Nisan ayında azalış seyrini sürmüştür. Uygulama sıcaklıkları dikkate



alındığında -5°C uygulamasında Mart ve Nisan aylarındaki CAT aktivitesindeki düşüş dikkate değer görülmüştür.

-10°C uygulamasında genel olarak her iki deneme periyodunda CAT enzim aktivitesi yaz aylarında düşük, sonbahar ve kış aylarında ise, yüksek olarak tespit edilmiştir. En düşük CAT aktivitesi birinci deneme yılı için Mart (1.31 µmol/mgprotein), ikinci deneme yılı için Eylül ayında (3.85 µmol/mgprotein), en yüksek CAT aktivitesi ise, birinci deneme yılı için Kasım ayı (33.39 µmol/mgprotein); ikinci deneme yılı için ise, Kasım (29.03 µmol/mgprotein), Aralık (31.13 µmol/mgprotein) ve Ocak (29.11 µmol/mgprotein) aylarında belirlenmiştir. Her iki deneme yılı içinde özellikle Kasım ayındaki ani artış ve Mart ayındaki keskin azalış dikkate değer görülmüştür.

Genel olarak -20°C uygulaması itibariyle yıllar arasında uyum söz konusudur. Buna göre, tüm aylardaki CAT aktivitesi çok azalmıştır. Bununla birlikte Ekim- Şubat ayları arasındaki CAT aktivitesi, yaz aylarındaki CAT aktivitesine göre yüksek durumda saptanmıştır. Bu uygulama itibariyle Mart ayındaki ani azalış dikkate değer görülmüştür.

“Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların CAT aktivitesi üzerine etkileri Çizelge 3.6’da görülmektedir. Çizelgeye göre; yılların etkisi istatistiki açıdan önemsiz; düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların etkileri ise önemli bulunmuştur. Düşük sıcaklık uygulamaları dikkate alındığında CAT aktivitesi, en yüksek kontrol örneklerinde (29.12 µmol/mgprotein) belirlenirken; uygulama sıcaklıklarının düşmesine paralel olarak azalan aktivite -20°C uygulamasında (8.54 µmol/mgprotein) en düşük seviyede belirlenmiştir. Aylar dikkate alındığında CAT aktivitesi, Ağustos, Eylül aylarında en düşük seviyede (sırasıyla 9.98 ve 9.54 µmol/mgprotein) saptanırken; Kasım ayında keskin biçimde artış göstererek Aralık ayı ile beraber (sırasıyla 37.44 µmol/mgprotein ve 39.48 µmol/mgprotein) en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Yıl, sıcaklık, ay arasındaki bütün interaksiyonlar içerisinde Yıl\*Sıcaklık ve

Yıl\*Sıcaklık\*Ay interaksyonu istatistiki olarak önemsiz, diğer interaksyonlar ise, önemli bulunmuştur (Ek-11).

**Çizelge 3.6. “Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda ve kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre katalaz aktivitesi (µmol/mgprotein)**

Değişkenler	Katalaz Aktivitesi (µmol/mgprotein)	
	Yaprak	Kabuk
<b>Yıl</b>		
1. Yıl	19.13 <sup>aZ</sup>	14.09 <sup>b</sup>
2. Yıl	18.81 <sup>a</sup>	15.31 <sup>a</sup>
<b>Uygulamalar</b>		
Kontrol	29.12 <sup>a</sup>	18.16 <sup>a</sup>
4°C	24.14 <sup>b</sup>	17.71 <sup>a</sup>
-5°C	18.80 <sup>c</sup>	13.98 <sup>b</sup>
-10°C	13.77 <sup>d</sup>	12.31 <sup>c</sup>
-20°C	8.54 <sup>e</sup>	11.72 <sup>c</sup>
<b>Aylar</b>		
Mayıs	14.17 <sup>de</sup>	10.22 <sup>def</sup>
Haziran	11.50 <sup>ef</sup>	12.19 <sup>cde</sup>
Temmuz	10.52 <sup>ef</sup>	9.51 <sup>efg</sup>
Ağustos	9.98 <sup>f</sup>	13.22 <sup>c</sup>
Eylül	9.71 <sup>f</sup>	12.47 <sup>cd</sup>
Ekim	12.72 <sup>ef</sup>	9.60 <sup>efg</sup>
Kasım	37.44 <sup>a</sup>	19.93 <sup>b</sup>
Aralık	39.48 <sup>a</sup>	27.12 <sup>a</sup>
Ocak	24.08 <sup>b</sup>	27.82 <sup>a</sup>
Şubat	19.96 <sup>c</sup>	19.14 <sup>b</sup>
Mart	17.16 <sup>cd</sup>	7.32 <sup>g</sup>
Nisan	17.59 <sup>cd</sup>	8.85 <sup>fg</sup>
<b>ANOVA</b>		
Yıl x Ay	*	Ö.D
Yıl x Sıcaklık	Ö.D	Ö.D
Ay x Sıcaklık	*	*
Yıl x Sıcaklık x Ay	Ö.D	*

<sup>Z</sup> Aynı sütun ve değişkenlerde farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında %5 düzeyinde farklılık vardır (Duncan).

ÖD, \* %5 düzeyinde sırasıyla önemli değil ve önemli.

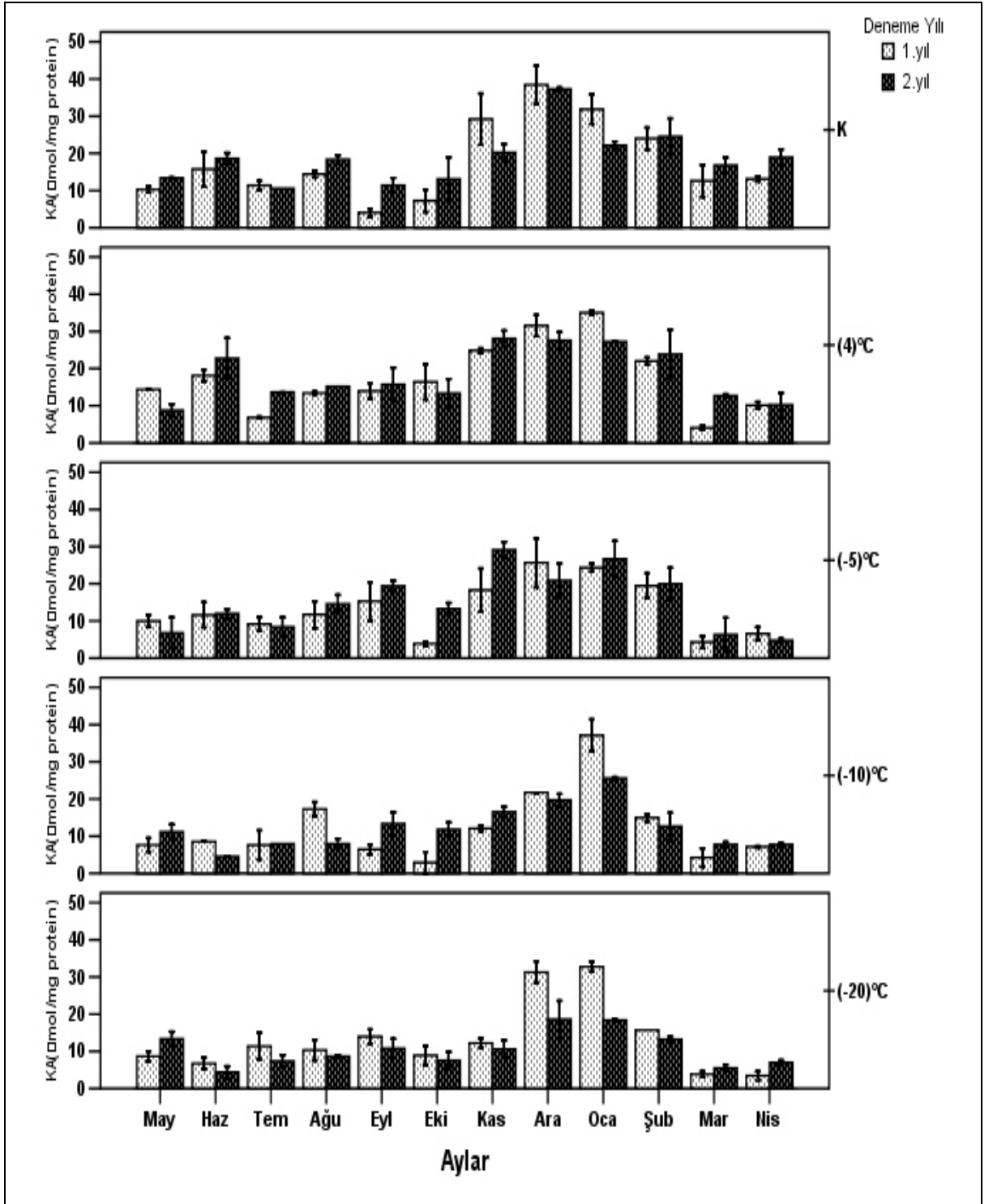
### 3.4.2. Kabuklarda katalaz anzim aktivitesi

“Gemlik” zeytin çeşidi’nde kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre CAT enzim aktivitesinin değişimi Şekil 3.11 ve Çizelge 3.6’da görülmektedir.

Kabuklarda kontrol grubu örneklerinde CAT aktivitesi genel olarak yaz ayları ve sonbaharın başlangıcında en düşük, sonbaharın sonu ve kış aylarının başlangıcında ise, en yüksek olarak tespit edilmiştir. Buna göre, CAT aktivitesi birinci deneme yılında Eylül; ikinci deneme yılında ise, Temmuz, Eylül ve Ekim aylarında en düşük bulunurken, her iki deneme yılında da Aralık ayında en yüksek seviyede belirlenmiştir. Öte yandan her iki deneme yılında da Mart ayından itibaren belirgin düşüş olduğu gözlenmiştir. Örneğin birinci deneme yılında Eylül ayında CAT aktivitesi 4.04  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$  iken bu miktar Kasım ayında 29.21  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$  ve Mart ayında 12.59  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$  olarak saptanmıştır.

4°C düşük sıcaklık uygulamasında birinci deneme yılında minimum CAT aktivitesi Mart ayında (4.03  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ); ikinci deneme yılında Mayıs ayında (8.75  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ); en yüksek aktivite ise birinci deneme yılında Aralık ve Ocak aylarında (sırasıyla 27.58  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$  ve 23.89  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ); ikinci deneme yılında Haziran ayı ve Kasım–Şubat ayları arasında (23.89–28.08 $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ) saptanmıştır.

Yıllar itibariyle değerlendirildiğinde, kabuklarda -5°C uygulamasında CAT aktivitesi açısından bir uyum söz konusudur. Buna göre, CAT aktivitesinde Mayıs ayından itibaren Ekim ayına kadar hafif artma eğilimi görülmüş olsa da, bu artış istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Ekim ayında CAT aktivitesinde her iki deneme periyodunda da bir azalış; Kasım ayında ise, ani bir artış gerçekleşmiştir. Özellikle birinci yılda daha belirgin bir artış söz konusu olmuştur. Bunu takiben Mart ayına kadar CAT aktivitesi yüksek seviyelerde seyretmiş, Mart ve Nisan aylarında ise, ani olarak azalma belirlenmiştir.



Şekil 3.11. "Gemlik" zeytin çeşidinde kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre katalaz aktivitesinin (CAT-µmol/mgprotein) değişimi. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$ SS'larını göstermektedir.

-10°C düşük sıcaklık uygulamasında her iki deneme yılında da genel olarak CAT aktivitesi yaz aylarında düşük bulunurken, birinci deneme yılında Kasım, ikinci deneme yılında Aralık ayından itibaren artmaya başlayarak, her iki deneme periyodunda da Ocak ayı için en yüksek seviyede (sırasıyla 37.09  $\mu\text{mol/mgprotein}$  ve 25.54  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) saptanmıştır. Şubat ayından itibaren CAT aktivitesinde doğrusal bir azalış seyri belirlenmiştir.

Genel olarak -20°C uygulamasında yıllar arasında bir uyum söz konusudur. Bazı aylarda ise istatistiksel farklılık belirlenmiştir. Buna göre, CAT aktivitesi en düşük birinci deneme yılında Mart (3.84  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) ve Nisan (2.45  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) aylarında, ikinci deneme yılında Haziran (4.38  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) ayında saptanmış; en yüksek CAT aktivitesi ise, her iki deneme yılı yılında da Aralık (sırasıyla 31.27  $\mu\text{mol/mgprotein}$  ve 18.61  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) ve Ocak aylarında (37.76  $\mu\text{mol/mgprotein}$  ve 18.40  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) belirlenmiştir. Ocak ve Şubat aylarında birinci deneme yılında CAT aktivitenin yüksek oluşu dikkat çekici bulunmuştur. Her iki deneme yılında da Şubat ayında bir miktar azalan CAT aktivitesi Mart ve Nisan aylarında keskin bir şekilde düşmüştür.

“Gemlik” zeytin çeşidinde kabuklarda yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların CAT aktivitesi üzerine etkileri Çizelge 3.6’da görülmektedir. Çizelgeye göre; yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların etkisi istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Düşük sıcaklık uygulamaları dikkate alındığında CAT aktivitesi, kontrol’e (18.16  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) göre 4°C uygulamasında (17.17  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) değişmez iken, -5°C (13.98  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) ve -10°C uygulamalarında (12.31  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) aktivite bir miktar azalmış, -20°C (11.72  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) uygulamasında ise -10°C uygulaması ile aynı istatistiki grup içinde yer almıştır. Aylar göz önünde bulundurulduğunda ilk bahar ve yaz aylarında düşük CAT aktivitesi belirlenirken; kış aylarında aktivite yüksek durumda saptanmıştır. Örneğin, Temmuz ayında CAT aktivitesi 9.51  $\mu\text{mol/mgprotein}$  iken, bu değer Eylül ayında 12.45  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ; Ocak ayında 27.82  $\mu\text{mol/mgprotein}$  ve Mart ayında 7.32  $\mu\text{mol/mgprotein}$  olarak saptanmıştır. Yıl, sıcaklık ve ay arasındaki bütün

interaksiyonlar içerisinde Yıl\*Ay ve Yıl\*Sıcaklık interaksyonu istatistiki olarak önemsiz, diğer interaksiyonlar ise önemli bulunmuştur (Ek-12).

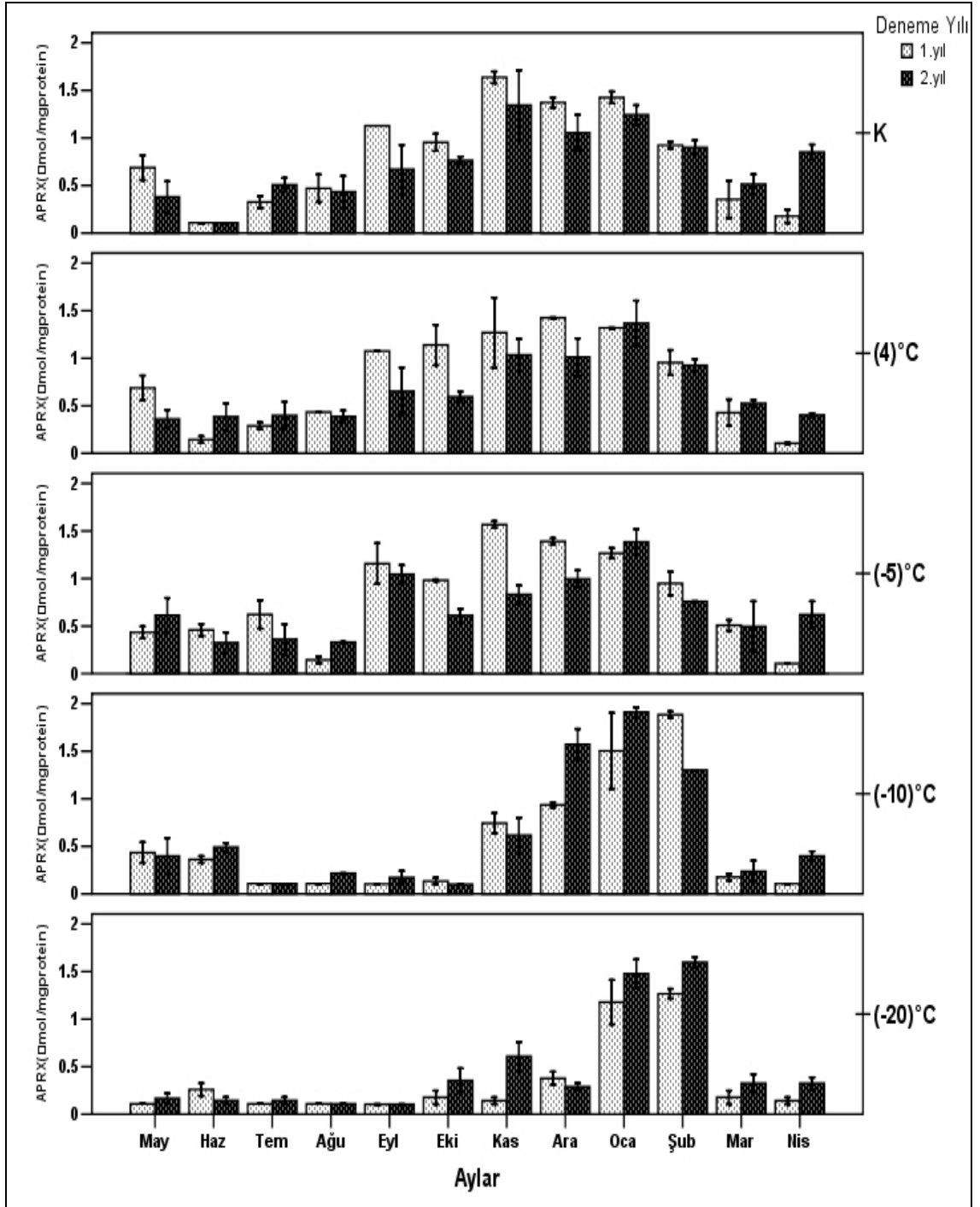
### **3.5. Askorbat Peroksidaz Enzim Aktivitesi**

#### **3.5.1. Yapraklarda askorbat peroksidaz enzim aktivitesi**

“Gemlik” zeytin çeşidi'nin yapraklarında yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin (APRX) değişimi Şekil 3.12 ve Çizelge 3.7'de görülmektedir.

Yapraklarda kontrol grubunda APRX aktivitesi, her iki deneme yılında Haziran ayında en düşük bulunurken, Kasım ayında en yüksek durumda saptanmışlardır. Öte yandan Kasım ayında keskin bir artış gösteren APRX aktivitesi, Şubat ayında Ekim ayı seviyelerine gerilemiştir. Bunu takiben Mart ayında APRX aktivitesinde keskin bir düşüş gerçekleşmiştir. Örneğin, birinci deneme yılında Ekim ayında APRX aktivitesi 0.95  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$  iken bu değer Kasım ayında 1.64  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ , Şubat ayında 0.92  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$  ve Mart ayında 0.11  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$  olarak saptanmıştır.

APRX aktivitesi 4°C düşük sıcaklık uygulamasında birinci deneme yılında Haziran ayındaki keskin düşüşü takiben Temmuz ayından itibaren sonbahara kadar artma eğilimine girmiştir. Bunu takiben, sonbahardan Şubat ayına kadar yüksek seviyelerde kalan APRX aktivitesi, Şubat ayından itibaren doğrusal azalma göstermiştir. İkinci deneme yılında ise, APRX aktivitesi Mayıs-Ağustos ayları arası sabit seyir izlemiş ve Eylül ayından itibaren artış eğilimine girerek en yüksek seviyeye Ocak ayında (1.37  $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ) ulaşmıştır. Bu aydan sonra ilk deneme yılında olduğu gibi kademeli düşüş gerçekleşmiştir. Genel olarak, APRX aktivitesi her iki deneme yılında da sonbahar ve kış aylarında nispeten yüksek seviyelerde belirlenmiştir.



Şekil 3.12. “Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre askorbat peroksidaz aktivitesinin (APRX-µmol/mgprotein) değişimi. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  SS'lerini göstermektedir.

Her iki deneme yılı için  $-5^{\circ}\text{C}$  uygulamasında aşağı yukarı Eylül ayına kadar sabit seyir izleyen APRX aktivitesi (birinci deneme yılı için Ağustos hariç), Eylül-Ekim aylarında keskin biçimde artmıştır. Artış seyrini sürdüren APRX aktivitesinde en yüksek seviyeler birinci deneme yılında Kasım ayında ( $1.57 \mu\text{mol/mgprotein}$ ); ikinci deneme yılında Ocak ayında ( $1.38 \mu\text{mol/mgprotein}$ ) belirlenmiştir. Genel olarak, APRX aktivitesi kış aylarında diğer aylara göre daha yüksek seviyelerde olmasına karşın, birinci deneme yılında Aralık ayından itibaren kademeli düşüş seyrine girmiş ve Nisan ayında ( $0.10 \mu\text{mol/mgprotein}$ ) en düşük enzim aktivitesi belirlenmiştir. İkinci deneme yılında ise, aktivitede Şubat ayında ani bir azalma saptanmış ve Nisan ayına kadar aynı seviyelerde kalmıştır.

$-10^{\circ}\text{C}$  uygulamasında APRX aktivitesinin artış ve azalış eğilimlerinde genel olarak yıllar arasında bir uyum söz konusudur. Ancak bazı aylarda farklılıklar görülmüştür. Buna göre; her iki deneme yılında APRX aktivitesi Haziran ayındaki azalışın ardından Kasım ayına kadar çok düşük seviyelerde ( $0.10-0.22 \mu\text{mol/mgprotein}$ ) kalmıştır. APRX aktivitesi Kasım ayındaki keskin bir artışla en yüksek seviyesine birinci deneme yılında Ocak ve Şubat aylarında (sırasıyla,  $1.50 \mu\text{mol/mgprotein}$  ve  $1.88 \mu\text{mol/mgprotein}$ ); ikinci deneme yılında ise, Ocak ayında ( $1.91 \mu\text{mol/mgprotein}$ ) ulaşmıştır. Birinci deneme yılında aktivite en yüksek seviyelerde iken; ikinci deneme yılında bir miktar düşüş belirlenmiştir. Her iki deneme yılında da Mart ve Nisan aylarında ise, APRX enzim aktivitesindeki keskin azalış dikkate değer görülmüştür.

APRX  $-20^{\circ}\text{C}$  düşük sıcaklık uygulamasında, birinci deneme yılında Mayıs'tan Şubat ayına kadar; ikinci deneme yılında Mayıs'tan Ekim ayına kadar hemen hemen sabit bir seyir takip etmiş, ancak sıcaklıkların düşmeye başladığı (Şekil 2.2) bu aylardan itibaren artış göstererek Ocak ve Şubat aylarında en yüksek aktiviteye ( $1.18-1.60 \mu\text{mol/mgprotein}$ ) sahip olmuştur.  $-10^{\circ}\text{C}$ 'de olduğu gibi bu uygulamada da Mart ve Nisan aylarında APRX aktivitesindeki keskin azalış dikkate değer görülmüştür.



“Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların APRX aktivitesi üzerine etkileri Çizelge 3.7’de görülmektedir. Çizelgeye göre; düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların etkisi istatistikî açıdan önemli; yılların etkisi önemsiz bulunmuştur. Düşük sıcaklık uygulamaları dikkate alındığında APRX aktivitesi, kontrol’e (0.72  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) göre 4°C (0.71  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) ve -5°C uygulamasında (0.72  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) değişmez iken, -10°C uygulamasında (0.53  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) aktivite bir miktar azalmış, -20°C uygulamasında ise, en düşük APRX aktivitesi (0.36  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) tespit edilmiştir. Aylar göz önünde bulundurulduğunda ilkbahar ve yaz aylarında düşük APRX aktivitesi belirlenirken; sonbahar aylarından itibaren aktivite yükselmeye başlamış ve kış aylarında en yüksek seviyede saptanmıştır. Örneğin, Temmuz ayında APRX aktivitesi 0.30  $\mu\text{mol/mgprotein}$  iken, bu değer Ekim ayında 0.56  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ; Ocak ayında 1.40  $\mu\text{mol/mgprotein}$  ve Mart ayında 0.37  $\mu\text{mol/mgprotein}$  olarak saptanmıştır. Yıl, sıcaklık ve ay arasındaki bütün interaksiyonlar istatistikî olarak önemli bulunmuştur (Ek-13).

### 3.5.2. Kabuklarda askorbat peroksidaz enzim aktivitesi

“Gemlik” zeytin çeşidi’nde kabuk örneklerinde yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre APRX aktivitesinin değişimi Şekil 3.13 ve Çizelge 3.7’de görülmektedir.

Kontrol grubu kabuk örneklerinde genel olarak, tüm aylarda birinci deneme yılında APRX aktivitesi ikinci deneme yılına göre daha yüksek tespit edilmiştir. Her iki deneme yılında da Mayıs’tan Ekim ayına kadar enzim aktivitesi hemen hemen sabit bir seyir takip etmiş ancak Ekim ayından itibaren artış belirlenmiştir. Birinci deneme yılında Kasım ayında da yüksek seviyelerde seyreden APRX, Aralık ayında bir miktar azalmıştır. Şubat ayından itibaren azalış gösteren APRX aktivitesi daha sonraki aylarda aşağı yukarı sabit kalmıştır. İkinci deneme yılında ise APRX enzim aktivitesi, Ekim ayından Ocak ayına kadar yüksek seviyelerde seyretmiş, ancak Ocak ayındaki bir miktar azalışın ardından

Şubat ayında tekrar bir miktar artış göstermiştir. Bu deneme yılı itibariyle Mart ve Nisan aylarındaki APRX aktivitesindeki azalış önemli görülmüştür.

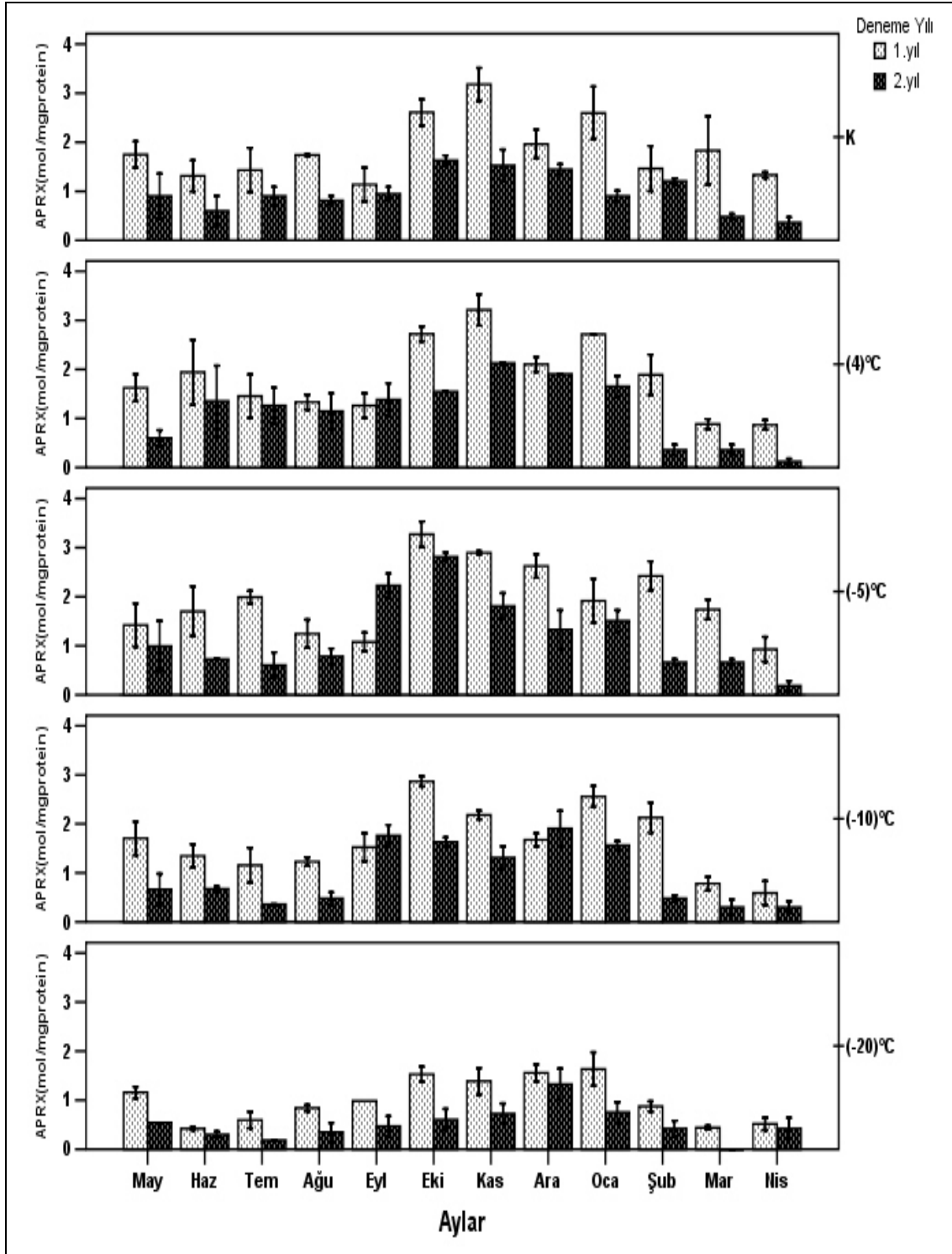
**Çizelge 3.7. “Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda ve kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre askorbat peroksidaz enzim aktivitesi ( $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ )**

Değişkenler	Askorbat Peroksidaz Aktivitesi ( $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ )	
	Yaprak	Kabuk
<b>Yıl</b>		
1. Yıl	0.62 <sup>z</sup>	1.69 <sup>a</sup>
2. Yıl	0.59	0.91 <sup>b</sup>
<b>Uygulamalar</b>		
Kontrol	0.72 <sup>a</sup>	1.44 <sup>a</sup>
4°C	0.71 <sup>a</sup>	1.45 <sup>a</sup>
-5°C	0.72 <sup>a</sup>	1.53 <sup>a</sup>
-10°C	0.53 <sup>b</sup>	1.27 <sup>b</sup>
-20°C	0.36 <sup>c</sup>	0.75 <sup>c</sup>
<b>Aylar</b>		
Mayıs	0.44 <sup>ef</sup>	1.16 <sup>cd</sup>
Haziran	0.28 <sup>g</sup>	1.06 <sup>cd</sup>
Temmuz	0.30 <sup>g</sup>	0.94 <sup>de</sup>
Ağustos	0.26 <sup>g</sup>	0.97 <sup>de</sup>
Eylül	0.54 <sup>de</sup>	1.30 <sup>c</sup>
Ekim	0.56 <sup>d</sup>	2.14 <sup>a</sup>
Kasım	1.00 <sup>c</sup>	2.06 <sup>a</sup>
Aralık	1.04 <sup>bc</sup>	1.75 <sup>b</sup>
Ocak	1.40 <sup>a</sup>	1.79 <sup>b</sup>
Şubat	1.12 <sup>b</sup>	1.19 <sup>cd</sup>
Mart	0.37 <sup>f</sup>	0.76 <sup>ef</sup>
Nisan	0.28 <sup>g</sup>	0.56 <sup>f</sup>
<b>ANOVA</b>		
Yıl x Ay	*	*
Yıl x Sıcaklık	*	Ö.D
Ay x Sıcaklık	*	*
Yıl x Sıcaklık x Ay	*	Ö.D

<sup>z</sup> Aynı sütun ve değişkenlerde farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında %5 düzeyinde farklılık vardır (Duncan).

ÖD, \* %5 düzeyinde sırasıyla önemli değil ve önemli.

Kabuklarda 4°C düşük sıcaklık uygulamasında her iki deneme yılı karşılaştırıldığında, APRX aktivitesinin artış ve azalış eğilimleri birinci deneme yılında



Şekil 3.13. “Gemlik” zeytin çeşidinde kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin (APRX- $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) değişimi. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  SS’lerini göstermektedir.

ikinci deneme yılına göre daha keskin olmuştur. Buna göre, APRX aktivitesi birinci deneme yılında Mayıs ayından Ekim ayına kadar sabit seyir izlemiş; bunu takiben Ekim ayında ani bir artış saptanmıştır. Bu deneme yılında enzim aktivitesi yükseliş seyirini sürdürerek Kasım ayında en yüksek değere (3.21  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) ulaşmıştır. Takiben APRX aktivitesi, Aralık ayında bir miktar düşüş göstermiş, ancak Ocak ayında tekrar Ekim ayı seviyelerine ulaşmıştır. APRX aktivitesi Şubat ayındaki düşüşün ardından, Mart-Nisan aylarında keskin bir azalış seyrine girmiştir. İkinci deneme yılında ise, Temmuz ayındaki bir miktar artışın ardından Kasım ayına kadar sabit seyir izleyen APRX aktivitesi, birinci deneme yılında olduğu gibi Kasım ayında artarak en yüksek değere (2.12  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) ulaşmıştır. Ancak bu deneme yılı itibariyle enzim aktivitesindeki artış çok keskin olmamıştır. Aralık ve Ocak aylarındaki hafif bir azalma belirlenirken, Şubat ayındaki düşüş keskin olarak belirlenmiştir. Mart ayında aynı seviyelerde kalan aktivite Nisan ayında bir miktar daha azalarak en düşük seviyede (0.12  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) tespit edilmiştir.

-5°C’de birinci deneme yılında Ekim; ikinci deneme yılında Eylül ayına kadar sabit seyir izleyen APRX aktivitesi, her iki deneme yılında da bu aylardan itibaren artış göstermiştir. Hem birinci hem de ikinci deneme yılı itibariyle en yüksek APRX aktivitesi Ekim ayında (sırasıyla, 3.27  $\mu\text{mol/mgprotein}$  ve 2.81  $\mu\text{mol/mgprotein}$ ) belirlenmiştir. Her iki deneme yılında da Kasım ayındaki bir miktar azalışı takiben, birinci deneme yılında Mart ayına, ikinci deneme yılında Şubat ayına kadar aynı seviyelerde kalmıştır. Bu aylardan sonra ise, belirgin düşüşler görülmüştür.

APRX aktivitesi -10°C uygulamasında, birinci deneme yılında Ekim ayına kadar; ikinci deneme yılında ise Temmuz ayındaki bir miktar azalışın haricinde Eylül ayına kadar sabit seyir takip etmiştir. Her iki deneme yılında da bu aylardan itibaren belirgin artış görülmüştür. Birinci deneme yılında kış ayları süresince artış ve azalışlar şeklinde dalgalanmalar olmuş, ancak genel olarak APRX aktivitesi yaz aylarına göre yüksek seviyelerde (Aralık ayı hariç) seyretmiştir. Bu deneme yılında Mart ayındaki keskin düşüş dikkate değer bulunmuştur. İkinci deneme yılında ise, APRX enzim aktivitesi Eylül ayındaki yükselişi takiben Şubat’a kadar aşağı yukarı sabit kalmış ancak Şubat ayında ani

azalma saptanmıştır. Bu aylardan sonra her iki deneme yılında da APRX aktivitesi hemen hemen değişmemiştir.

Şekil 3.13 incelendiğinde  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de, birinci deneme yılında APRX aktivitesinde Haziran ayındaki azalışın ardından, Ekim ayına kadar kademeli olarak artış gerçekleşmiştir. Şubat ayına kadar yüksek seviyelerde kalan APRX aktivitesi, Şubat ayından itibaren azalış seyirine girmiştir. İkinci deneme yılında ise, APRX aktivitesinde Mayıs'tan Ağustos ayına kadar doğrusal bir azalış belirlenmiştir. Bu yıl itibariyle APRX aktivitesi Ağustos ayından itibaren yavaş bir yükseliş seyrine girmiştir. Takiben Aralık ayındaki belirgin yükseliş ile en yüksek seviyesine ( $1.32 \mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ) ulaşmıştır. Bu aydan sonra ise APRX enzim aktivitesi Mart ayına kadar doğrusal bir azalış göstererek Mart ayında en düşük seviyeye ulaşmıştır. Bu deneme yılı itibariyle APRX aktivitesinde Nisanda bir miktar yükseliş belirlenmiştir.

“Gemlik” zeytin çeşidinde kabuklarda yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların APRX aktivitesi üzerine etkileri Çizelge 3.7'de görülmektedir. Çizelgeye göre; yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların etkisi istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Yıllar itibariyle, APRX aktivitesi birinci deneme yılında ( $1.69 \mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ) ikinci deneme yılına ( $0.91 \mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ) göre daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Düşük sıcaklık uygulamaları dikkate alındığında APRX, kontrol'e ( $1.44 \mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ) göre  $4^{\circ}\text{C}$  ( $1.45 \mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ) ve  $-5^{\circ}\text{C}$  uygulamasında ( $1.53 \mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ) değişmez iken,  $-10^{\circ}\text{C}$  uygulamasında aktivite bir miktar azalmış ( $1.27 \mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ),  $-20^{\circ}\text{C}$  uygulamasında ise,  $0.75 \mu\text{mol}/\text{mgprotein}$  ile en düşük düzeyde tespit edilmiştir. Aylar göz önünde bulundurulduğunda en düşük APRX aktivitesi  $0.56 \mu\text{mol}/\text{mgprotein}$  olarak Nisan ayında belirlenmiştir. Kabuklarda yapraklardan farklı olarak sonbahar aylarındaki APRX aktivitesi kış aylarından daha yüksek durumda bulunmuştur. Örneğin, APRX aktivitesi  $2.14 \mu\text{mol}/\text{mgprotein}$  ile Ekim ve  $2.06 \mu\text{mol}/\text{mgprotein}$  ile Kasım ayında saptanırken, Ocak ve Şubat aylarındaki aktivite sırasıyla  $1.79 \mu\text{mol}/\text{mgprotein}$  ve  $1.19 \mu\text{mol}/\text{mgprotein}$  olmuştur. Yıl, sıcaklık ve ay arasındaki bütün

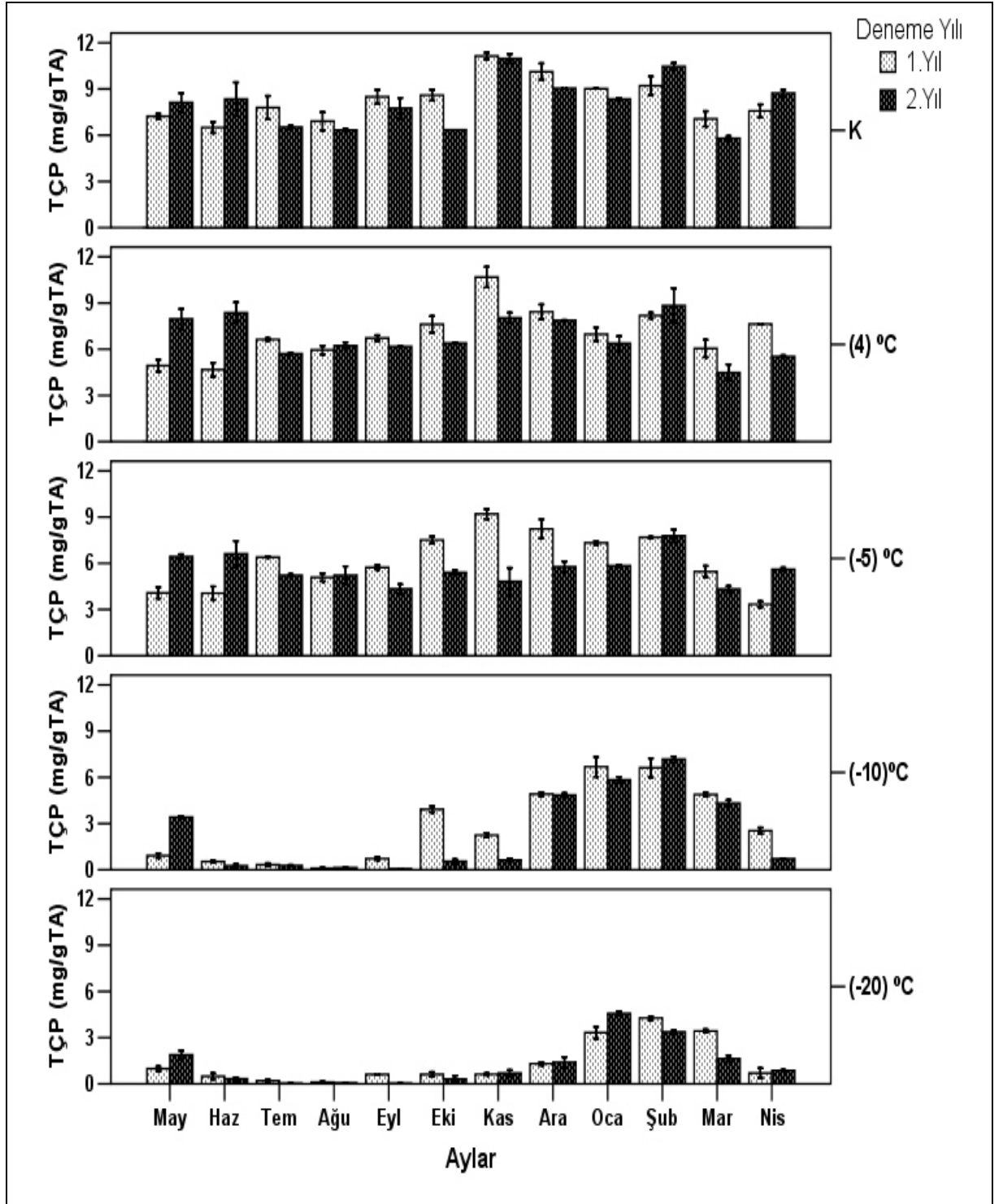
interaksiyonlarda; Yıl\*Ay ve Ay\*Sıcaklık interaksiyonları istatistiki olarak önemli; Yıl\*Sıcaklık ve Yıl\*Sıcaklık\*Ay interaksiyonları ise istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur (Ek-13).

### **3.6. Toplam Çözünabilir Protein İçeriği**

#### **3.6.1. Yapraklarda toplam çözünabilir protein içeriği**

“Gemlik” zeytin çeşidi yapraklarında yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre toplam çözünabilir protein içeriği (TÇP) içeriğinin değişimi Şekil 3.14’de ve Çizelge 3.8’de görülmektedir.

Kontrol grubunda yapraklarda TÇP içeriğinin değişimi genel olarak her iki deneme yılında da mevsimsel olarak birbirine uyumlu görülmektedir. TÇP içeriğinde özellikle Kasım ayındaki artış ve bahar aylarının başlangıcındaki azalış önemli görülmüştür. Ancak aylar bazında ele alındığında, yıllar arasında TÇP içeriğinin artış ve azalış eğilimlerinde farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Buna göre; birinci deneme yılında TÇP içeriği Mayıs ayından Eylül ayına kadar aynı seviyelerde devam ederken, Eylül ayından itibaren artış eğilimine girmiştir. Bunu takiben, TÇP içeriği Kasım ayında en yüksek seviyede (11.63 mg/gTA) tespit edilirken, kış aylarında da diğer mevsimlere göre daha yüksek TÇP içeriği (Aralık 10.45 mg/gTA Ocak 9.29 mg/gTA ve Şubat 8.98 mg/gTA) belirlenmiştir. Bahar aylarının başlangıcında (Mart ve Nisan) ise, TÇP içeriği belirgin şekilde azalmıştır. İkinci deneme yılında, TÇP içeriği Mayıs ve Haziran aylarında yaklaşık aynı seviyelerdeyken Temmuz ve Ağustos aylarında bir miktar düşmüştür. Eylül ayına gelindiğinde ise, TÇP içeriği tekrar artarak Mayıs ve Haziran ayı seviyelerine gelmiştir. Bunu takiben, TÇP içeriğinde Ekim ayında bir azalış olmuş ancak Kasım ayında tekrar artarak bu yıl itibariyle en yüksek seviyeye (10.97 mg/gTA) ulaşmıştır. Birinci deneme yılında olduğu gibi, kış aylarında TÇP içeriği diğer aylara göre yüksek olmuştur. Bu deneme yılı itibariyle bahar aylarında ise, TÇP içeriği Şubat ayından daha düşük bulunmuştur.



Şekil 3.14. “Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre toplam çözünebilir protein içeriğinin (TÇP - mg/gTA) değişimi. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  SS'larını göstermektedir.

4°C düşük sıcaklık uygulamasında genel olarak yıllar arasında uyum söz konusudur. Ancak bazı aylarda farklılıklar görülmüştür. Buna göre; birinci deneme yılında TÇP içeriği Mayıs (4.56 mg/gTA), Haziran (4.15 mg/gTA) aylarında en düşük durumda saptanmış; Temmuz ayından itibaren TÇP içeriği artarak Kasım ayında en yüksek seviyeye (11.00 mg/gTA) ulaşmıştır. Bundan sonraki aylarda ise artış ve azalışlar şeklinde dalgalanma görülmüştür. Bu aylar içerisinde Mart ayındaki azalış dikkat çekici bulunmuştur. İkinci deneme yılında TÇP içeriğinde Mayıs ve Haziran aylarından sonra düşüş gerçekleşmiş, takiben Kasım ayına kadar aynı seviyelerde kalmıştır. Kasım ayından itibaren TÇP içeriğinde artış ve azalışlar şeklinde dalgalanma belirlenmiş ancak en yüksek TÇP içeriği Şubat ayında (9.87 mg/gTA) tespit edilmiştir. Birinci deneme yılında olduğu gibi TÇP içeriğinde bahar aylarındaki (Mart ve Nisan) azalış önemli bulunmuştur.

-5°C'de TÇP içeriği birinci deneme yılında Mayıs'tan Ekim ayına kadar hafif dalgalanmalarla devam etmiştir. Bunu takiben, Ekim ayından itibaren kış ayları süresince diğer aylara göre TÇP içeriği daha yüksek seviyede belirlenmiştir. Mart ve Nisan aylarına gelindiğinde, TÇP içeriği belirgin olarak azalmıştır. İkinci deneme yılında, Şubat ayında en yüksek TÇP içeriği (7.78 mg/gTA) saptanmıştır. Diğer aylarda ise, TÇP içeriğinde hafif artışlar ve azalışlar görülmekle birlikte, miktarlar arasındaki değişimler çok net olmamıştır.

-10°C'de her iki deneme yılında da yapraklarda TÇP içeriğinin yaz ve kış mevsimleri arasındaki değişimi çok belirgin olmuştur. Buna göre, TÇP içeriği birinci deneme yılında Ağustos (0.10 mg/gTA), ikinci deneme yılında ise Ağustos (0.13 mg/gTA) ve Eylül (0.45 mg/gTA) aylarında en düşük seviyelerde belirlenmiştir. Bu ayları takiben her iki deneme yılında da hızlı protein birikimi ile beraber birinci deneme yılında Ocak (6.68 mg/gTA) ve Şubat (6.36 mg/gTA) aylarında; ikinci deneme yılında Şubat ayında (7.17 mg/gTA) en yüksek seviyede TÇP içeriği tespit edilmiştir. Bu aylardan sonra her iki deneme yılında da toplam protein içeriğinde kademeli azalma saptanmıştır.

-20°C uygulamasında, her iki deneme yılında da Haziran ayından itibaren azalma tespit edilen TÇP içeriğinde birinci deneme yılında Temmuz (0.20 mg/gTA) ve Ağustos



(0.11 mg/gTA) aylarında, ikinci deneme yılında ise Ağustos (0.05 mg/gTA) ve Eylül (0.02 mg/gTA) aylarında en düşük seviye saptanmıştır. Takiben artış eğilimine giren TÇP içeriği birinci deneme yılında Şubat (4.18 mg/gTA) ayında ikinci deneme yılında Ocak (4.56 mg/gTA) ayında en yüksek seviyelere ulaşmıştır. Diğer uygulamalarda olduğu gibi Mart ve Nisan aylarında her iki deneme yılında da TÇP içeriğinde kademeli azalma gerçekleşmiştir.

“Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların TÇP içeriği üzerine etkileri Çizelge 3.8’de görülmektedir. Çizelge incelendiğinde; düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların etkisi istatistiki açıdan önemli bulunurken, yılların etkisi önemsiz bulunmuştur. Uygulama sıcaklıkları düştükçe TÇP içeriğinin azaldığı görülmektedir. Buna göre, en yüksek TÇP içeriği 8.18 mg/gTA ile kontrol örneklerinde, en düşük TÇP içeriği ise, -20°C uygulamasına ait örneklerde 5.94 mg/gTA olarak tespit edilmiştir. Aylar dikkate alındığında, bahar ve yaz aylarında TÇP içeriğinin kış aylarına göre daha düşük olduğu açıkça görülmektedir. Buna göre en düşük TÇP içeriği Temmuz ve Ağustos aylarında sırasıyla 3.62 mg/gTA ve 3.50 mg/gTA olarak belirlenirken, en yüksek TÇP içeriği Şubat ayında 7.33 mg/gTA olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla, TÇP içeriği üzerine ayların ve sıcaklıkların önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık\*Ay, Ay\*Sıcaklık ve Yıl\*Sıcaklık\*Ay arasındaki interaksyonlar istatistiki açıdan önem arz ederken; Yıl\*Ay arasındaki ilişki ise önemsiz bulunmuştur (Ek-15).

### **3.6.2. Kabuklarda toplam çözünebilir protein içeriği**

“Gemlik” zeytin çeşidi’nde kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre toplam çözünebilir protein içeriğinin (TÇP) değişimi Şekil 3.15’de ve Çizelge 3.8.de görülmektedir.

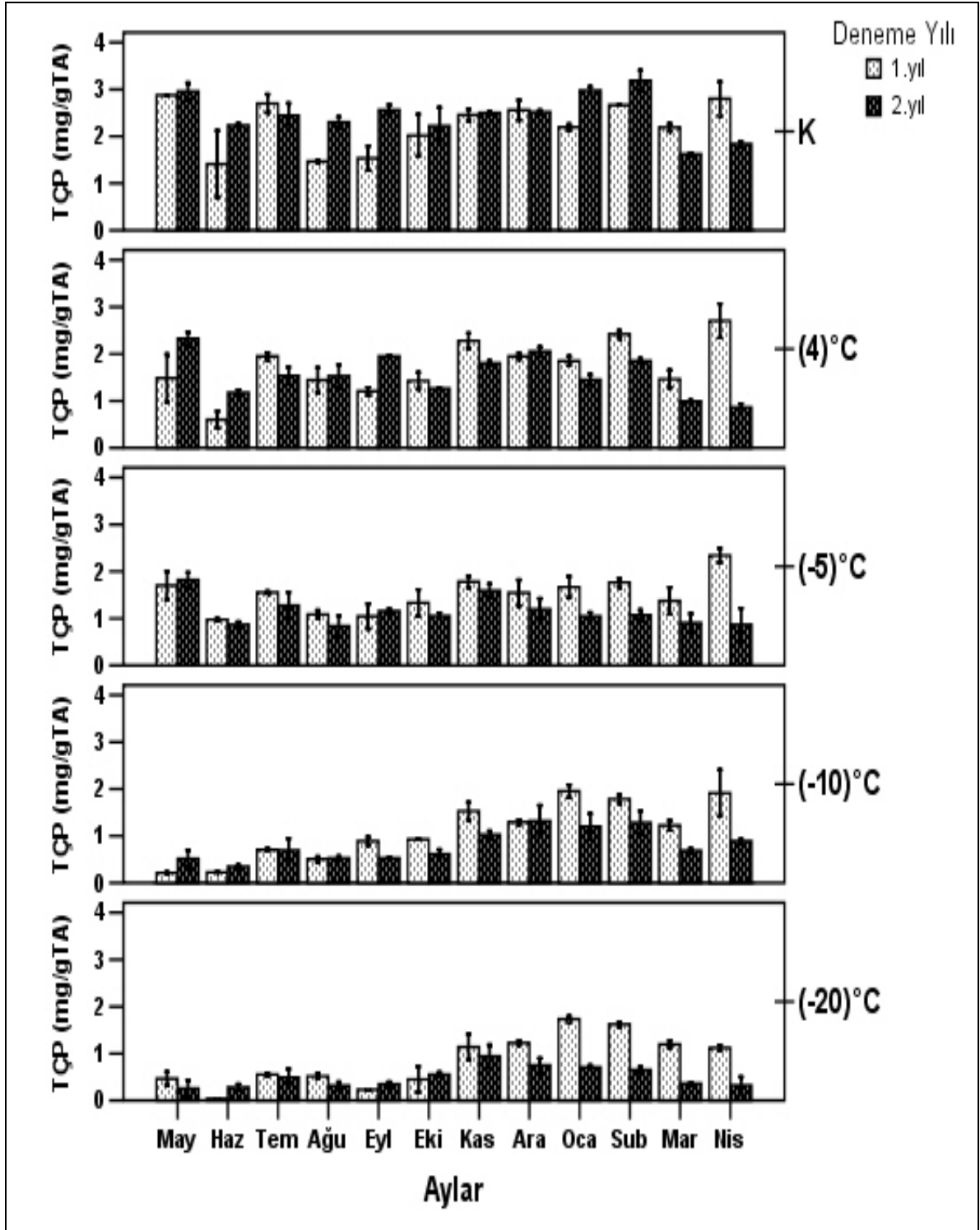
**Çizelge 3.8. “Gemlik” zeytin çeşidinde yapraklarda ve kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre toplam çözünebilir protein içeriği (mg/gTA)**

Değişkenler	Toplam Çözünebilir Protein İçeriği (mg/gTA)	
	Yaprak	Kabuk
<b>Yıl</b>		
1. Yıl	4.96 <sup>az</sup>	1.45 <sup>a</sup>
2. Yıl	4.86 <sup>a</sup>	1.26 <sup>b</sup>
<b>Uygulamalar</b>		
Kontrol	8.18 <sup>a</sup>	2.39 <sup>a</sup>
4°C	6.81 <sup>b</sup>	1.68 <sup>b</sup>
-5°C	5.94 <sup>c</sup>	1.32 <sup>c</sup>
-10°C	2.60 <sup>d</sup>	0.83 <sup>d</sup>
-20°C	1.28 <sup>e</sup>	0.69 <sup>e</sup>
<b>Aylar</b>		
Mayıs	4.74 <sup>c</sup>	1.42 <sup>b</sup>
Haziran	3.54 <sup>ef</sup>	0.79 <sup>e</sup>
Temmuz	3.62 <sup>fg</sup>	1.39 <sup>b</sup>
Ağustos	3.50 <sup>g</sup>	0.99 <sup>d</sup>
Eylül	4.24 <sup>ef</sup>	1.12 <sup>cd</sup>
Ekim	4.67 <sup>d</sup>	1.15 <sup>cd</sup>
Kasım	5.89 <sup>c</sup>	1.66 <sup>a</sup>
Aralık	6.06 <sup>bc</sup>	1.60 <sup>a</sup>
Ocak	6.44 <sup>b</sup>	1.65 <sup>a</sup>
Şubat	7.33 <sup>a</sup>	1.76 <sup>a</sup>
Mart	4.85 <sup>d</sup>	1.21 <sup>c</sup>
Nisan	4.32 <sup>ef</sup>	1.61 <sup>a</sup>
<b>ANOVA</b>		
Yıl x Ay	Ö.D	*
Yıl x Sıcaklık	*	*
Ay x Sıcaklık	*	*
Yıl x Sıcaklık x Ay	*	*

<sup>Z</sup> Aynı sütun ve değişkenlerde farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında %5 düzeyinde farklılık vardır (Duncan).

ÖD, \* %5 düzeyinde sırasıyla önemli değil ve önemli.

Kontrol grubu kabuk örneklerinde TÇP içeriği birinci deneme yılında Ağustos ayına kadar dalgalı bir seyir izlemiştir. Ağustos ayına gelindiğinde ise, TÇP içeriği belirgin olarak azalmıştır. Bunu takiben ilerleyen aylarda TÇP içeriğinde artış eğilimi gerçekleşmiş ve kış ayları süresince TÇP içeriğinin Ağustos ayına göre daha yüksek seviyelerde olduğu görülmüştür. Ancak genel olarak değerlendirildiğinde, kış aylarındaki TÇP içeriği Nisan, Mayıs



Şekil 3.15. “Gemlik” zeytin çeşidinde kabuklarda yıllara, sıcaklıklara ve aylara göre toplam çözünebilir protein içeriğinin (TÇP - mg/gTA) değişimi. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  SS’larını göstermektedir.

ve Haziran seviyeleri ile yaklaşık aynı olmuştur. İkinci deneme yılında TÇP içeriği Aralık ayına kadar aşağı yukarı aynı seviyelerde kalmıştır. Takiben TÇP içeriği Ocak ve Şubat aylarında artarak kış mevsimi süresince en yüksek seviyede (3.18 mg/gTA ve 2.99 mg/TA) tespit edilmiştir. Bu deneme yılında TÇP içeriğinde Mart ayından itibaren ani azalış meydana gelmiştir.

4°C’de, birinci deneme yılında Haziran ayındaki keskin azalışla en düşük TÇP seviyesi (0.60 mg/gTA) saptanmıştır. Bunu takiben, Temmuz ayında bir artış gerçekleşmiş, ancak Ağustos ayındaki bir miktar düşüşle birlikte aşağı yukarı Kasım’a kadar aynı seviyelerde kalmıştır. Bu uygulama itibariyle çevre sıcaklıklarının düşmesine paralel olarak (Şekil 2.2) Kasım ayında TÇP içeriğinde dikkat çekici bir artış gerçekleşmiştir. Aralık ve Ocak aylarında TÇP içeriğinde bir miktar azalış gerçekleşmesine rağmen bu aylardaki protein seviyeleri yaz aylarına göre daha yüksek miktarlarda belirlenmiştir. Şubat’ta tekrar belirgin bir artış; Mart ayında ise belirgin bir düşüş saptanmıştır. Nisan ayındaki keskin artış ise, dikkate değer görülmüştür. İkinci deneme yılında; Mayıs ayından itibaren Kasım ayına kadar dalgalanmalar olmuştur. Kasım ayından itibaren TÇP içeriği artış eğilimine girmiş kış mevsimi için en yüksek içerik Aralık ayı (2.05 mg/gTA) itibariyle tespit edilmiştir. Ocak ve Şubat aylarında bir miktar dalgalanmalar olsa da Mart ve Nisan aylarındaki keskin azalış önemli görülmüştür.

-5°C uygulaması itibariyle, her iki deneme yılında da TÇP içeriğindeki değişimler çok belirgin olmamıştır. Her iki deneme yılında da protein içeriğinde Mayıs ve Temmuz ayı hariç Kasım ayına kadar yaklaşık aynı seviyeler belirlenmiştir. Kasım ayından itibaren TÇP içeriği, birinci deneme yılında bir miktar yükselişle beraber Nisan ayına kadar hemen hemen aynı seviyelerde devam etmiş ve takiben Nisan ayında keskin bir artış tespit edilmiştir. İkinci deneme yılında ise, Kasım ayında belirgin yükselişle en yüksek TÇP içeriği saptanmıştır. Aralık ayından itibaren ise, TÇP içeriğinde bir miktar azalış meydana gelerek bu seviyeler Nisan ayına kadar devam etmiştir.

Kabuklarda  $-10^{\circ}\text{C}$  düşük sıcaklık uygulamasında TÇP içeriği açısından, birinci ve ikinci deneme yılında sonbahar ve kış aylarında yaz aylarına göre belirgin bir protein birikiminin olduğu görülmektedir. Örneğin, birinci deneme yılında en az TÇP içeriği Haziran ayında (0.28 mg/gTA) en fazla ise Aralık (1.29 mg/gTA), Ocak (1.96 mg/gTA) ve Nisan (1.92 mg/gTA) aylarında belirlenmiştir.

Şekil 3.15'den anlaşılacağı gibi, iki deneme yılı arasında miktarlar bakımından farklılıklar olmakla beraber  $-20^{\circ}\text{C}$  uygulamasında; temel olarak TÇP içeriğinin değişiminde bir paralellik olduğu dikkati çekmektedir. Birinci deneme yılında kabukların en az TÇP içeriği Haziran ayında 0.30 mg/gTA olarak saptanırken; en fazla TÇP içeriği Ocak ve Şubat aylarında 1.73 mg/gTA ve 1.63 mg/gTA olarak saptanmıştır. İkinci deneme yılında yaz aylarında genel olarak TÇP içeriği düşük seyretmiş, bir minimum noktası oluşmamıştır. Bu deneme yılı itibarıyla en yüksek protein içeriği ise Kasım ayında 0.94 mg/gTA olarak saptanmıştır.

“Gemlik” zeytin çeşidinde kabuklarda yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların TÇP içeriği üzerine etkileri Çizelge 3.8'de görülmektedir. Çizelge incelendiğinde; yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların etkisi istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Yılların, düşük sıcaklık uygulamalarının ve ayların TÇP içeriğine etkileri istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Birinci deneme yılı ortalama 1.45 mg/gTA ile ikinci deneme yılına (1.26 mg/gTA) göre daha yüksek protein miktarına sahip olmuştur. Uygulama sıcaklıkları düştükçe TÇP içeriğinin azaldığı açıkça görülmektedir. Buna göre, en yüksek TÇP içeriği (2.39 mg/gTA) kontrol örneklerinde belirlenirken; en düşük toplam TÇP içeriği ise  $-20^{\circ}\text{C}$  uygulamasında (0.69 mg/gTA) saptanmıştır. Aylar dikkate alındığında; kabuklarda proteinlerde aylık olarak dalgalanmalar görülmesine karşın, sonbahar ve kış aylarında fark edilir biçimde çözünebilir proteinlerin biriktiği tespit edilmiştir. En düşük TÇP içeriği Haziran ayında; en yüksek TÇP içeriği ise, aynı istatistiki grupta yer alan Kasım, Aralık, Ocak ve Şubat aylarında tespit edilmiştir. Bahar ve yaz aylarında TÇP içeriğinde hava sıcaklıklarına paralel olarak bazı dalgalanmalar saptanmıştır. Dolayısıyla, TÇP içeriği üzerine ayların ve sıcaklıkların önemli bir etkiye

sahip olduğu belirlenmiştir. Buna göre, yıl, sıcaklık ve aylar arasındaki tüm interaksiyonlar istatistiki olarak önemli bulunmuştur (Ek-16).

### **3.6.3. SDS-PAGE profilleri**

#### **3.6.3.1. Yapraklarda SDS-PAGE profilleri**

Tüm örneklerin SDS-PAGE analizleri en az 3 kez tekrarlanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca, her iki yılın denemelerine ait SDS-PAGE profilleri birbirinin aynı olmuştur. Bu nedenle denemeyi temsil eden en iyi SDS-PAGE profilleri bu bölümde sunulmuştur.

Araştırmada “Gemlik” zeytin çeşidi’inde yaprakların ve kabukların toplam protein profillerindeki değişimleri mevsimsel olarak belirleyebilmek amacıyla 12 aya ait kontrol örneklerinde SDS-PAGE yapılmıştır. Buna göre, yaprak örneklerinin aylar itibariyle toplam protein profilleri incelendiğinde genel anlamda profillerde benzerlikler görülmektedir (Şekil 3.16). Fakat, jel fotoğrafında işaretlendiği gibi aylara göre değişiklik gösteren iki protein dikkat çekici bulunmuştur. Buna göre, yaklaşık 66 kDa ağırlığında olduğu tahmin edilen ve Mart, Nisan, Mayıs aylarında baskın olan bir protein bandının kış ayları (Kasım, Aralık, Ocak ve Şubat) süresince yoğunluğunun arttığı, yaz aylarının başlangıcından itibaren sonbaharın sonlarına kadar (Haziran, Temmuz, Ağustos, Eylül ve Ekim) ise, bu bandın görünürlüğünün kaybolduğu saptanmıştır. Ayrıca, Mayıs ayında belirgin olarak görülen ve 43 kDa ağırlığında olduğu tahmin edilen bandın Haziran ayından itibaren yoğunluğunun azaldığı; yaz ve sonbahar aylarında tamamen kaybolduğu; kış ve bahar aylarında ise, bu proteinin yoğunluğunun tekrar arttığı belirlenmiştir.

Yine araştırmada yapraklarda ve kabuklarda her ayın düşük sıcaklık uygulamalarına göre toplam protein profillerindeki değişimleri incelemek amacıyla aylık don testlerine göre SDS-PAGE profilleri çıkarılmıştır.



Yapraklarda aylara ve sıcaklıklara göre SDS-PAGE profilleri Şekil 3.17(A,B)'da görülmektedir. Jel fotoğrafları incelendiğinde genel anlamda, yaklaşık 30, 40, 43, 57 ve 66 kDa ağırlığında olduğu tahmin edilen proteinlerin tüm aylarda kontrol, 4°C ve -5°C uygulamalarında mevcut olduğu ve genel olarak değişim göstermediği tespit edilmiştir. -10°C ve -20°C uygulamalarında ise, aylara göre değişimler dikkat çekici bulunmuştur. Buna göre, Mayıs ayında -10°C'de tüm bandların yoğunluğu oldukça azalmış; -20°C'de ise, bantların görünürlüğü kaybolmuştur. Takiben Eylül ve Ekim aylarında -10°C'de 57 kDa ağırlığındaki proteinin yoğunluğu oldukça azalmış, diğer bantların görünürlüğü ise kaybolmuştur. -20°C uygulamasında da bu aylarda herhangi bir protein bantı tespit edilmemiştir. Sonbahar aylarından itibaren düşük sıcaklık uygulamalarında kademeli olarak proteinlerin korunduğu göze çarpmaktadır. Kasım ayında her iki uygulamada 40, 43 ve 57 kDa ağırlığındaki proteinlerin yoğunlukları diğer uygulamalara göre azalmış ancak bu proteinler düşük sıcaklıklarda mevcudiyetlerini sürdürmüşlerdir. Aralık, Ocak ve Şubat aylarına gelindiğinde ise, düşük sıcaklık uygulamalarında (-10°C ve -20°C) herhangi bir protein bandının yoğunluğunun azalması ya da görünürlüğünün kaybolması söz konusu olmamıştır. Bu aylarda düşük sıcaklıklarda tüm proteinlerin yoğunlukları korunmuştur. Öte yandan, Mart, Nisan aylarından itibaren proteinlerde düşük sıcaklıklarda büyük oranda bozulmalar göze çarpmaktadır. Bu aylarda her iki düşük sıcaklık uygulamasında da 57 kDa haricindeki bandların görünürlüğü kaybolmuştur. 57 kDa'luk bandın yoğunluğu da diğer uygulamalara göre oldukça azalmıştır. Ayrıca yaklaşık 16 kDa bandının Ocak, Şubat ve Mart aylarında ortaya çıktığı belirlenmiştir.

### **3.6.3.2. Kabuklarda SDS-PAGE profilleri**

Kabuklarda kontrol örneklerine ait SDS-PAGE profilleri incelendiğinde, genel olarak profillerde çok benzerlikler görülmektedir (Şekil 3.18). Ancak, jel fotoğrafında işaretlendiği gibi mevsimsel olarak değişiklik gösteren 3 protein belirlenmiştir. Buna göre, soğuğa uyum sürecine paralel olarak kış ve bahar aylarında birikim gösteren yaklaşık 70, 43 ve 16 kDa ağırlığında olduğu tahmin edilen proteinlerin yaz süresince ve sonbaharın başlangıcında kaybolduğu görülmektedir.









Kabuklarda aylara ve sıcaklıklara göre SDS-PAGE profilleri Şekil 3.19 (A,B)'de görülmektedir. Jel fotoğrafları incelendiğinde yaklaşık 30, 40, 43, 57 ve 70 kDa moleküler ağırlığında olduğu tahmin edilen proteinlerin tüm aylarda kontrol, 4°C ve -5°C uygulamalarında mevcut olduğu ve genel olarak değişim göstermediği tespit edilmiştir. -10°C ve -20°C uygulamalarında ise aylara göre değişimler dikkat çekici bulunmuştur. Buna göre, Mayıs ayında -10°C ve -20°C'de 43 kDa ağırlığındaki proteinin yoğunluğu azalmış; diğer protein bantları ise görünürlüğünü kaybetmiştir. Haziran, Temmuz, Ağustos ve Eylül aylarında ise, -10°C ve -20°C'de hiçbir band görünmemektedir. Bunu takiben Ekim ayında kabuklarda -10°C uygulamasında tüm bantların mevcut; -20°C uygulamasında ise proteinlerin bozulduğu dikkat çekmektedir. Kasım ayından itibaren Şubat ayına kadar protein bantlarının düşük sıcaklık uygulamalarında değişmediği; tüm protein yapısının korunduğu çarpıcı şekilde göze çarpmaktadır. Mart ve Nisan aylarında -10°C ve -20°C uygulamalarında bantların görünürlüklerinin devam ettiği ancak yoğunluklarının azaldığı saptanmıştır. İlâveten, Aralık ayından itibaren 16 kDa ve yoğunluğu çok az olsa da 23 kDa ağırlığında olduğu tespit edilen bantların ortaya çıktığı gözlenmiştir.

#### **3.6.4. Western blot analizleri**

##### **3.6.4.1.Yapraklarda western blot analizleri**

“Gemlik” zeytin çeşidi'nde yaprak ve kabuklarda mevsimlere ve düşük sıcaklık testlerine göre dehidrin proteinlerinin rolünü belirlemek amacıyla immünoblot çalışması yapılmıştır. Bu amaç ile düşük sıcaklıklara mukavemetin en düşük olduğu aylardan biri olan Temmuz ayı ve mukavemetin en yüksek olduğu aylardan biri olan Ocak ayı seçilerek analizlenmiştir.

“Gemlik” zeytin çeşidi'nde yapraklarda aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre dehidrin proteinlerinin durumu Şekil 3.20 ve Şekil 3.21'de görülmektedir. Yapraklarda mevsimsel ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre değişiklik gösteren yaklaşık 16 ve 43 kDa moleküler ağırlığında iki dehidrin grubu protein belirlenmiştir.











Şekil 3.20’de görüldüğü gibi, 16 kDa dehidrin proteini Temmuz ayında Ocak ayına göre oldukça düşük yoğunlukta sentezlenmiştir. Temmuz ayında bu proteinin yoğunluğunun  $-10^{\circ}\text{C}$  düşük sıcaklık uygulamasına kadar bir miktar arttığı; öte yandan toplam protein profillerinde olduğu gibi (Şekil 3.17A)  $-10^{\circ}\text{C}$  ve  $-20^{\circ}\text{C}$  uygulamalarında bu proteinin sentezinin olmadığı saptanmıştır. Ocak ayında ise kontrol ve  $4^{\circ}\text{C}$ ’de 16 kDa dehidrin proteinin yoğunluğu aşağı yukarı aynı iken  $-10^{\circ}\text{C}$ ’ye kadar artmış ancak  $-20^{\circ}\text{C}$  uygulamasında proteinin yoğunluğu azalmıştır.

43 kDa ağırlığındaki dehidrin proteini de kış mevsiminde yaz mevsimine göre daha fazla sentezlenmiştir (Şekil 3.21). Temmuz ayında 16 kDa dehidrin proteininde olduğu gibi 43 kDa proteinin yoğunluğunun  $-5^{\circ}\text{C}$  düşük sıcaklık uygulamasına arttığı,  $-10^{\circ}\text{C}$  ve  $-20^{\circ}\text{C}$  uygulamalarında ise proteinin sentezinin olmadığı görülmektedir. Ocak ayında ise uygulamalar arasında dalgalanmalar olmasına rağmen genel olarak protein sentezinin yüksek seviyelerde olduğu saptanmıştır.

#### **3.6.4.2. Kabuklarda western blot analizleri**

“Gemlik” zeytin çeşidi’nde kabuklarda aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre dehidrin proteinlerinin durumu Şekil 3.22, 3.23, 3.24, 3.25’de görülmektedir. Kabuklarda mevsimsel ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre değişiklik gösteren yaklaşık olarak 16, 23, 30 ve 43 kDa ağırlığında dört dehidrin grubu protein belirlenmiştir.

Şekil 3.22 incelendiğinde, 16 kDa dehidrin proteinin Ocak ayında Temmuz’a göre bir miktar fazla sentezlendiği görülmektedir. Temmuz ayında protein yoğunluğunun  $-10^{\circ}\text{C}$  uygulamasına kadar doğrusal olarak artmasına rağmen,  $-10^{\circ}\text{C}$  ve  $-20^{\circ}\text{C}$ ’lerde bu proteinin sentezlenmediği saptanmıştır. Ocak ayında ise düşük sıcaklık uygulamalarına paralel olarak protein yoğunluğu artmış, özellikle de  $-20^{\circ}\text{C}$ ’deki artış dikkat çekici bulunmuştur.

23 kDa dehidrin bandınının kış mevsiminde yaz mevsimine göre daha fazla sentezlendiğini ve bu proteinin yaz mevsiminde  $-10^{\circ}\text{C}$ ’den itibaren sentezinin olmadığı

belirlenmiştir. Ayrıca, her iki aya düşük sıcaklık uygulamalarında 23 kDa dehidrin proteini yüksek yoğunlukta saptanmıştır (Şekil 3.23).

30 kDa moleküler ağırlığında tespit edilen bir başka dehidrin ailesi proteinin yoğunluğunun Temmuz ayında Ocak ayına göre daha fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 3.24). Öte yandan, kabuk dokusunda bu proteinin sentezinin Temmuz ayında  $-10^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar arttığı, bundan sonraki düşük sıcaklık uygulamalarında ise protein sentezinin gerçekleşmediği görülmektedir.

En son olarak 43 kDa dehidrin proteini için durum biraz daha değişik olmuştur (Şekil 3.25). Şöyleki; 43 kDa dehidrini kabuklarda hem yaz hem de kış mevsiminde yüksek düzeyde sentezlenmiştir. Ancak diğer uygulamalarda olduğu gibi yaz mevsiminde  $-10^{\circ}\text{C}$  uygulamasından itibaren bu protein bandının görünürlüğü kaybolurken; kış mevsiminde uygulamalara göre bir miktar dalgalanma görülmesine rağmen genel anlamda tüm uygulamalarda yüksek yoğunlukta sentezlemiştir.









#### 4. TARTIŞMA

Bahçe bitkileri yetiştiriciliğini etkileyen en önemli çevresel stres faktörlerinden bir tanesi de düşük sıcaklıklardır. Burada sunulan araştırmada da, zeytin bitkisinde düşük sıcaklık uygulamalarının incelenen parametreler bazında ciddi değişimlere neden olduğu, ancak tespit edilen bu değişimlerin, mevsimlere ve uygulama sıcaklıklarına bağlı olarak farklı seviyelerde meydana geldiği belirlenmiştir.

Bitkilerde stresi takiben hücrelerde meydana gelen geri dönüşümsüz zararlanmaların ilk göstergesi hücre membranında oluşan zararlanmalardır. Bu zararın iyon sızıntısı yöntemiyle belirlenmesi bitkinin strese toleransının tespitinde birincil öneme sahiptir ve sıcaklık stresi başta olmak üzere pekçok stres faktörüne karşı toleransın tespitinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Arora ve ark. 1992; Gusta ve ark. 2003; Gülen ve Eriş, 2003, 2004). Genellikle oransal iyon sızıntısının %50 seviyesi, ya da zararlanma indeksi, basitçe %50 doku ölümüne eşit olarak kabul edilmektedir (Arora ve ark. 1992). Bu çalışmada zeytin yaprak ve kabuk dokularının değişik düşük sıcaklıklara (4°C, -5°C, -10°C ve -20°C) reaksiyonlarını belirlemek amacıyla iyon sızıntısı yöntemi kullanılarak hücre membranının zararlanma seviyesi belirlenmiştir. Buna göre, **yaprak ve kabuk dokuları tüm aylar itibariyle 4°C ve -5°C uygulamalarında düşük oranda zararlanma göstermiştir. Ancak, mevsimlere bağlı olarak -10°C'den itibaren %50 zararlanma oranının üzerinde değerler tespit edilmiştir. Aylar itibariyle, -10°C ve -20°C'lerde yaprak dokularında zararlanma oranlarının en az olduğu dönemler hava sıcaklıklarının düşüşüyle beraber Ocak-Şubat aylarında, kabuk dokularında ise Kasım-Şubat ayları arasında olmuştur. En yüksek zararlanma oranları ise, yaprak dokularında Haziran-Ağustos, kabuk dokularında ise Mayıs-Eylül ayları arasında tespit edilmiştir. Burada elde edilen bulgulara benzer şekilde, başka bir çalışmada da (Cansev ve ark. 2007) zeytin yaprak dokularında düşük sıcaklık zararının kış aylarında yaz aylarına göre anlamlı olarak daha az olduğu gösterilmiştir.**

Ilıman iklimlere bağılı yaşayan çok yıllık bitkiler genellikle düşük sıcaklıklara tolerans ( $LT_{50}$ ) konusunda mevsimlere bağılı değişiklikler göstermektedir (Repo 1992; Silim ve Lavender 1994). Yapılan birçok araştırmada odunsu bitkilerin büyük bir bölümünün sonbaharın sonlarında ve kış başlangıcında hava sıcaklıklarının düşmesi ve gün uzunluklarının kısalması ile beraber kış soğuklarına uyum sağladıkları gösterilmiştir (Burak 1989; Suojala ve Linden 1997; Palonen 1999; Arora ve ark. 2004; Arora ve Lim 2005). Bizim çalışmamızda dikkati çeken nokta zeytinin çok yıllık hemdemyeşil bir tür olmasıdır. Bu türler kış aylarında tam bir dinlenme safhasına girmemekte, uygun koşullar olduğu sürece büyüme ve gelişmelerine devam etmektedirler (Lavee 1996). Oysa, genel olarak çok yıllık odunsu bitkilerde büyüme ve gelişmenin durdurulmasının düşük sıcaklıklara dayanım kazanma için bir ön koşul olduğu ve en fazla dayanıklılığa endodormansi ya da dinlenme periyodunda ulaşıldığı bilinmektedir (Linden 2002). Diğer yandan, Arora ve ark. (1992) kışın yaprağını döken diğer şeftali ağaçlarındaki gibi gerçek bir endodormansi periyodu olmayan herdemyeşil şeftali ağaçlarının da belirgin derecede düşük sıcaklıklara dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da zeytinde gerek yaprakların ve gerekse kabukların  $LT_{50}$ 'leri mevsimsel değişiklik göstermiştir. **Genel olarak,  $LT_{50}$ , hava sıcaklıklarının düşmeye başladığı sonbaharda artış göstererek kış ortasında en yüksek noktaya ulaşmış, takiben hava sıcaklıklarının tekrar yükselmeye başladığı bahar aylarından itibaren dereceli olarak azalarak yaz ortasında en düşük seviyeye düşmüştür. Bu sonuçlara göre, büyüme ve gelişmenin durmasının düşük sıcaklıklara dayanıklılığın ortaya çıkması için bir ön koşul olmadığı (Arora ve ark. 1992) hipotezi desteklenmiştir.**

Zeytinin düşük sıcaklık tolerans sıcaklığı ile ilgili literatürde çeşitli görüşler vardır. Moltay ve ark. (1982) ve Eriş ve Barut (2000) kış aylarında sıcaklığın  $-7^{\circ}\text{C}$ 'ye, Fontanazza (1986) ise  $-10^{\circ}\text{C}$ 'ye düşmesinin zeytin ağacının çeşitli organlarında önemli zararlar yapabileceğini belirtmektedirler. Palliotti ve Bonghi (1996) ise, dona hassas bir çeşit olan Frantoio'da  $LT_{50}$ 'nin  $-11.1^{\circ}\text{C}$  olarak saptamıştır. Bartolozzi ve Fontanazza (1999), 12 zeytin çeşidi'nde yapraklarda düşük sıcaklık uygulamaları sonucu dona dayanıklı çeşitlerde  $LT_{50}$ 'yi  $\sim -18^{\circ}\text{C}$ ; hassas çeşitlerde  $\sim -12^{\circ}\text{C}$  olarak belirlemişlerdir. İspanya'da yapılan bir araştırmada ise, 8 zeytin çeşidi arasından en dayanıklı olan



Cornicabra ve Picual çeşitlerinde  $LT_{50}$   $-13.3^{\circ}\text{C}$  ve  $-13.2^{\circ}\text{C}$ ; en hassas Empeltre çeşidinde  $-9.5^{\circ}\text{C}$  olarak saptanmıştır (Barranco ve ark. 2005). Cansev ve ark. (2005, 2006, 2007 ve 2008), 9 zeytin genotipi arasında Gemlik'i soğuğa karşı kısmen dayanıklı olarak tespit etmiştir. Bu araştırmalarda yapraklarda çeşitlerin durgun dönemde (Ocak)  $LT_{50}$ 'leri ortalama  $-13.6^{\circ}\text{C}$ ; aktif dönemde ise (Temmuz)  $LT_{50}$ 'leri ortalama  $-7.6^{\circ}\text{C}$  olarak saptanmıştır. **Sunulan bu araştırmada genel olarak,  $LT_{50}$ 'nin en yüksek olduğu dönemler hava sıcaklıklarının düşüşüyle beraber sonbahar sonundan itibaren kış ayları süresince olmuştur. Bu aylarda yapraklarda  $LT_{50}$   $\sim -15^{\circ}\text{C}$ , kabuklarda ise  $\sim -17^{\circ}\text{C}$  olarak belirlenmiştir.  $LT_{50}$ 'nin en düşük olduğu dönemler ise, yıl içerisinde hava sıcaklığının yüksek olduğu Haziran-Eylül ayları arasında saptanmıştır. Bu dönemde  $LT_{50}$ , yapraklarda  $\sim -7^{\circ}\text{C}$ , kabuklarda ise  $\sim -8^{\circ}\text{C}$  olarak belirlenmiştir.** Görüldüğü üzere, bu çalışmada  $LT_{50}$  değerleri ile ilgili olarak elde edilen sonuçlar literatürle paralellik göstermektedir.

Zeytin herdemyeşil meyve ağaçları arasında düşük sıcaklıklara en dayanıklı tür olduğu halde (Bartolozzi ve Fontanazza 1999), spesifik organ ve dokularına bağlı olarak düşük sıcaklıklara direncinde farklılıklar görülmektedir. Örneğin, **Antognozzi ve ark. (1990)** kış mevsiminde 4 zeytin çeşidinin ortalama  $LT_{50}$ 'lerini yapraklar için  $-12^{\circ}\text{C}$  ve kabuklar için  $-18^{\circ}\text{C}$  olarak belirlemişlerdir. Nitekim, bu çalışmada da hemen bütün dönemler için düşük sıcaklık uygulamalarında aynı sıcaklık derecesinde yaprak dokularının dona dayanımının, kabuk dokularından daha az olduğu açıkça görülmektedir.

Buraya kadar tartışılan sonuçlar; zeytin bitkisinin mevsimlere ve sıcaklıklara bağlı olarak önemli derecede düşük sıcaklıklara dayanım kazandığını ortaya koymuştur. Bir diğer ifadeyle, zeytin bitkisi soğuğa dayanıklılık esnasında bir şekilde hücre membran dayanıklılığını arttırabilmiştir. Uemura ve ark. (2006)'a göre, bitkilerin donma-çözünme döngüsü sırasında donma toleransını sağlamak için hücre membran dayanıklılığının artırılması gereklidir. Bunun yanında, diğer bazı odunsu türlere benzer şekilde zeytin bitkisinin hücreleri soğuyabilme (supercooling) kapasitesine sahiptir; bu durum zeytinin donmayı önleme mekanizması olduğu anlamına gelmektedir (Bongi ve Palliotti 1994).

Düşük sıcaklık zararından bitkilerin korunması için karbonhidratların üstlendiği fizyolojik ve biyokimyasal roller uzun süredir tartışılmaktadır. Dona dayanım ile suda eriyen karbonhidratların birikimi arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik yapılan araştırmalar; şekerin dona mukavemet mekanizmasında önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Yapılan birçok araştırmada otsu ve odunsu bahçe bitkilerinde karbonhidratların düşük sıcaklıklarda önemli olduğu ve özellikle çözünebilir şekerlerin dayanımın artmasında olumlu etki yaptığı ortaya çıkarılmıştır. Yıllarca yapılan ölçüm ve araştırmalar sonucunda genel olarak bitkilerde, suda eriyen karbonhidratların sonbahardan kışa doğru arttığı ve ilkbaharda düştüğü vurgulanmıştır (Sakai ve ark. 1968; Guy 1990; Burak 1989; Palonen 1999; Stupnikova ve ark. 2002; Jacobsen ve ark. 2005; Livingston ve ark. 2006). Soğuğa uyum sürecinde çözünebilir şekerler gibi çeşitli ozmolitlerin artışı zeytinde de (Lavee 1989; Bartolozzi et al. 1999,2001; Proietti ve Famiani 2002) gösterilmiştir. Örneğin, zeytin yapraklarında sonbaharda toplam ve indirgen şeker içeriğinde gerçekleşen artışların soğuğa uyum ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (Burak ve ark. 2000; Proietti ve Famiani 2002). Rejšková ve ark. (2007) ise, *in vitro* ortamda Picual zeytin çeşidi sürgünlerinde düşük sıcaklık uygulamaları (0 ve 4°C) ile toplam çözünebilir karbonhidrat ve sukroz miktarlarında artış olduğunu tespit etmişlerdir. **Çözünebilir şekerlerde gerçekleşen bu artışların, membranları stabilize edici etkilerinin olduğu (Crowe 2002; Hince ve Hagemann 2004), donma ile ilişkili olan dehidrasyonun etkisini hafiflettiği ve ayrıca membranların ve proteinlerin şeker tarafından korunduğu (Uemura ve ark. 2006) düşünülmektedir.**

Bu kanıtlara paralel şekilde bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, genel olarak iki deneme periyodunda sonbahar ve kış adaptasyonu sırasında yaprak ve kabuk dokularında toplam çözünebilir şeker içeriği (TÇŞ) artış göstermiştir. Bu durum, ortalama günlük sıcaklık değerlerinin kademeli olarak düşmesine paralel olmuştur. Kış mevsiminin sonunda ve bahar mevsimi sırasında dokuların TÇŞ, ortalama günlük sıcaklığın yavaş yavaş artmasına paralel olarak kademeli olarak azalmıştır. İlavenen, yaz mevsimi ve sonbaharın başlarında, yaprak ve kabuk dokularında kışın artan miktara kıyasla anlamlı derecede düşük TÇŞ tespit edilmiştir, bu da LT<sub>50</sub> değerleri ile paralel seyretmiştir. **Dolayısıyla buradaki sonuçlardan, TÇŞ'nin düşük sıcaklıklara dayanım üzerine olumlu etki yapan bir faktör olduğu anlaşılmaktadır. Zira, her**

**iki deneme yılında ve bitki dokusunda TÇŞ eğrisi, LT<sub>50</sub> eğrisi ile paralellik göstermektedir.** Son yapılan çalışmalar da (Palonen 1999; Stupnikova ve ark. 2002; Jacobsen ve ark. 2005; Livingston ve ark. 2006) bu görüşü destekler niteliktedir ve çözünebilir şekerlerin bitkilerde düşük sıcaklıklara dayanımındaki pozitif etkilerine işaret etmektedir.

Farklı bir bakış açısıyla, düşük sıcaklık uygulamalarına göre genel olarak her iki dokuda da -10°C ve -20°C uygulamalarında TÇŞ ve glukoz (Gİ), sukroz (Sİ) artmıştır . **Başka bir ifadeyle, zeytin dokuları düşük sıcaklığın şiddeti arttıkça TÇŞ'ni artırma eğilimde olmuştur.** Bu durumda sonuçlar, bitkilerde düşük sıcaklığa bağlı olarak TÇŞ'nin artışı gösteren çalışmalarla (Raese ve ark. 1977, 1978; Kaurin ve ark. 1981, Guy ve ark. 1992; Hinesley ve ark. 1992; Antikainen ve Pihakaski 1994; Sasaki ve ark. 1996) paralellik arz etmektedir.

Birçok çalışmada bitki dokularındaki çözünebilir karbonhidrat kompozisyonunun dona dayanımın artması üzerine etkisinden bahsedilmektedir (Fischer ve Höll 1991; Sauter ve ark. 1996). Özellikle Sİ'nin düşük sıcaklıklarda membran fosfolipidlerinin muhafazası için suyun görevini görmesi ve çözünebilir proteinlerin yapısal değişimini önlemesi (Farrant ve ark. 1993; Leprince ve ark. 1993) nedeniyle ayrı bir önemi vardır. Parker (1959), herdemyeşil türlerden koniferlerin kabuk ve yapraklarında sonbaharın sonlarından itibaren Sİ ve Gİ konsantrasyonunun arttığını saptamıştır. Palonen ve ark. (2000) soğuğa adapte olmuş ahududu çeşitlerinde soğuğa adapte olmamış döneme göre Sİ'nde *in vitro* ortamda %124-165, *in vivo* ortamda ise %253-582 oranında artış olduğunu belirlemişlerdir. Bartolozzi ve ark. (1999) ise, zeytinlerde deneme yapılan bölgede en soğuk günleri içeren Mart ayında Şubat ayına göre Sİ'nde 3 kat artış belirlemişlerdir. Rejšková ve ark. (2007), Picual zeytin çeşidi sürgünlerinde düşük sıcaklık toleransı ile ilgili olarak çözünebilir şekerlerdeki artışın rafinoz ve Sİ'den kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Guy ve ark. (1992), bitkilerde Sİ'nin metabolik ihtiyaçlarda hızlı bir şekilde mobilize olabilen bir depo karbonhidratı olduğunu ve düşük sıcaklıklarda solunum enerjisi için kolayca biriktiğini ifade etmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarda, gerek mevsimsel olarak, gerekse düşük sıcaklık uygulamalarına göre en keskin artış ve azalışlar Sİ'nde gerçekleşmiştir.

Örneğin, yaprak dokusunda Temmuz ve Ocak aylarındaki şeker içeriği karşılaştırıldığında, TÇŞ ve Gİ ~1/2 kat oranında artarken, Sİ ~8 kat artış göstermiştir. Ayrıca, LT<sub>50</sub>'nin en düşük olduğu yaz aylarında Sİ'nin çok düşük düzeylerde, LT<sub>50</sub>'nin en yüksek olduğu kış aylarında ise Sİ'ninde yüksek oluşu zeytinde dona dayanımda sukrozun önemini ortaya çıkarmaktadır. İlave olarak, bu sonuçlardan hareketle, kışa doğru zeytinde sukrozun kolayca polisakkaritlerden metabolize olarak hücreleri stabilize ettiği ve soğuğa dayanımı artırdığı kanısına varılmıştır. Nitekim yukarıda verilen örnekler de bu görüşü destekler niteliktedir.

Deneme yılları göz önüne alındığında yaprak dokusundaki çözünebilir şeker miktarının (sukroz hariç) yıllar arasında değişiklik göstermediği görülmektedir. Ancak kabuk dokusundaki şeker miktarı ilk deneme yılında ikinci deneme yılına göre daha yüksek miktarda belirlenmiştir. "Gemlik" çeşidi orta derecede periyodisyete göstermesine (Anonim 2006a) rağmen örnekleme yapılan bahçede ağaçlar birinci deneme yılı 'var', ikinci deneme yılında 'yok' dönemlerini yaşamışlardır. Barut ve Eriş (1995) zeytinde, Jacobsen ve ark. (2005) kazayağı (*Chenopodium quino* Wild.) bitkisinde artmış çözünebilir şeker düzeyleri ile verimin arasında paralel ilişkinin olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada da kabukta çözünebilir şekerlerde yıllar arasında oluşan farklılık ağaçların verimi ile ilişkilendirilebilir.

Bitkilerin strese uyumu iki aşamada gerçekleşmektedir (Stupnikova ve ark. 2004): 1. bitki savunma sisteminin oluşumu ve gelişimi; bu aşamada kısa süreli dayanım gerçekleşmektedir, 2. spesifik adaptasyon mekanizmalarının geliştiği aşama: bu aşama uzun süreli stres koşullarında bitkinin yaşamını sürdürmesine olanak vermektedir. Benzer şekilde Kacperska (1993) ve Prasad ve ark. (1994), bitkilerin soğuğa uyumunun da iki aşamadan oluştuğunu ifade etmişlerdir. Bu aşamalar: 1. günlerin kısılması ve sıcaklıkların düşmesi 2. yalnızca sıcaklıkların düşmesi. Düşük sıcaklıklara dayanımın tam olarak gerçekleşmesi için her iki aşamanın da oluşmasının gerekli olduğu düşünülmektedir. Bitkilerde düşük sıcaklıklara dayanım kazanma sürecinin başlangıcında ROS'ların biriktiğine (Prasad ve ark. 1994; Tao ve ark. 1998) ve buna bağlı olarak ROS'ları temizleyen antioksidant mekanizmaların kapasitelerinin yükseldiğine dair kanıtlar (Kenedall ve McKersie 1989; Tao ve ark. 1998; Guo ve ark.

2006) bulunmaktadır. Bu araştırmalar genel olarak antioksidant enzim aktivitelerinin  $H_2O_2$ 'i dzenleyebilmek amacıyla arttığını bildirmektedir. Zhou ve Zhao (2004), çim bitkilerinde soğuğa uyumun erken dönemlerinde sıcaklığın düşüşü ile beraber antioksidant enzim aktivitelerinin yükselmesinin soğuğa toleransın oluşması için gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Ancak, artışları sağlayan sinyal mekanizmaları henüz tam olarak bilinmemektedir. **Bu çalışmada da CAT ve APRX enzim aktivitelerinin mevsimsel olarak en fazla olduğu ayların  $LT_{50}$ 'nin ilk yükselmeye başladığı sonbahar ayları olması önemli bir nokta olarak dikkati çekmektedir.** Bu açıdan değerlendirildiğinde, bu çalışmanın devamında “Gemlik” zeytin çeşidinde yapılacak çalışmalarda antioksidant enzim aktivitelerinin yanında  $H_2O_2$  seviyesinin ölçülmesinin mekanizmanın daha iyi aydınlatılabilmesi açısından yerinde olacağı düşünülmüştür.

Çalışmada genel olarak, gerek yaprak gerekse kabuk dokularında CAT ve APRX enzim aktivitelerinin, soğuk uyumun gerçekleştiği sonbahar ve kış aylarında yaz aylarına göre daha yüksek seviyelerde olduğu belirlenmiştir. Bitkilerde soğuğa uyum sürecinde antioksidant enzim aktivitelerinde bir takım değişiklikler olmaktadır (Walker ve McKersie 1993). Örneğin, Kuk ve ark. (2003), soğuğa adapte olan hıyar bitkisi yapraklarında adapte olmayanlara göre CAT ve APRX aktivitelerinin yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Bu sonuçlardan yola çıkan araştırmacılar, düşük sıcaklık toleransında hıyarda soğuğa uyumda artmış antioksidatif enzim aktivitesi ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Chen ve ark. (2006), herdemyeşil *Sabina* bitkisinde soğuğa uyum esnasında CAT ve APRX enzimlerinin arttığını göstermişlerdir. Cansev ve ark. (2005, 2006, 2008) tarafından ise, zeytin çeşitlerinde kış aylarında CAT ve APRX enzim aktivitelerinin yaz aylarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamız da düşük sıcaklığa uyum sağlamış bitkilerin soğuğa tepki olarak enzimatik aktivitelerini yükselttiklerini gösteren araştırmalarla paralellik arz etmiştir.

**Öte yandan, araştırmada  $LT_{50}$ 'nin artmaya başladığı sonbahar aylarında CAT ve APRX enzim aktiviteleri artış gösterirken,  $LT_{50}$ 'nin en fazla olduğu kış aylarında sonbahara göre aktivitede bir miktar azalış gerçekleşmiştir. Bahar aylarında ise, CAT ve APRX aktivitelerinin yine bir miktar yükseldiği belirlenmiştir. Ayrıca, örnekleme yapılan yörede mevsimsel olarak sonbahar ve**

**ilkbahar aylarındaki sıcaklık farklılıklarının fazla olmasının doğal koşullar altında bitkilerde donma çözünme durumuna neden olduğu düşünülmüştür.**

Bununla ilgili olarak, Chen ve ark. (2006), herdemyeşil bir bitki olan *Sabina*'da soğuğa uyumun ilk safhasında (sonbahar ayları) antioksidant enzim aktivitelerinin arttığını (APRX, CAT, PRX), dayanım kazanılan kış aylarında enzim aktivitelerinin düştüğünü, ilkbahar aylarında ise tekrar artış eğilimine girdiğini saptamışlardır. Zhou ve Zhao (2004) ve Chen ve ark. (2006) ise, bitkilerde doğal olarak donma çözünme döngüsünün soğuğa uyumu sağlayan veya soğuğa uyumdan çıkmaya yardımcı olan sinyal olarak angulanabileceğini öne sürmüşlerdir. "Gemlik" zeytin çeşidi yaprak ve kabuk dokularında elde edilen bu sonuçlar da yukarıda örnek verilen çalışmaları ve öne sürülen hipotezi destekler niteliktedir.

Düşük sıcaklık uygulamalarına göre CAT ve APRX enzim aktivitelerinin değişimi incelendiğinde genel olarak, hem yaprak hem de kabuk dokularında CAT aktivitesinin düşük sıcaklık uygulamaları ile beraber azaldığını, oysa APRX aktivitesinin -5°C uygulamasına kadar istatistiksel olarak değişmediği, -10°C'den itibaren ise aylara bağlı olarak düşüş gösterdiği gözlenmiştir. Düşük sıcaklıklarda CAT aktivitesinin baskılandığını, APRX aktivitesinin ise değişmediğini veya arttığını gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, Arpa, çeltik, hıyar, turp, tütün, sütleğen (*Euphorbia esula* L.) ve *Arabidopsis* bitkilerinde düşük sıcaklık uygulanması ile CAT aktivitesinde belirgin bir azalma belirlenmiştir (Saruyama ve Tanida 1995; Fadzillah ve ark. 1996; Streb ve ark. 1999; Lee ve Lee 2000; Davis ve Swanson 2001; Gechev ve ark. 2003; Paranova ve ark. 2004). Çeltik, hıyar ve *Chorispora bungeana* bitkilerinde ise, düşük sıcaklık APRX enziminin dokularda aktive olmasına neden olmuştur (Fadzillah ve ark. 1996; Lee ve Lee 2000; Guo ve ark. 2006).

Tüm bu çalışmalarda gösterilen CAT enzimindeki baskılanmanın hala tam olarak net bir açıklaması yapılamamıştır. Ancak bu konu ile ilgili olarak çeşitli öngörüler vardır. Bu öngörüler şunlardır: a) CAT ekspresyonunun azalması; b) yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu tarafından enzim aktivitesinin engellenmesinin teşvik edilmesi; c) içsel (endojen) CAT inhibitörlerinin birikimi (Anderson ve ark. 1995; Prasad 1996, 1997; Chamnongpol ve ark. 1998). Genel olarak, araştırmacılar CAT aktivitesindeki

düşüşü  $H_2O_2$  seviyesindeki yoğun artışa bağlamaktadırlar (substrat inaktivasyonu). Bunun yanında, bitkilerde çevresel stresler sonucunda hücreler arasında oluşan  $H_2O_2$ , ilk olarak APRX enziminin bulunduğu sitoplazmaya nüfuz etmekte, daha sonra CAT'ın bulunduğu peroksizomlara (Sudhakar ve ark. 2001) geçmektedir. CAT'ın aksine, PRX(lar) elektron donörlerini kullanarak etki gösterir, bu da PRX'ın okside olabilen bileşiklere bağımlı olduğu anlamına gelir (Paronova ve ark. 2004). Ayrıca  $H_2O_2$ 'in APRX'e affinitesi CAT'e göre daha fazladır. Bu nedenle APRX'in düşük sıcaklık stresinde CAT'den daha etkin biçimde bitkileri düşük sıcaklık zararından koruduğu düşünülmektedir (Asada 1992). **Bu çalışmada elde edilen sonuçlar literatür bilgileri ışığında değerlendirildiğinde, zeytin yaprak ve kabuk dokularında düşük sıcaklıklarda ROS'un (özellikle  $H_2O_2$ ) yoğun olarak birikmiş olabileceğini ve sitoplazmik APRX'in düşük sıcaklık stresi nedeniyle CAT deaktivasyonu altında artan ROS'ları parçalayan anahtar enzim olabileceğini göstermektedir.**

Düşük sıcaklıklara dayanımda rol oynayan diğer bir faktör olan çözünebilir proteinler üzerine de pek çok araştırma yapılmıştır. Bir çok bitki türünde düşük sıcaklıklara dayanım ile çözünebilir proteinlerin artışı arasında paralel bir ilişkinin olduğu gözlenmiştir (Siminovitch ve Briggs 1949; Sakai ve Yoshida 1968; Pomeroy ve ark. 1970; Arora ve ark. 1992,1996; Thomashow 1999).

Bu çalışmada da deneme süresince toplam çözünebilir proteinler (TÇP) yaprak ve kabuk dokusuna göre miktarca değişmekle beraber, genel olarak hava sıcaklıklarının düştüğü sonbahar sonu kış mevsiminde  $LT_{50}$ 'nin artışına paralel şekilde artış göstermiştir. Öte yandan, bahar aylarında hava sıcaklıklarının kademeli olarak artması ve büyüme ve gelişmenin başlamasıyla birlikte özellikle Mart ayında hem yaprak hem de kabuk dokularında TÇP içeriği hızla düşmüştür. Bahar aylarındaki TÇP içeriğindeki bu düşüş aynı şekilde  $LT_{50}$ 'nin azalması ile paralellik göstermiştir. Bu sonuçları destekler şekilde, herdemyeşil bir tür olan kızıl çamda yapılan bir çalışmada kışın TÇP içeriğinin arttığı gösterilmiştir (Pomeroy ve ark. 1970). Benzer şekilde yaprağını döken ve herdemyeşil şeftali çeşitlerinde kış mevsiminde gerçekleşen  $LT_{50}$  artışı ile birlikte TÇP içeriğinde artış belirlenmiştir (Arora ve ark. 1992, 1996). Bu sonuçlara dayanarak

zeytinde düşük sıcaklıklara dayanımda çözünebilir proteinlerin pozitif katkı sağladığı görüşü öne çıkmaktadır.

**Bundan hareketle, zeytinde çözünebilir proteinlerin birikiminin düşük sıcaklıklara dayanımda olumlu etki yaptığı görülmektedir.** Hatta Graham ve Patterson (1982), düşük sıcaklıklara dayanımda proteinlerin artışının bir zorunluluk olduğunu iddia etmiştir. Bu düşünceden hareketle ileriki çalışmalarda, proteinlerin yapı taşlarını oluşturan amino asitlerin de dona mukavemetle olan ilişkilerinin daha detaylı olarak incelenmesinin oldukça yararlı olacağı ve konuya daha açıklık kazandıracağı söylenebilir.

**TÇP içeriği açısından her iki dokuda da uygulama sıcaklıkları düştükçe aylar arasındaki farklılığın daha belirgin hale geldiği dikkati çekmektedir. Özellikle -10°C'den itibaren yaz aylarındaki TÇP içeriği çok azalırken, kış aylarında protein birikiminin çok daha fazla olduğu gözlenmiştir.** Örneğin, -10°C'de yapraklarda TÇP içeriği birinci deneme yılında Ağustos'da 0.10 mg/gTA; Ocak'da 6.68 mg/gTA olarak tespit edilmiştir. Kabuklarda ise, birinci deneme yılında TÇP içeriği Haziran'da 0.28 mg/gTA; Ocak'da 1.96 mg/gTA olarak belirlenmiştir. Bunun yanında, gerek yaprak ve gerekse kabuk dokularında zararlanmanın Temmuz ayında Ocak ayına göre belirgin şekilde daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca düşük sıcaklık uygulamalarına göre SDS-PAGE profilleri incelendiğinde, yaz aylarında -10°C uygulamasından itibaren protein bandlarının görünmediği; oysa kış aylarında -20°C uygulamasında dahi tüm protein banlarının mevcut olduğu göze çarpmaktadır. Bununla birlikte, benzer durum çalışmada incelenen antioksidant enzim aktivitelerinde de görülmektedir. Düşük sıcaklıklarda bitkilerde hücresel zararlanmanın sonucunda proteinlerin denatüre olduğuna dair kanıtlar vardır (Guy ve ark. 1998). Dondan zararlanan bitki hücrelerinde, hücre canlılığının yitilmesi ile birlikte antioksidant enzimlerin bozulması ya da aktivasyonunun kaybolması söz konusu olmaktadır (Guo ve ark. 2006). **Sunulan bu çalışmada toplam protein sonuçları ile antioksidant enzim sonuçlarının birbirine paralel olması, hücresel zararlanma derecesinin proteinlerin denatürasyonu üzerine olan etkisini göstermektedir. Bu durum bize, soğuğa dayanımın en fazla olduğu kış mevsiminde doku proteinlerinin düşük**



**sıcaklık koşullarında yapılarının korunabildiğini, oysa dayanımın en az olduğu yaz aylarında ise aynı sıcaklık koşullarına karşı proteinlerin korunamadığına işaret etmektedir.**

Yaprak ve kabuk dokusunun aylık seyrine göre, SDS-PAGE profilleri incelendiğinde; yapraklarda 66 kDa ve 43 kDa; kabuklarda ise 70 kDa, 43 kDa, 23 kDa ve 16 kDa moleküler ağırlığındaki protein bantlarının sonbahar ve kış aylarında (Kasım, Aralık, Ocak, Şubat) sentezlerinin arttığı; yaz aylarında ise belirlenen bu bantlarının sentezinin olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, bitkilerde soğuğa uyum süresince yeni tip proteinlerin sentezlendiği ve biriktirildiği görüşü ile örtüşmektedir (Craker ve ark. 1969; Davis ve Gilbert 1970; Faw ve Jung 1972; Brown ve Bixby 1975; Faw ve ark. 1976; Rosas ve ark. 1986; Guy 1990; Arora ve ark. 1992). Guy (1990) ve Arora ve ark. (1992), bitkilerde soğuğa uyum sürecinde yeni bazı proteinlerin oluştuğunu ve kış süresince bu proteinlerin birikiminin genel bir tepki olduğunu öne sürmüştür.

“Gemlik” zeytin çeşidi yapraklarının ve kabuklarının SDS-PAGE profilleri iki deneme yılında da birbirinin aynısı olmuş ve periyodisiteye bağlı özel bir protein belirlenmemiştir. Lavee (1996), zeytinde periyodisitenin genetik olarak belirlendiğini ancak ekolojik koşullardan ve kültürel işlemlerden çok etkilendiğini belirtmektedir. Lavee ve Avidon (1994), yapraklarda “yok” yılında TÇP içeriğinin yüksek, “var” yılında ise TÇP içeriğinin düşük olduğunu ve kabuklarda bu durumun tersinin geçerli olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca en az periyodisite gösteren zeytin çeşitlerinin yapraklarında TÇP içeriği açısından yıllar arasında çok az farklılık olduğunu vurgulamışlardır. Bizim çalışmamızda ise daha önce belirtildiği gibi “Gemlik” zeytin çeşidinin orta derecede periyodisite göstermesi ve ekolojinin uygun olması ile bakım şartlarının iyi olmasına bağlı olarak, yaprak dokusunda her iki deneme yılı arasında TÇP içeriği açısından farklılık görülmemiştir. Öte yandan, kabuk dokusunda ise “var” yılı olan birinci deneme döneminde daha fazla TÇP içeriği belirlenmiştir. Bu sonuçlar da Lavee ve Avidon (1994)’nın sonuçları ile uyum göstermektedir.

Guy (1990), soğuğa uyum sağlamış ve düşük sıcaklıklara dayanıklı bitkilerin yeni tip proteinler üretirken bu proteinlerin yaz dönemlerinde görünmediklerini ileri

sürmüştür. Ayrıca soğuğa uyum sürecinde SDS-PAGE profillerinde bazı minör bandların görüldüğü bazılarının ise görünümünün kaybolduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, lahanada 7 kDa glikoprotein (Sieg ve ark. 1996), yoncada 32,19 ve 15 kDa depo proteinlerinin (Dhont ve ark. 2006) ve orman gülünde 27 kDa proteinin soğuğa uyumla birlikte arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, soğuğa uyum ile ilgili olarak proteinlerin hücre altı yapılarına ait bilgiler henüz sınırlıdır. Öte yandan, son yıllardaki çalışmalar düşük sıcaklık stresine giren bitkilerde plazma zarını dondan koruyucu maddelerin önemini gösteren çalışmaları kapsamaktadır (Uemura ve Yoshida 1984; Uemura ve ark. 2006). Bilindiği üzere, düşük sıcaklık zararında ilk hedef plazma membranıdır. Son yıllarda fonksiyonel genomik (functional genomic) çalışmalarda yaşanan gelişmeler, donma koşullarında plazma membranında sentezlenen yeni tip proteinlerin görevleri hakkında ilginç bilgiler edinilmesini sağlamıştır (Uemura ve ark. 2006). **Sunulan bu araştırmada, 66 ve 43 kDa yaprak proteinleri ve 70, 43, 30, 23 ve 16 kDa kabuk proteinlerinin birikiminin LT<sub>50</sub>'nin artışına paralel olması, bu proteinlerin plazma membranı için özel ya da dehidrin benzeri bir protein olabileceğini işaret etmektedir. Nitekim, immünunoblot çalışmaları yapraklarda 43 ve 16 kDa, kabuklarda da 43, 30, 23 ve 16 kDa moleküler ağırlığındaki polipeptidlerin dehidrin proteini olduğunu göstermiştir. Gerek yaprak gerekse kabuklarda tespit edilen bu dehidrin proteinleri kış aylarında yaz aylarına göre daha fazla sentezlenmiştir.** Bu sonuçlar dehidrinlerin mevsimsel değişimini gösteren çalışmalar ile paralel olmuştur (Wisniewski ve ark. 1996; Arora ve ark. 1997; Sarhan ve ark. 1997; Danyluk et al. 1998; Puhakainen ve ark. 2004; Rorat ve ark. 2006).

Dehidrin grubu proteinlerin düşük sıcaklık stresindeki rolleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, günümüze kadar yapılan çalışmalar dehidrinlerin membranları ve makromolekülleri stabilize ettiği, dehidrasyon sırasında hücresel yapının zararlanmasını önlediği ve enzimlerin aktivitelerini muhafaza ettiklerini kanıtlar yöndedir (Svensson ve ark. 2002). **Bizim çalışmamızda da membran zararlanmasını gösteren zararlanma oranları ile dehidrin proteinlerinin durumu değerlendirildiğinde; membran zararlanmasının düşük olduğu kış aylarında dehidrin proteinlerinin daha fazla sentezlediğini, zararlanmanın yüksek olduğu yaz aylarında ise dehidrinlerin daha az sentezlendiğini göstermektedir. Bu durum**

**dehidrinlerin membran yapısını koruduğu hipotezi ile örtüşmektedir.** Öte yandan, aynı genotipe ait farklı moleküler ağırlıktaki dehidrinlerin değişik rollere sahip olabileceğine (Örneğin, düşük sıcaklık, su stresi, ABA, fotoperiyod) ait görüşler vardır (Lim ve ark. 1999). Örneğin, Marian ve ark. (2004), rodedondranda 25 kDa dehidrin proteinin kısa gün koşullarında, 32 ve 26 kDa dehidrin proteinlerinin ise düşük sıcaklıkla teşvik edildiğini göstermişlerdir. Stupnikova ve ark. (2004) ise, buğdayda 209, 196, 66, 50 ve 41 kDa dehidrinlerinin soğuğa adaptasyonun ilk aşamasında etkili olduğunu, bununla birlikte 24, 22, 17, 15 ve 12 kDa dehidrinlerinin don stresi sırasında tepki olarak sentezlendiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, bu bitkide düşük moleküler ağırlıktaki dehidrinlerin stres toleransının artmasında rol oynadığını, yüksek moleküler ağırlıktaki dehidrinlerin kısa günle teşvik edildiğini vurgulamışlardır. Yine bitkilerde plazma membranı ve hücre altı yapılarında bulunan dehidrinlerin bazılarının fotoperiyoda bağlı olarak (Marian ve ark. 2004) bazılarının ise, düşük sıcaklıklarda etkinliklerinin arttığı ve donma esnasında da membran yapısını koruduğu ileri sürülmektedir (Puhakainen ve ark. 2004). Burada sunulan araştırmada tespit edilen dehidrinlerden 23 ve 16 kDa moleküler ağırlığındaki proteinlerin düşük sıcaklık uygulamaları ile daha fazla sentezlendiği; 43 ve 30 kDa moleküler ağırlığındaki proteinlerin ise uygulama sıcaklıklarına göre değişmediği görülmektedir. **Bu açıdan değerlendirildiğinde, 23 ve 16 kDa proteinlerinin düşük sıcaklıklarla teşvik edildiğini ancak 43 ve 30 kDa proteinlerinin ise fotoperiyoda bağlı olabileceğini göstermektedir.** Bu durumu açıklığa kavuşturmak için ileriki çalışmalarda kontrollü koşullarda fotoperiyod ve düşük sıcaklık uygulamaları yapılarak kurulacak denemeler, konunun daha net ortaya konulabilmesini sağlayacaktır.

**Ayrıca, dehidrin proteinlerin mevsimsel değişimi ile  $LT_{50}$  ve toplam protein görüntülerinin tam olarak paralellik göstermesi dikkat çekicidir. Bu durum bize, bitkinin ekonomik zarar eşiğinin ( $LT_{50}$ ) üzerine çıkıldığında hücresel yapıların geri dönüşümsüz olarak bozulduğuna işaret eden kuvvetli bir kanıt sunmaktadır.**

**Sonuç olarak, zeytin yaprak ve kabuk dokularında düşük sıcaklıkların  $LT_{50}$ , şekerler, proteinler ve enzimler üzerine etkileri mevsimlere ve sıcaklıklara göre farklı düzeyde olmuştur. Zeytin bitkisi günlük hava sıcaklıkların kademeli**

olarak azalması ile birlikte hücre membran dayanıklılığını arttırarak önemli derecede düşük sıcaklıklara dayanım kazanmıştır. Bu süreçte dona dayanım mekanizmasında önemli rolleri olan çözünebilir şekerler, antioksidant enzimler ve çözünebilir proteinler artış göstermiştir. Ayrıca, sukrozun TÇŞ ve glukoza göre; APRX'in CAT enzimine göre düşük sıcaklık stresi esnasında daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, çalışmanın diğer bir amacını oluşturan düşük sıcaklıklarda değişen belirleyici proteinlerin araştırılması esnasında yapraklarda 43 ve 16 kDa; kabuklarda ise 43, 30, 23 ve 16 kDa dehidrin proteinlerinin düşük sıcaklıklara dayanımla ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Şu ana kadarki bilgilerimize göre, bu çalışma zeytinde düşük sıcaklıklara dayanımı doğal yaşam şartlarının yanısıra yapay düşük sıcaklık testleri ile beraber inceleyen ilk detaylı çalışmadır. Ayrıca zeytinlerde antioksidant enzimler ve dehidrin benzeri proteinlerle ilgili yapılmış bir araştırmaya da rastlanmamıştır. Bu açıdan değerlendirildiğinde, bu çalışmadan elde edilen özgün sonuçlar genel olarak herdemyeşil bitkilerdeki soğuğa dayanıklılık mekanizmasının; özel olarak ise, zeytinde soğuğa dayanıklılığın fizyolojik mekanizmasının açıklanmasına yardımcı olmaya çalışmıştır.

**KAYNAKLAR**

- AKILLIOĞLU, M. 1994. Zeytin Ağaçlarında Doğal Fenolik Bileşiklerin Mevsimsel Değişimi Üzerinde Araştırmalar. Doktora tezi (Basılmamış). Ege Üniversitesi, İZMİR.182s.
- AKILLIOĞLU, M., N. ÖZILBEY, B. AYKAS, B. YÜCE. 1990. Zeytinde Büyümeyi Düzenleyici Maddelerin Kullanımı ve Alternansın Kontrolü. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir 65s.
- ALLEN, R.A. 1995. Dissection Of Oxidative Stress Tolerance Using Transgenic Plants, Plant Physiol., 107:1049-1054.
- ANCHORDOGUY, T.J., A.S. RUDOLPH, J.F. CARPENTER, J.H. CROWE. 1987. Modes of Interaction of Cryoprotectants with Membrane Phospholipids During Freezing. Cryobiology, 24:324-331.
- ANDERSON, M.D., T.K. PRASAD, C.R. STEWART. 1995. Changes in Isoenzyme Profiles of Catalase, Peroxidase and Glutathione reductase During Acclimation to Chilling in Mesocotyls of Maize Seedlings. Plant Physiol. 109, 1247-1257.
- ANONİM 1985. Bursa İli Çevresinde 1985 Yılı Kış Donlarına İlişkin Rapor (A. Eriş, ed.). U. Ü. ve Bursa Tarım İl Müd. Ortak Raporu, 10s.
- ANONİM 2003. Zeytin Yetiştiriciliği. Hasad Yayıncılık, İstanbul, 157 s.
- ANONİM 2006a. Zeytin Yetiştiriciliği. TAGEM, Çiftçi Eğitim Serisi Yayın No: 2006/14 (Ed: M. Aydemir, S. Daş). 95s.
- ANONİM 2006b. Ülkemiz Zeytinciliğinde Ümit Var Gelişmeler. Hasad Dergisi. 21:38-41.
- ANONİM 2008a. Zeytin Üretim İstatistikleri. Türkiye Devlet İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr>.
- ANONİM 2008b. Olive Production Data. FAO Official Web Sites. <http://www.fao.org>.
- ANTIKAINEN, M. and S. PIHAKASKI. 1994. Early developments in RNA, protein, and sugar levels during cold stress in winter rye (*Secale cereale*) leaves. Annals of Botany, 74:335-341.

- ANTIKAINEN, M. and M. GRIFFITH. 1997. Antifreeze Protein Accumulation in Freezing Tolerant Cereals. *Physiol. Plant.*, 99:423-432.
- ANTOGNOZZI, E., M. PILLI, P. PROIETTI, F. ROMANI. 1990. Analysis of Some Factors Affecting Frost Resistance in Olive Trees. XXIII. International Horticultural Congress-Firenze (Italy). Abstract Book 4289.
- APEL, K. and H. HIRT. 1999. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55:373-99.
- ARORA, R. and M.E. WISNIEWSKI. 1994. Cold Acclimation In Genetically Related (Sibling) Deciduous and Evergreen Peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). II. A 60 kD Polypeptide In Cold Acclimated Bark Tissue of Peach Is Heat-Stable And Related To Dehydrin Family of Proteins. *Plant Physiology*, 105:95-101.
- ARORA, R. and C.C. LIM. 2005. A 27 kDa *Rhododendron* Protein Is Associated With Constitutive Freezing Tolerance and Is Related To The ABA/Water Deficit Stress-Inducible Family Of Proteins. *J. Hort. Sci. & Biotech.*, 80:171-176.
- ARORA R., M.E WISNIEWSKI., R. SCORZA. 1992. Cold Acclimation In Genetically Related (Sibling) Deciduous and Evergreen Peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). I. Seasonal Changes In Cold Hardiness And Polypeptides of Bark And Xylem Tissues. *Plant Physiology*, 99:1562-1568.
- ARORA, R., M.E. WISNIEWSKI, L.J. ROWLAND. 1996. Cold Acclimation and Alterations in Dehydrin and Bark Storage Proteins in The Leaves of Sibling Deciduous and Evergreen Peach. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 121:915-919.
- ARORA, R., L.J. ROWLAND, G.R. PANTA. 1997. Chill-responsive Dehydrins in Blueberry: Are They Associated with Cold Hardiness or Dormancy Transitions? *Physiol. Planta.*, 101:8-16.
- ARORA, R., S.L. KREBS, C.C. LIM. 2002. Mapping Cold Hardiness Genes in Rhododendrons: Assessment of Strategy. *Jour. American Rhododendron Society*, 203-206.
- ARORA, R., L.J. ROWLAND ve G.R. PANTA, C.C. LIM, J.S. LEHMAN, N. VORSA, 1998. Genetic Control of Cold Hardiness in Blueberry. In: *Plant Cold Hardiness* (Li and Chen, eds), Plenum Presss, 99-106.
- ARORA, R., L.J. ROWLAND, E.L. OGDEN, A.L. DHANARAJ, C.O. MARIAN, M.K. EHLENFELDT, B. VINYARD. 2004. Rate of Dehardening, Stage of Bud Opening, and Changes In Dehydrin Metabolism in Blueberry (*Vaccinium* spp.) Cultivars During Deacclimation at Constant, Warm Temperatures. *J. Amer Soc. Hort. Sci.*, 129 (5):667-674.
- ARTLIP, T.S., A.M. CALLAHAN, C.L. BASSETT, M.E. WISNIEWSKI. 1997. Seasonal Expression of A Dehydrin Gene In Sibling Deciduous and Evergreen

- Genotypes of Peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). Associated with Development of Extreme Freezing Resistance In Black Locust. *Tree Plant Mol. Biol.*, 33:61–70.
- ASADA, K. 1992. Ascorbate Peroxidase- a Hydrogen Peroxide-Scavenging Enzyme in Plants. *Physiol. Plant.*, 85:235-241.
- AYANOĞLU H., C.TOPLU, S.BEYAZIT, S.YILMAZ. 2000. Değişik Köklendirme Ortamlarının Bazı Zeytin Çeliklerinin Köklendirilmeleri Üzerine Etkisi. 1. Zeytincilik Sempozyumu, 6-9 Haziran 2000, Bursa. 387-393.
- AYKAS, B., M. AKILLIOĞLU, N. ÖZİLBEY, S.S. ÖZGEN. 1998a. Zeytinde Çiçek Tomurcuğu Oluşumunun CEPA ve GA<sub>3</sub> ile Kontrolü Üzerinde Bir Araştırma. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir s.87.
- AYKAS B., S. UYSAL, Ö. CANÖZER, S.S. ÖZGEN, A. ULUSKAN, N. ÖZİLBEY. 1998b. Zeytinin Doku Kültürü Yoluyla Üretilmesi Üzerinde Araştırmalar. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir s.85.
- BACHMANN, M., P. MATILE, F. KELLER. 1994. Metabolism of The Raffinose Family Oligosaccharides In Leaves of *Ajuga reptans* L.. *Plant Physiol.* 105: 1335–1345.
- BAEK, K.H. and D.Z. SKINER. 2003. Alteration of Antioxidant Enzyme Gene Expression During Cold Acclimation Of Near-Isogenic Wheat Lines. *Plant Science* 165:1221-1227.
- BARRANCO D., N. RUIZ, M.G. CAMPO. 2005. Frost Tolerance of Eight Olive Cultivars. *Hortscience*, 40(3):558-560.
- BARTOLINI, G., G. DI MONTE, E. REA, M.A. TOPONÍ. 1999. Protein Patterns in Response to Cold Stress on Clones of *Olea Europaea* L., cv Leccino. *ActaHort.*474
- BARTOLOZZI, F and G. FONTANAZZA. 1999. Assessment of Frost Tolerance in Olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Hort.* 81:309-319.
- BARTOLOZZI, F, M. MENCUCCINI, G. FONTANAZZA. 2001. Enhancement of Frost Tolerance In Olive Shoots *In Vitro* By Cold Acclimation and Sucrose Increase In The Culture Medium. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 67:299-302.
- BARTOLOZZI, F, ROCCHI P, F. CAMERINI, G. Fontanazza. 1999. Changes of Biochemical Parameters In Olive (*Olea europaea* L.) Leaves During an Entire Vegetative Season, and Their Correlation With Frost Resistance. *Acta Hort.*, 474: 435-440.
- BARTOLOZZI, F, F.CERQUAGLIA, L. COPPARI, G. FONTANAZZA. 2002. Frost Tolerance Induced by Cold Acclimation in Olive (*Olea europaea* L. *Acta Hort.*, 586:473-475.

- BARUT, E. 1992. Gemlik Zeytin Çeşidinde Bilezik Alma, Seyreltme ve Büyüme Düzenleyici Kimyasal Maddelerin Verim, Kalite ve Periyodisiteye Etkileri Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi. (Basılmamış), Uludağ Üniversitesi. BURSA. 70s.
- BARUT, E. 2000. 'Gemlik' ve 'Çelebi' Zeytin Çeşitlerinde Değişik Hasat Metotlarının Meyve Verim ve Kalitesi Üzerine Etkileri. Türkiye I. Zeytincilik Sempozyumu(6-9 Haziran 2000), Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri ve Gıda Mühendisliği Bölümleri, Bursa, 406-411.
- BARUT, E. ve A. ERİŞ. 1993. Gemlik Zeytin Çeşidinde Bilezik Alma, Seyreltme ve Büyüme Düzenleyici Kimyasal Maddelerin Verim, Kalite ve Periyodisiteye Etkileri Üzerine Bir Araştırma. Doğa, Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi 17: 953-970.
- BARUT, E. ve A. ERİŞ. 1995. "Gemlik" Zeytin Çeşidinin Bazı Organlarındaki Karbonhidrat Değişimleri Üzerine Bir Araştırma. Türkiye 2. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 3-6 Ekim 1995, Adana, (Meyve) Cilt I: 721-725.
- BARUT, E. ve A. ERİŞ. 2000. Bursa Yöresinde Yetiştirilen Değişik Zeytin Çeşitlerinin Periyodisiteye Eğilimlerinin Saptanması Üzerine Bir Araştırma. Türkiye I. Zeytincilik Sempozyumu(6-9 Haziran 2000), Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri ve Gıda Mühendisliği Bölümleri, Bursa, 356-360.
- BARUT, E., Ü. ERTÜRK 2002. Gemlik Zeytin Çeşidinde Çiçek Tomurcuğu Farklılaşması ve Gelişimi Üzerine Bir Araştırma. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 16:29-35
- BECK, E.J., R. HEIM, J. HANSEN. 2004. Plant Resistance to Cold Stress: Mechanisms And Environmental Signals Triggering Frost Hardening And Dehardening. J. Biosci., 29(4): 449-459.
- BONGI, G. and A. PALLIOTTI. 1994. Olive. En: Handbook of Enviromental Physiology of Fruit Crops. Volume I: Temperature crops. B.Schaffer and P.C. Andersen. CRC Press Inc. Boca Ratón. Florida., 165-187.
- BOROVSKII, G.B., I. STUPNIKOVA, A.I. ANTIPANA, S.V. VLADIMIROVA, V.K. VOINIKOV. 2002. Accumulation of Dehydri-Like Proteins In Mitochondria of Cereals In Response To Cold, Freezing, Drought and ABA Treatments. BMC Plant Biology, 2:5.
- BOURION V., I. LEJEUNE-HENAUT, N. MUNIER-JOLAIN, C. SALON. 2003. Cold Acclimation of Winter and Spring Peas: Carbon Partitioning as Affected By Light Intensity. European Journal of Agronomy, 19:535-548.
- BOWLER, C., M. MONTAGU, D. INZE. 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. Annu. Rev. Plant Physiol., Plant Mol. Biol., 43: 83-116.



- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *AnalBiochem*.72:48-254.
- BRAVO, L.A., J. GALLORDO, A. NAVARRETE, N. OLAVE, J. MARTINEZ, M. ALBERDI, T.J. CLOSE, L.J. CORCUERA. 2003. Cryoprotective Activity of A Cold-Induced Dehydrin Purified From Barley. *Physiologia Plantarum*, 118:262-269.
- BROWN, G. N. and J. A. BIXBY. 1975. Soluble and Insoluble Protein Patterns During Induction of Freezing Tolerance In Black Locust Seedlings. *Physiol. Plant.*, 34:187–191.
- BURAK, M. 1989. Marmara Bölgesinde Yetiştirilen Önemli Bazı Şeftali Çeşitlerinin Dona Dayanımları Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi (Yayınlanmamış). BURSA, 148s.
- BURAK, M. ve A. ERİŞ. 1992. Relationships Between Frost Resistance and Carbohydrate, Protein and Lipid Contents in Buds of Some Peach Cultivars. *Acta Hortic*. 315 (Peach): 61-70.
- BURAK, M., A.R. SÜTCÜ, M. BÜYÜKYILMAZ. 2000. Bazı Zeytin Çeşitlerinin Kış Soğuklarına Dayanıklılıkları Üzerinde Araştırmalar. Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu, Bildiriler Kitabı, 101-108.
- CANÖZER, Ö. 1991. Standart Zeytin Çeşitleri Kataloğu. T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı MeslekiYayınlar, Seri:16.
- CANSEV, A., H. GÜLEN, A. ERİŞ. 2008. Cold-Hardiness of Olive (*Olea Europaea* L.) Cultivars in Cold-Acclimated and Non-Acclimated Stages : Seasonal Alteration of Antioxidative Enzymes and Dehydrin-Like Proteins. *Journal of Agricultural Science* (in Press).
- CANSEV, A., H. GÜLEN, A. İPEK, A. ERİŞ. 2006. Seasonal Changes In Various Enzyme Activities In Olive Genotypes. Plant Biology Meeting, August 5-9 2006, Boston, MA, USA, p. 140.
- CANSEV, A., H. GÜLEN, E. YALÇINKAYA, A. ERİŞ. 2007. Bazı Zeytin Çeşitlerinin Aktif Ve Durgun Büyüme Dönemlerinde Düşük Sıcaklıklara Toleransları. V. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 04-07 Eylül 2007, Atatürk Üniversitesi, Erzurum. Cilt1, 207-209.
- CANSEV, A., N. KÖKSAL, H. GÜLEN, A. İPEK ve A. ERİŞ. 2005. Düşük Sıcaklık Stresi Altındaki Bazı Zeytin Çeşitlerinin Peroksidaz Aktivitesine Göre Gruplanması. 14. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 31 Ağustos - 2 Eylül 2005, Eskişehir, Bildiri ve Poster Kitabı, 313-317.

- CARAN, D. 1994. Zeytinde Mekanik Hasat Olanaklarının Araştırılması. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir. s.75.
- CARPENTER, J.F., S.C. HAND, L.M. CROWE, J.H. CROWE. 1986. Cryprotection of Phosphofructokinase With Organic Solutes: Charecterization of Enhanced Protection In The Presence Divalent Cautions. Archives of Biochemistry and Biophysics, 250: 505-512.
- CASTONGUAY, Y., P. NADEAU, P. LECHASSEUR, L. CHOUINARD. 1995. Differential Accumulation of Carbohydrates In Alfalfa Cultivars of Contrasting Winterhardiness. Crop Sci., 35:509–516.
- CHAMNONGPOL, S., H. WILLEKENS, W. MOEDER, C. LANGEBARTELS, H. SANDERMANN, M. VAN MONTAGU, D. INZE, W. VAN CAMP. 1998. Defense Activation and Enhanced Pathogen Tolerance Induced By H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> In Transgenic Tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci., 95: 5818-5823.
- CHEN, H. H. and P.H. LI. 1980. Biochemical Changes in Tuber-Bearing Species in relation to frost hardiness during cold acclimation. Plant Physiol., 66:414-21.
- CHEN, W., N. J. PROVART, J. GLAZEBROOK, F. KATAGİRİ, H.S. CHANG, T. EULGEM, F. MAUCH, S. LUAN, G. ZOU, S. A. WHITHAM. 2002. Expression Profile Matrix of Arabidopsis Transcription Factor Genes Suggests Their Putative Functions in Response to Environmental Stresses. Plant Cell, 14, 559-574.
- CHEN Y., M. ZHANG, T. CHEN, Y. ZHANG, Y. AN. 2006. The Relationship Between Seasonal Changes In Anti-Oxidative System and Freezing Tolerance In The Leaves of Evergreen Woody Plants of *Sabina*. South African Journal of Botany, 72(2): 272-279.
- CLOSE, T.J. 1997. Dehydrins: A Commonality In The Response Of Plants To Dehydrin And Low Temperature. Physiol. Plant., 100:291-296.
- CRAKER, L. E., V. GUSTA, C. J. WEISER. 1969. Soluble Proteins and Cold Hardiness of Two Woody Species. Can. J.Plant Sci., 49:279-286.
- CROSATTI, C., E. NEVO, A.M. STANCA AND L. CATTIVELLI. 1996. Genetic Analysis of The Accumulation Of COR14 Proteins In Wild (*Hordeum spontaneum*) and Cultivated (*Hordeum vulgare*) Barley. Theor. Appl. Genet., 93: 975-981.
- CROWE, LM. 2002. Lessons from Nature: The role of sugars in anhydrobiosis. Comp. Biochem. Physiol., 131:505-513.
- CROWE J.H., L.M. CROWE, J.F. CARPENTER, A. WISTROM. 1987. Stabilization of Dry Phospholipid Bilayers and Proteins By Sugars. Biochem. J. 242:1-10.

- ÇAVUŞOĞLU, A. 1973. Zeytinlerde Meyvenin Tutunma Gücünü Azaltmak ve Hasadı Kolaylaştırmak Maksudıyla Ethrel Kullanılması Üzerine Bir Çalışma. I İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir, s.7.
- ÇAVUŞOĞLU, A. 1977. Memecik Zeytin Çeşdinin Hasadında Bazı Kimyasal Maddelerin Kullanılması. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir, s.13.
- ÇAVUŞOĞLU, A. ve M. ÇAKIR 1978. Periyodik Olarak Tatbik Edilecek Mahsul Budamasının Zeytinlerde Verimlilik Üzerine Tesirinin Araştırılması. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir s.23.
- DANYLUK, J., A. PERRON, M. HOUDE, A. LIMIN, B. FOWLER, N. BENHAMOU, F. SARHAN. 1998. Accumulation of an Acidic Dehydrin in The Vicinity of The Plasma Membrane During Cold Acclimation of Wheat. *Plant Cell*, 10:623–638.
- DAVIS, D. L. and B.GILBERT W. 1970. Winter Hardiness and Changes In Soluble Protein Fraction Of Bermudagrass. *Crop.Sci.*, 10:7-9.
- DAVIS, G. D. and R. SWANSON. 2001. Activity of Stress-Related Enzymes In The Perennial Weed Leafy Spurge (*Euphorbia esula* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 46: 95-108.
- DHANARAJ, A.L., J.P. SLOVIN, L.J. ROWLAND. 2005. Isolation Of A Cdna Clone And Characterization Of Expression Of The Highly Abundant, Cold Acclimation-Associated 14 Kda Dehydrin Of Blueberry. *Plant Science*, 168(4): 949-957.
- DHONT, C., Y. CASTONGUAY, P. NADEAU, G. BELANGER, R. DRAPEAU, S. LABERGE, J-C. AVICE, F. CHALIFOUR. 2006. Nitrogen Reserves, Spring Regrowth and Winter Survival of Field-grown Alfalfa (*Medicago sativa*) Defoliated in the Autumn. *Annals of Botany*, 97(1):109-120.
- DİKMEN, İ. 1969. Zeytin Çeliklerinin Köklendirilmesi Üzerine Araştırmalar. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir, s.1.
- DİKMEN, İ. ve A. ULUŞKAN. 1982. Önemli Zeytin Çeşitlerimizde Sisleme Metodu İle Çeliklerin Köklenme Nispetleri Ve Uygun Köklenme Vasıtalarının Tespiti. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir, s.37.
- DİKMEN, İ. ve S. UYSAL. 1985. Entansif Plantasyonlarda Aralık Ve Mesafeler Üzerinde Araştırma. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir, s.49.
- DUMAN, S. 2003. Dünya Sofralık Zeytin Üretimi, Dış Ticareti ve Son Dönemdeki Gelişmeler. Türkiye 1. Zeytinyağı ve Sofralık Zeytin Sempozyumu (2-3 Ekim 2003), Çiğli-İzmir, 115-122.

- DURHAM R.E., G.A. MOORE, D. HASKELL, C.L. GUY. 1991. Cold-Acclimation Induced Changes In Freezing Tolerance and Transatable RNA Content in *Citrus grandis* and *Poncirus trifoliata*. *Physiol. Plant*, 82:519-522.
- EAGLES, CF., J. WILLIAMS, DV. LOUIS. 1993. Recovery After Freezing In *Avena sativa* L. *Lolium perenne* L. and *L. multiflorum* Lam., *New Phytologist* 123: 477-483.
- ERİŞ, A. 2003. Bahçe Bitkilerinin Fizyolojisi. Uludağ Üniv. Ziraat Fak. Ders Notları 11, 152 s.
- ERİŞ, A. and E. BARUT. 1991. Plant Growth Regulators Used for Decreasing the Severity of Alternate Bearing in Olive. "Eighth Consultation of the FAO-European Cooperative Research Network on Olives", (Sept.10-13,1991) Int. Olive Res. Inst., İzmir-Turkey.
- ERİŞ, A. ve E. BARUT. 1992. Gemlik Zeytin Çeşidinde Bilezik Alma, Seyreltme ve Büyüme Düzenleyici Kimyasal Maddelerin Verim, Kalite ve Periyodisiteye Etkileri Üzerine Bir Araştırma. TÜBİTAK-TOAG-715, 70 s.
- ERİŞ, A. ve E. BARUT. 2000. Ilıman İklim Meyveleri- I. Uludağ Üniv. Ziraat Fak. Ders Kitabı, No:6, 226s.
- ERİŞ, A., H. GULEN, E. BARUT and A. CANSEV. 2007. Annual patterns of total soluble sugars and proteins related to cold hardiness in olive (*Olea europaea* L. cv. Gemlik). *Journal Of Horticultural Science & Biotechnology* 82(4): 597-604.
- EUGENIA M., S. NUNES, G. RAY SMITH. 2003. Electrolyte Leakage Assay Capable of Quantifying Freezing Resistance in Rose Clover. *Crop Sci.*, 43:1349–1357.
- EVERT, D.R. and C.R. WEISER. 1971. Relationship Of Electrical Conductance Two Frequencies to Cold Injury and Acclimation in *Cornus stolonifera*. *Plant Physiol.*, 47:204-208.
- FADZILLAH, N.M., V. GILL, R.P. PNICH, R.H. BURDON. 1996. Chilling, Oxidative Stress And Antioxidant Responses In Shoot Cultures of Rice. *Planta*, 199: 552-556.
- FARRANT J.M., N.W. PAMMENTER, P. BERJAK. 1993. Seed Development In Relation To Desiccation Tolerance: A Comparison Between Desiccation-Sensitive (Recalcitrant) Seeds of *Avena Marina* And Desiccation-Tolerant Types, *Seed Sci. Res.*, 3: 1-13.
- FAW, W. F. and A.G. JUNG. 1972. Electrophoretic Protein Patterns In Relation To Low Temperature Tolerance and Growth Regulation of Alfalfa. *Cryobiology*, 9:548 55.

- FAW, W. F., S.C. SHIH, G.A. JUNG. 1976. Extractant Influence On The Relationship Between Extractable Proteins and Cold Tolerance of Alfalfa. *Plant Physiol.*, 57:720-23.
- FISCHER, C. and W. HÖLL. 1991. Food reserves of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.): I. Seasonal changes in the carbohydrate and fat reserves of pine needles. *Trees* 5: 187–195.
- FLINN, C and L. ASHWORTH. 1995. The Relationship Carbohydrates and Flower Bud Hardiness Among Three *Forsythia* Taxa. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 607-613.
- FONTANAZZA, G., 1986. Rinnovamento dell'olivicoltura Colpita da Freddo: Orientamenti Tecnici.-In L'olivo Dopo la Gelata. ISEA.
- FONTANAZZA, G. and P. PREZIOSI. 1969. L'Olivo E Le Basse Temperature. Osservazioni Su 37 Cultivar Da Olio E 20 Cultivar Da Mensa. *L'Italia Agricola* 78: 737–745.
- FOYER, C.H. and G. NOCTOR. 2005. Oxidant and Antioxidant Signalling In Plants: A Re-Evaluation of The Concept of Oxidative Stress In A Physiological Context. *Plant Cell Environ.*, 28:1056–1071.
- FRANKOW-LINDBERG, B.E. 2001. Adaptation to Winter Stress in Nine White Clover Populations: Changes in Non-structural Carbohydrates During Exposure to Simulated Winter Conditions and 'Spring' Regrowth Potential. *Ann. Bot.*, 88:745–751.
- GECHEV, T., H. WILLEKENS, M.V. MONTAGU, D. INZE, W. VAN CAMP, V. TONEVA, I. MINKOW. 2003. Different Responses of Tobacco Antioxidant Enzymes To Light And Chilling Stress. *J. Plant Physiol.*, 160: 509-515.
- GIORNI, E., C. CROSATTI, P. BALDI M. GROSSI, C. MARE, A. MICHELE, S. CATTIVELLI, L. CATTIVELLI. 1999. Cold- Regulated Gene Expression During Winter in Frost Tolerant and Frost Susceptible Barley Cultivars Grown Under Field Conditions. *Euphytica*, 106: 149-157.
- GRAHAM, D. and B.D. PATTERSON. 1982. Responses of Plants to Low, Nonfreezing Temperatures: Proteins, Metabolism, and Acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, 33: 347-372.
- GRIFFITH M, M. ANTIKAINEN, W. HON, K. PIHAKASKIMAUNSBACH, X. YU, J. CHUN. 1997. Antifreeze Proteins in Winter Rye. *Physiol Plant.*, 100: 327-332.
- GUO F-X., M.X. ZHANG, Y. CHEN, W-H. ZHANG, S-J. XU, J.H. WANG, L.Z. AN 2006. Relation of Several Antioxidant Enzymes To Rapid Freezing Resistance In Suspension Cultures Cells From Alpine *Chorispora bungeana*. *Cryobiology*, 52: 241-250.

- GUSTA, L.V., M. WISNIEWSKI, N.T. NESBITT and K.T. TANINO. 2003. Factors to Consider in Artificial Freeze Tests. *Acta Hort.*, 618: 493-507.
- GUY, CL. 1990. Cold Acclimation and Freezing Stress Tolerance: Role of Protein Metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41: 187-223.
- GUY, CL. and D HASKELL. 1987. Induction of Freezing Tolerance In Spinach Is Associated With The Synthesis of Cold Acclimation Induced Proteins. *Plant Physiol.*, 84:872-78.
- GUY, C. L. and D. HASKELL 1989. Preliminary Characterization of High Molecular Mass Proteins Associated With Cold Acclimation In Spinach. *Plant Physiol.Biochem.*, 27: 125-135.
- GUY, C.L., D. HASKELL, G. YELENOSKY. 1988. Changes In Freezing Tolerance and Polypeptide Content of Spinach and Citrus at 5°C. *Cryobiology*, 25: 264-271.
- GUY, C.L., J.L HUBER, S.C. HUBER 1992. Sucrose Phosphate Synthase and Sucrose Acclimation at Low Temperature. *Plant Physiol.*, 100:502-508.
- GUY, C.L., D. HASKELL, O.B. LI. 1998. Association of Proteins with The Stress 70 Molecular Chaperones at Low Temperature Evidence For The Existence of Cold Labile Proteins In Spinach. *Cryobiology*, 36: 301-314.
- GÜLEN, H. 2000. Ayva ve Armutlarda Anaç/kalem İlişkilerinin İzoenzim Analizleriyle Araştırılması. Çukurova Üniv. Fen Bil.Ens.Doktora Tezi. 136 s.
- GÜLEN, H. and A. ERİŞ. 2003. Some Physiological Changes İn Strawberry (*Fragaria X ananassa* ‘Camarosa’) plants under heat stress. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 78(6): 894-898.
- GÜLEN, H. and A. ERİŞ. 2004. Effect of Heat Stress On Peroxidase Activity And Total Protein Content In Strawberry. *Plants. Plant Science*, 166: 739-744.
- GÜLEN, H., A. CANSEV, E. BARUT, A. ERİŞ. 2007. Gemlik Zeytin Çeşidinde Toplam Proteinlerin Mevsimlik Değişimi. V. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 04-07 Eylül 2007, Atatürk Üniversitesi, Erzurum. (Baskıda)
- GÜNVER G., S.SEFEROĞLU, G. SEFEROĞLU. 2000. Gemlik ve Domat Zeytin Çeşitlerinde Çelik Köklendirilmesi İle Bazı Biyokimyasal Özellikler Arasındaki İlişkiler. 1. Zeytincilik Sempozyumu, 6-9 Haziran 2000, Bursa. 133-139.
- HADLEY J.L. and R.G. AMUNDSON. 1992. Effects of Radiatinal Heating at Low Air Temperature on Water Balance, Cold Balance, And Visible Injury of Red Spruce Foliage. *Tree Physiol.*, 11:1-17.

- HAMMAN, R.A., I.E. DAMI, T.M. WLSH, STUSHNOFF. 1996. Seasonal Carbohydrate Changes and Cold Hardiness of Chardonnay and Riesling grapevines. *Amer. J.Enol. Viticult.* 47: 31-36.
- HANSEN, J. and E. BECK. 1994. Seasonal Changes In The Utilization and Turnover of Assimilation Products In A 8-Year-Old Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) Trees. *Trees*, 8: 172–182.
- HARA, M., S. TERASHIMA, T. KUBOI. 2001. Characterization And Cryoprotective Activity Of Cold-Responsive Dehydrin From *Citrus unshiu*. *J. Plant Physiol.*, 158: 1333-1339.
- HINCHA, D.K., U. SONNEWALD, L. WILLMITZER, J.M. SCHMITT. 1996. The Role of Sugar Accumulation In Leaf Frost Hardiness: Investigations with Transgenic Tobacco Expressing A Bacterial Pyrophosphatase Or A Yeast Invertase Gene. *Journal of Plant Physiology*, 147: 604-610.
- HINCHA, DK. and M. HAGEMANN. 2004. Stabilization of Model Membranes During Drying By Compatible Solutes Involved In The Stress Tolerance of Plants and Microorganisms. *Biochem. J.*, 383: 277-283.
- HINESLEY, L.E., D.M. PHARR, L.K. SNELLING, S.R. FUNDERBURK. 1992. Foliar Raffinose and Sucrose In Four Conifer Species: Relationship To Seasonal Temperature. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 117(5): 852–855.
- HURRY, V.M., A. STRAND, M. TOBIAESON, P. GARDESTRÖM, G. ÖQUIST. 1995. Cold Hardening Of Spring and Winter Wheat and Rape Results In Differential Effects on Growth, Carbon Metabolism and Carbohydrate Content. *Plant Physiol.*, 109:697-706.
- IMANISHI, H.T., T. SUZIKI, K. MASUDA, T. HARADA. 1998. Accumulation of Raffinose and Stachyose In Shoot Apices of *Lonicera caerulea* L. During Cold Acclimation. *Scientia Horticulturae*, 72: 255-263.
- JACOBSEN, SE., C. MONTEROS, JL. CHRISTIANSEN, LA. BRAVO, LJ. CORCUERA, A. MUJICA. 2005. Plant Responses of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to Frost at Various Phenological Stages. *Europ. J. Agronomy*, 22: 131-139.
- JAGLO-OTTOSEN, K.R., S.J. GLIMOUR, D.G. ZARKA, O. SCHABENBERGER M.F. THOMASHOW. 1998. *Arabidopsis* CBF1 Overexpression Induces COR Genes And Enhances Freezing Tolerance. *Science*, 280:104–106.
- JANDA, T., G. SZALAI, K. RIOS-GONZALEZ, O. VEISZ, E. PÁLDI. 2003. Comparative Study Of Frost Tolerance And Antioxidant Activity In Cereals. *Plant Science*, 164: 301-306.

- JOHNSTON, J.W., K. HARDING, E.E. BENSON. 2007. Antioxidant Status And Genotypic Tolerance of *Ribes in vitro cultures* to Cryopreservation PlantScience, 172(3):524-534.
- JENNING, D.L. and E. CARMICHAEL. 1975. Some Physiological Changes Occurring In Overwintering Raspberry Plants in Scrolant. Hort. Res., 14: 103-108.
- KACPERSKA, A. 1993. Water Potential Alterations a Prerequisite or a Triggering Stimulus For The Development of Freezing Tolerance In Overwintering Herbaceous Plants? In: Li PH, Christersson L (eds) Advances in plant cold hardiness. CRC Press Inc, London, pp. 73-91.
- KAÇAR, B., V. KATKAT, Ş. ÖZTÜRK. 2002. Bitki Fizyolojisi. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayın No: 198. 563 s.
- KANDLER, O. and H. HOPF. 1982. Oligosaccharides Based on Sucrose (sucrosyl oligosaccharides). In: Person, A., Zimmerman, M.M. (Eds.), Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 13A. Springer-Verlag, New York, pp. 348–383.
- KAURIN Å., O. JUNTILLA, J. HANSEN. 1981. Seasonal Changes In Frost Hardiness In Cloudberry (*Rubus chamaemorus*) in Relation To Carbohydrate Content With Special Reference To Sucrose. Physiol. Plant., 52: 310-314.
- KENEDALL, E. and B.D. MCKERSIE. 1989. Free Radical and Freezing Injury to Cell Membranes of Winter Wheat. Physiol. Plant, 76: 86-94.
- KONTUNEN-SOPPELA, S. and K. LAINE. 2001. Seasonal Fluctuation of Dehydrins is Related to Osmatic Status in Scots Pine Needles. Trees, 15: 425-430.
- KOSTER K.L. and D.V. LYCH. 1992. Solute Accumulation and Compartmentalization During Cold Acclimation of Puma Rye. Plant Physiol., 98:108-113.
- KUK Y.I., H.Y. KIM, S.J. CHUNG, G.C. CHUNG, J.O. GUH, H.J. LEE, N.R. BURGOS. 2003. Relationships of Cold Acclimation And Antioxidative Enzymes With Chilling Tolerance In Cucumber (*Cucumis sativus* L.). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128 (5): 661-666.
- KURODA H. and S. SAGISAKA. 1993. Ultrastructural Changes In Cortical Cells of Apple (*Malus pumila* Mill.) Associated with Cold Hardiness. Plant Cell Physiol., 34: 357-365.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. Nature, 227: 658–685.
- LANHAM, P.G., R.J. KEMP, H. JONES, R.M. BRENNAN. 2001. Expresssion of Dehydrin-like Genes in Response to Chilling in Leaves of Blackcurrant, *Ribes nigrum* L. J. Hort. Sci. and Biotech., 76(2):201-207.



- LA PORTA, N., M. ZACCHINI, S. BARTOLINI, R. VITI, G. ROSELLI. 1994. The Frost Hardiness of Some Clones of Olive cv. Leccino. *J. Hortic. Sci.*, 69: 433-435.
- LASHEEN, A.M. and C.E. CHAPLIN. 1971. Biochemical Comparison of Seasonal Variations In Three Peach Cultivars Differing In Cold Hardiness. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 96: 154-159.
- LAVEE, S. 1989. Involvement of Plant Growth Regulators and Endogenous Growth Substances In The Control of Alternate Bearing. *Acta Hort* 239: 311-322.
- LAVEE, S. 1996. Biology and Physiology of The Olive. In: *Int. Olive Oil Council (ed) World Olive Encyclopedia*. Int. Olive Oil Council Press, pp 59-106.
- LAVEE, S. and N. AVIDON. 1994. Protein Content and Composition of Leaves and Shoot Bark In Relation To Alternate Bearing of Olive Trees (*Olea europaea* L.). *Acta Hort.*, 356: 143-147.
- LEE, D.H. and C.B. LEE 2000. Chilling Stress-Induced Changes of Antioxidant Enzymes In The Leaves of Cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Science*, 159: 75-85.
- LEIPER, J., Y. FRACHEBOUD, P. STAMP. 1999. Effect Of Growing Season On Photosynthetic Apparatus And Leaf Antioxidative Defenses In Two Maize Genotypes Of Different Chilling Tolerance, *Environ. Exp. Bot.*, 42: 129-139.
- LEPRINCE, O., G.A.F. HENDRY, B.M. MCKERSIE. 1993. The Mechanisms Of Desiccation Tolerance In Developing Seeds. *Seed Sci. Res.*, 3: 231-246.
- LEVI, A, GR. PANTA, CM. PARMENTIER, MM. MUTHALIF, R. ARORA, S. SHANKER, LJ. ROWLAND. 1999. Complementary DNA Cloning, Sequencing and Expression of An Unusual Dehydrin From Blueberry Floral Buds. *Physiol. Plant.*, 107:98-109.
- LEVITT J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses. Vol. 1. Chilling, Freezing and High Temperature Stresses. Academic Press, New York. 497 p.
- LI, P.H. 1984. Subzero Temperature Stress Physiology of Herbaceous Plants. *Hort. Rev.* 6:373-416.
- LIM, C.C., S.L. KREBS, R. ARORA. 1999. A 25-kDa dehydrin associated with genotype- and age-dependent leaf freezing-tolerance in *Rhododendron*: a genetic marker for cold hardiness?, *Theor. Appl. Genet.*, 99:912-920.
- LINDEN, L. 2002. Measuring Cold Hardening in Woody Plants. University Of Helsinki, Department Of Applied Biology, Publication no. 10., p.57.

- LINEBERGER, R.D., and P.L. STEPONKUS. 1980. Cryoprotection By Glucose, Sucrose And Raffinose To Chloroplast Thylakoids (Spinach leaves). *Plant Physiology*, 65: 298-304.
- LIU J-J.J., D.C. KRENZ, A.F. GALVEZ, B.O. DE LUMEN. 1998. Galactinol Synthase (GS): Increased Enzyme Activity and Levels of mRNA Due To Cold and Desiccation. *Plant Sci.*, 134:11–20.
- LIVINGSTON, DP., R. PREMAKUMAR, SP. TALLURY. 2006. Carbohydrate Partitioning Between Upper And Lower Regions of The Crown In Oat And Rye During Cold Acclimation and Freezing. *Cryobiology*, 52: 200-208.
- LUKATKIN, A.S. 2002. Contribution of Oxidative Stress to the Development of Cold-Induced Damage to Leaves of Chilling-Sensitive Plants: 1. Reactive Oxygen Species Formation during Plant Chilling. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49(5):622-627.
- MAGHULY, F., M.A. KHAN, E.B. FERNANDEZ, P.DRUART, B. WATILLON, M. LAÏMER. 2008. Stress Regulated Expression of The GUS-Marker Gene (*Uida*) Under The Control of Plant Calmodulin And Viral 35S Promoters In A Model Fruit Tree Rootstock: *Prunus incisa* × *serrula*. *Journal of Biotechnology*, 135(1): 105-116.
- MAHAJAN, S. and N. TUTEJA. 2005. Cold, salinity and drought stresses. An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158.
- MANCUSSO, S. 2000. Electrical Resistance Changes During Exposure to Low Temperature Measure Chilling and Freezing Tolerance in Olive Tree (*Olea europaea* L.) Plants. *Plant Cell Environ.*, 23: 291-299.
- MARIAN, C.O., S.L. KREBS, R. ARORA. 2003. Dehydrin Variability Among *Rhododendron* Species: A 25-Kda Dehydrin Is Conserved And Associated With Cold Acclimation Across Diverse Species. *New Phytologist*, 161: 773-780.
- MARIAN, C.O., A. ERIŞ, S.L. KREBS, R. ARORA. 2004. Environmental Regulation of A 25 Kda Dehydrin In Relation to *Rhododendron* Cold Acclimation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 129 (3):354-359.
- MARQUAT, C., M. VANDAMME, M. GENDRAUD, G. PÉTEL 1999. Dormancy In Vegetative Buds of Peach: Relation Between Carbohydrate Absorption Potentials and Carbohydrate Concentration In The Bud During Dormancy and Its Release. *Scientia Horticulturae*, 79: 151-162.
- MARTIN, GC., JO. DENNEY, DO. KETCHIE, JW. OSGOOD, JH. CONNEL, GS. SIBBETT, R. KAMMERECK, WH. KRUEGER, GA. NOUR. 1993. Freeze Damage and Cold Hardiness In Olive: Findings From The 1990 Freeze. *California Agriculture* 47: 1-12.

- MCKERSIE, B.D., Y. CHEN, M. BUES, S.R. BOWLEY, C. BOWLER, D. INZE, K. D'HALLUIN, J. BOTTERMAN. 1993. Superoxide Dismutase Enhances Tolerance of Freezing Stress In Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.*, 103: 1155-1163.
- MCKNOWN, R., G. KUROKI, G. WARREN. 1996. Cold Responses of *Arabidopsis* Mutants Impaired In Freezing Tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 47 (12): 1919-1925.
- MILLER, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent For Determination of Reducing Sugars. *Analytical Chemistry*, 3:426-428.
- MINAMI, A., M. NAGAO, K. IKEGAMI, T. KOSHIBA, K. ARAKAWA, S. FUJIKAWA, D. TAKEZAWA. 2005. Cold Acclimation In Bryophytes: Low-Temperature- Induced Freezing Tolerance in *Physcomitrella patens* is Associated With Increases In Expression Levels Of Stress-Related Genes But Not With Increase In Level Of Endogenous Abscisic Acid. *Planta*, 220: 414-423.
- MORAN, J.F., M. BECANA, I. ITTRBE-ORMAETXE, S. FRECHILLA, R.V. KLUCAS, P. APARICIO-TEJO. 1994. Drought Induces Oxidative Stress In Pea Plants. *Planta* 194, 346-352.
- MOLTAY, İ., A.R. SÜTÇÜ, M. YÜREKTÜRK. 1982. Zeytin Yetiştiriciliği. Tarımsal Araştırmaları Yayınları, No 15. 59s.
- MUTHALIF, M.M. and L.J. ROWLAND. 1994. Identification of Dehydrin-Like Proteins Responsive To Chilling In Floral Buds of Blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*). *Plant Physiol.*, 104(4):1439-47.
- NAKANO, Y. and K. ASADA. 1980. Spinach Chloroplasts Scavenge Hydrogen Peroxide On Illumination. *Plant and Cell Physiology* 21(8), 1295-1307.
- O'NEILL, SD. 1983. Osmotic Adjustment and The Development of Freezing Resistance In *Fragaria virginiana*. *Plant Physiology*, 72: 938-944.
- ÖQUIST, G., V.M. HURRY, N.P.A. HUNER. 1993. Low Temperature Effects On Photosynthesis and Correlation With Freezing Tolerance In Spring and Winter Cultivars of Wheat and Rye. *Plant Physiol.*, 101: 245-250.
- ÖZEN, Y. 2002. Domat Zeytin Çeşidinin Kontrollü Şartlar Altında Köklü Ve Köksüz Klon Anaçlar Üzerine Aşıl原因arak Çoğaltılması. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir s. 95.
- ÖZGEN, S.S. 2000. İki Farklı Zeytin Çeşidinde *in vitro*'da Kallus Oluşumuna Etki Eden Faktörler Üzerinde Araştırmalar. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir s. 91.

- PALLIOTTI, A. and G. BONGI. 1996. Freezing Injury In The Olive Leaf And Effects of Mefluidide Treatment. *Jour. of Horticultural Sci.*, 71: 57-63.
- PALONEN, P. 1999. Relationship of Seasonal Changes In Carbohydrates And Cold Hardiness In Canes And Buds of Three Red Raspberry Cultivars. *J.Amer. Soc. Hort. Sci.*, 124 (5): 507-513.
- PALONEN, P., D. BUSZARD, D. DONELLY. 2000. Changes In Carbohydrates and Freezing Tolerance During Cold Acclimation of Red Raspberry Cultivars Grown *in vitro* and *in vivo*. *Physiolgia Plantarum*, 110: 393-401.
- PALTA, J.P., J. LEVITT, E.J. STADELMANN. 1977. Freezing Injury In Onion Bulb Cells. I. Evaluation Of Conductivity Methods And Analysis Of Ion And Sugar Efflux From Injured Cells. *Plant Physiology*, 60: 393-397.
- PALTA, J.P., K.G. JENSEN, P.H. LI. 1982. Cell membrane alterations following a slow freeze thaw cycle: ion leakage, injury and recovery. In: "Plant Cold Hardiness and Freezing Stress, Volume 2. (P.H. Li and A. Sakai eds.), Acad. Press, N.Y. pp. 221-242.
- PAN, G. and C.F. LOU. 2007. Isolation Of An 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase Gene From Mulberry (*Morus alba L.*) and Analysis of The Function of This Gene In Plant Development and Stresses Response. *Journal of Plant Physiology*, In Press.
- PANTA, GR., MW. RIEGER, LJ. ROWLAND. 2001. Effect of Cold And Drought Stress On Blueberry Dehydrin Accumulation. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 76:549-556.
- PARKER, J. 1959. Seasonal Variations In Sugars Of Conifers With Some Observations On Cold Resistance. *Forest Sci.*, 5: 56-63.
- PARVANOVA, D., S. IVANOV, T. KONSTANTINOVA, E. KARANOV, A. ATANASSOV, T. TSVETKOV, V. ALEXIIEVA, D. DJILANOV. 2004. Transgenic Tobacco Plants Accumulating Osmolytes Show Reduced Oxidative Damage Under Freezing Stress. *Plant Physiol. and Biochem.*, 42:57-63.
- PASTORI, G. C.H. FOYER, P. MULLINEAUX. 2000. Low Temperature- Induced Changes In The Distrubition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Antioxidants Between The Bundle Sheet And Mesophyll Cells of Maize Leaves, *J. Exp. Bot.*, 51: 107-113.
- PEARCE, R.S. 1999. Molecular Analysis of Acclimation to Cold. *Plant Growth Regul.*, 29:47-76.
- PEARCE, R.S. 2001. Plant Freezing and Damage. *Annals of Botany*, 87: 417-424.
- PEARCE, R.S., M.A. DUNN, J. RIXON, P. HARRISON, M.A. HUGHES. 1996. Expression of Cold-Inducible Genes and Frost Hardiness in the Crown Meristem

of Young Barley (*Hordeum vulgare* L.cv. Igri) Plants Grown Under Different Environments. *Plant Cell Environ.*, 19: 275-290.

- PELAH D., O. SHOSEYOU, A. ATLAMN, D. BARTEL. 1997. Water-Stress Response In Aspen (*Populus Tremula*): Differential Accumulation of Dehydrin, Sucrose Synthase, GAPDH Homologues and Soluble Sugars. *J. Plant Physiol.* 151: 96–100.
- PENNYCOOKE, J.C., S. COX, C. STUSHNOFF. 2005. Relationship of Cold Acclimation, Total Phenolic Content And Antioxidant Capacity With Chilling Tolerance In Petunia (*Petunia x hybrida*). *Environmental and Experimental Botany*, 53: 225-232.
- PERRAS, M., F. SARHAB. 1984. Energy State of Spring And Winter Wheat During Cold Hardening. Soluble Sugars and Adenine Nucleotides. *Physiologia Plantarum*, 60: 129-132.
- PLAZEK, A. and I. ZUR. 2003. Cold- Induced Plant Resistance To Necrotrophic Pathogens And Antioxidant Enzyme Activities And Cell Membrane Permeability. *Plant Science*, 164: 1019-1028.
- POMEROY, M.K., D. SIMINOVITCH, F. WRIGHTMAN. 1970. Seasonal Biochemical Changes In The Living Bark And Needles of Red Pine (*Pinus resinosa*) in Relation To Adaptation To Freezing. *Can. J.Bot.*, 48:953-67.
- PRASAD, TK. 1996. Mechanisms of Chilling-Induced Oxidative Stress Injury and Tolerance: Changes In Antioxidant System, Oxidation of Proteins and Lipids and Protease Activities. *Plant J.*, 10: 1017-1026.
- PRASAD, T.K. 1997. Role of Catalase Activity In Inducing Chilling Tolerance In Pre-Emergent Maize Seedlings. *Plant Physiol.*, 114:1369-1376.
- PRASAD, T.K., M.D. ANDERSON, B.A. MARTIN, C.R. STEWART. 1994. Evidence For Chilling-Induced Oxidative Stress In Maize Seedlings And A Regulatory Role For Hydrogen Peroxide, *Plant Cell*, 6:65-74.
- PROIETTI, P. and F. FAMIANI. 2002. Diurnal And Seasonal Changes In Photosynthetic Characteristics In Different Olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Photosynthetica*, 40: 171-176.
- PUHAKAINEN, T., M.W. HESS, P. MÄKELÄ, J. SVENSSON, P. HEINO, E.T. PALVA. 2004. Overexpression Of Multiple Dehydrin Genes Enhances Tolerance To Freezing Stress in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, 54:743–753.
- RAESE, J.T., M.W. WILLAMS, H.D. BILLINGSLEY. 1977. Sorbitol and Other Carbohydrates In Dormant Apple Shoots As Influenced By Controlled Temperatures. *Cryobiology*, 14: 373-378.

- RAESE, J.T., M.W. WILLAMS, H.D. BILLINGSLEY. 1978. Cold Hardiness Sorbitol and Sugar Levels of Apple Shoots As Influenced By Controlled Temperature and Season. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 103: 769-801.
- REPO, T. 1992. Seasonal Changes Of Frost Hardiness in *Picea abies* and *Pinus sylvestris* in Finland. *Can. J. For. Res.*, 22:1949–1957.
- REPO, T., H. HANNINEN, S. KELLOMAKI. 1996. The Effects of Long-Term Elevation of Air Temperature and CO<sub>2</sub> on The Frost Hardiness of Scot Pine. *Plant Cell Environ.*, 19: 209-216.
- REJŠKOVÁ, A., L. PATKOVÁ, E. STODÚLKOVÁ, H. LIPAJSKÁ. 2007. The Effect of Abiotic Stresses On Carbohydrate Status of Olive Shoots (*Olea europaea* L.) Under *in vitro* Conditions. *Journal of Plant Physiology*, 164(2):174-184.
- RICHARD, S., M.J. MORENCY, C. DREVET, L. JOUANIN, A. SÉGUIN. 2000. Isolation and Characterization of A Dehydrin Gene From White Spruce Induced Upon Wounding, Drought and Cold Stresses. *Plant Molecular Biology*, 45:1–10.
- RINNE, P.L.H., H. TOMINEN, O. JUNTILLA. 1994. Seasonal Changes In Bud Dormancy In Relation To Bud Morphology, Water, Strach Content, and Abscisic Acid Concentration In Adult Trees of *Betula pubescens*. *Tree Physiol.*, 14: 549-561.
- RINNE, P.L.H., P.L.M. KAİKURANTA, L.H.W. VAN DER PLAS, C. VAN DER SCHOOT. 1999. Dehydrins In Cold Acclimated Apices of Birch (*Betula pubescens* Ehrh.): Production, Localization And Potential Role In Rescuing Enzyme Function During Dehydration. *Planta*, 209: 377–388.
- RIVERO, R.M., J.M. RUIZ, P.C. GARCIA, L.R. L-L., E. SÁNCHEZ, L., ROMERO. 2002. Response of Oxidative Metabolism In Watermelon Plants Subjected To Cold Stress. *Functional Plant Biology*, 29(5) 643–648.
- RORAT, T., B.M. SZABALA, J. GRYGOROWICZ, B. WOJTOWICZ, Z. YIN, P. REY. 2006. Expression of SK<sub>3</sub>-type Dehydrin In Transporting Organs Is Associated With Cold Acclimation in *Solanum* species. *Planta*, 24:205-221.
- ROSAS, A., M. ALBERDI, M. DELSENY, L. MEZA-BASSO. 1986. A Cryoprotective Polypeptide Isolated From *Nothofagus dombeyi* Seedlings. *Phytochemistry*, 25:2497-2500
- ROSELLI, G. and G. VENORA. 1990. Relationship Between Stomatal Size and Winter Hardiness In The Olive. *Acta Hort.*, 286: 89-92.
- ROSELLI, G. BENELLI, D. MORELLI. 1989. Relationship Between Stomatal Density And Winter Hardiness in Olive (*Olea europaea* L.). *J. Hortic. Sci.*, 64(2): 199-203.

- ROSELLI, G., N. LA PORTA, D. MORELLI, 1992. Valutazioni Del Germoplasma Di Olivo Per La Tolleranza a Stress Da Freddo. *Anti Convegno Germoplasma Frutticolo* 9: 107-112.
- ROWLAND, L.J. and R. ARORA. 1997. Proteins Related To Endodormancy (Rest) In Woody Perennials. *Plant Science*, 126: 119-144.
- SAKAI, A. and S. YOSHIDA. 1968. The Role Of Sugar And Related Compounds In Variations Of Freezing Resistance. *Cryobiology*, 5:160-74.
- SAKAI, A. and W.L. LARCHER. 1987. Frost Survival of Plants. Responses and Adaptation to Freezing Stress. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-137.
- SAKAI, A., K. OTSUKA and S. YOSHIDA. 1968. Mechanisms of Survival Of Plant Cells At Super-Low Temperatures By Rapid Cooling and Re-Warming. *Cryobiology*, 4:165-173.
- SALZMAN, R.A., R.A. BRESSAN, P.M. HASEGAWA, E.N. ASHWORTH, B.P. BORDELON. 1996. Programmed Accumulation of LEA-Like Proteins During Desiccation And Cold Acclimation of Overwintering Grape Buds. *Plant Cell Environ.*, 19: 713-720
- SANTARIUS, KA. 1973. The Protective Effect of Sugars on Chloroplast Membranes During Temperature And Water Stress And Its Relationship To Frost, Desiccation And Heat Resistance. *Planta*, 113: 105-114.
- SARHAN, F., F. OUELLE, A. VASQUEZ-TELLO. 1997. The Wheat *Wcs120* Family: A Useful Model to Understand the Molecular Genetics of Freezing Tolerance in Cereals. *Physiol. Plant.*, 101:439-445.
- SARUYAMA, H. and M. TANIDA. 1995. Effect of Chilling On Activated Oxygen Scavenging Enzymes In Low Temperature-Sensitive And Tolerant Cultivars of Rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Sci.*, 109:105-113.
- SASAKI, H., K. ICHIMURA, M. ODA. 1996. Changes in sugar content during cold acclimation and deacclimation of cabbage seedlings. *Annals of Botany*, 78: 365-369.
- SAUTER, J.J., M. WISNIEWSKI., W. WITT. 1996. Interrelationships Between Ultrastructure, Sugar Levels, and Frost Hardiness of Ray Parenchyma Cells During Frost Acclimation and Deacclimation In Poplar (*Populus x canadensis* Moench). *J.Plant Physiol.*, 149: 451-461.
- SAUTER, J.J., S. WESTPHAL, M. Wisniewski. 1999. Immunological Identification Of Dehydrin-Related Proteins In The Wood of Five Species of *Populus* and in *Salix caprea* L. *J. Plant Physiol.*, 154: 781-788.

- SCEBBA, F., L. SEBESTIANI, C. VITAGLIANO. 1998. Change In Activity Of Antioxidative Enzymes In Wheat (*Triticum aestivum*) Seedlings Under Cold Acclimation, *Physiol. Plant.*, 104: 747-757.
- SEPPANEN, M.M., K. FAGERSTEDT. 2000. The Role of Superoxide Dismutase Activity In Response To Cold Acclimation In Potato, *Physiol. Plant*, 108: 279-285.
- SIEG, F., W. SCHRÖDER, J. M. SCHMITT, D. K. HINCHA. 1996. Purification and characterization of a cryoprotective protein (cryoprotectin) from the leaves of cold-acclimated cabbage. *Plant Physiology*, 111(1):215-222.
- SILIM, S.N. and D.P. LAVENDER 1994. Seasonal Patterns and Environmental Regulation of Frost Hardiness in Shoots of Seedlings of *Thuja plicata*, *Chamaecyparis nootkatensis*, and *Picea glauca*. *Can. J. Bot.* 72:309–316.
- SIMINOVITCH, D. and D.R. BRIGGS. 1949. The Chemistry of The Living Bark Of The Black Locust Tree In Relation To Frost Hardiness. I. Seasonal Variations In Protein Content. *Arch. Biochem.*, 23:8-17
- SIMINOVITCH, D. and D.R. BRIGGS. 1953. Studies On The Chemistry of The Living Bark of The Black Locust Tree In Relation To Frost Hardiness. IV. Effects of Ringing On Translocation, Protein Synthesis, and The Development of Hardiness. *Plant Physiol.*, 28:177-200
- SIMINOVITCH, D., B. RHEAUME, K. POMEROY, M. LEPAGE. 1968. Phospholipid, Protein, And Nucleic Acid Increases In Protoplasm and Membrane Structures Associated With Development of Extreme Freezing Resistance In Black Locust Tree Cells. *Cryobiology*, 5:202-25.
- SOLEIMANI, A., A.R. TALIE, M. TABAEIAGHDAEI, H. ESMAEILZADEH, B.H. EGHRARI. 2004. The Survey of Cold Hardiness In Some Olive (*Olea Europaea* L.) Cultivars. *Horticultural Science Abstracts*, 74(10): 1410.
- STEPONKUS, PL. 1984. Role of Plasma Membrane in Freezing Injury and Cold-Acclimation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 35: 543-584.
- STREB, P., A. SHANG, J. FEIERABEND. 1999. Resistance Of Cold- Hardened Winter Leaves (*Secale cereale* L.) to Photo-Oxidative Stress. *Plant Cell and Environment*, 22:1211-1223.
- STUPNIKOVA, I.V., G.B. BOROVSKII, V.K.VOINIKOV. 2004. Seasonal Changes in the Composition and Content of Dehydrins in Winter Wheat Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 51(5): 707-713.
- STUPNIKOVA, I.V, GB. BOROVSKII, NV. DOROFEEV, AA. PESHKOVA, VK. VOINIKOV. 2002. Accumulation and Disappearance of Dehydrins and Sugars



- Depending On Freezing Tolerance of Winter Wheat Plants At Different Developmental Phases. *J. Thermal. Biol.*, 27: 55-60.
- SUDHAKAR, C., A. LAKSHMI, S. GIRIDARAKUMAR. 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.
- SUOJALA, T. and L. LINDEN. 1997. Frost Hardiness of *Philadelphus* and *Hydrangea* Clones During Ecodormancy. *Soil and Plant Sci.*, 47:58-63.
- SUZUKI N. and R. MITTLER. 2006. Reactive Oxygen Species And Temperature Stresses: A Delicate Balance Between Signaling And Destruction, *Physiol. Plant.* 126: 45–51.
- SVENSSON, J., A.M. ISMAİL, E.T. PALVA, T.J. CLOSE. 2002. Dehydrins. In: K. B. Storey and J. M. Storey (Eds.), *Sensing, Signaling and Cell Adaptation*, Elsevier Science B.V., pp. 155-171.
- SYROS, T., T. YUPSANIS, D. PETKOU and A.S. ECONOMOU. 2005. Protein, Leucine Aminopeptidase, Esterase, Acid Phosphatase and Photosynthetic Responses of Oleander (*Nerium Oleander* L.) During Cold Acclimation and Freezing Treatments. *Journal of Plant Physiology*, 162:886-894.
- SZE, H. 1985. H<sup>+</sup> - Translocating ATPases: Advances Using Membrane Vesicles. *Annual Review of Plant Physiology*, 36: 175- 208.
- TAMASSY, I. and M. ZAYAN. 1982. Seasonal Changes In Total Sugars, Reducing Sugars And Starch Contents In Relation To Cold Hardiness of Some Apricot Varieties From Different Groups. *Acta Hort.*, 121: 125-139.
- TAIZ, L. and E. ZEIGER. 2003. *Plant Physiology*. 3rd edn. Oxford University Press, London, 690 p.
- TANRISEVER, A., E. ÖZEKER, S. ÖZGEN. 2000. Farklı Oksinlerin Gemlik Zeytin Çeşidinde Kallus Dokusunun Yapısı ve Fenolik Madde Değişimi Üzerine Etkileri. Türkiye I. Zeytincilik Sempozyumu, 6-9 Haziran 2000, Bursa, 127-132.
- TAO, D.L., G. ÖQUIST, G. WINGSLE. 1998. Active Oxygen Scavengers During Cold Acclimation Of Scots Pine Seedlings In Relation To Freezing Tolerance. *Cryobiology*, 37:38-45.
- TEKİNTAŞ, F.E., G. SEFEROĞLU, O. DOLGUN, G. GÜNVER. 2000. Aşılı Köklü Zeytin Fidanı Üretimi Üzerine Araştırmalar. 1. Zeytincilik Sempozyumu, 6-9 Haziran 2000, Bursa. 382-386.
- THOMASHOW, M.F. 1999. Plant Cold Acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 50:571–599.

- TOMAN, F.R. and H.L. MITCHELL. 1968. Soluble Proteins Of Winter Wheat Crown Tissues and Their Relationship To Cold Hardiness. *Phytochemistry*, 7: 365-373.
- TRUNOVA, TI. 1982. Light and Temperature Systems In The Hardening of Winter Wheat and The Significance of Oligosaccharides For Frost Tolerance. *Fiziol Rastenii*, 12: 70-77.
- UEMURA, M. and S. YOSHIDA. 1984. Involvement Of Plasma Membrane Alterations In Cold Acclimation Of Winter Rye Seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiol.* 75:818-26.
- UEMURA, M., Y. TAMINAGA, G. NAKAGAWARA, S. SHIGEMATSU, A. MINAMI, Y. AMURA. 2006. Responses of Plasma Membrane to Low Temperatures. *Physiologia Plantarum*, 126: 81-89.
- ULUŞKAN, A. 1978. Yapraklar Üzerine Verilen Mineral Besin Maddelerin Zeytin Çeliklerinin Köklenmesi Üzerine Etkisi. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir s.19.
- ULUSKAN, A. ve B. AYKAS. 1986. Zeytinlik Tesisinde Kullanılan Materyalin (Aşılı Fidan Ve Çelikten Üretilen Fidan) Mukayesesi. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir s.57.
- USLANMAZ, D. 1972. Verimden Düşmüş Zeytin Ağaçlarının Islahı Suretiyle Entansif Zeytinciliğe Geçiş Metodunun Araştırılması. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir, s.5.
- USLANMAZ, D. 1977. Büyümeyi Ayarlayıcı Sentetiklerden Cycocel'in Zeytin Ağaçlarında Meyve Tutumunun Düzenlenmesi İle Verim Artışı Üzerinde Araştırmalar. İzmir Araştırma Zeytinlik araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir, s. 11.
- ÜNSAL, A. 2000. Ölmez ağacın peşinde Türkiye'de zeytin ve zeytinyağı. Yapı Kredi Yayınları 1343, 243 s.
- VÁGÚFALVI, A., I. KEREPESI, G. GALIBA, T. TISCHNER, J. SUTKA. 1999. Frost Hardiness Depending On Carbohydrate Changes During Cold Acclimation In Wheat. *Plant Science*, 144: 85-92.
- VAN HANDEL, H. 1968. Direct Micro Determination of Sucrose. *Analytical Photochemistry*, 22: 280-283.
- VAROL, N. 2003. Zeytinde Verimli ve Verimsiz Yıllarda Yaprak Protein Desenlerinin Değişimi Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi (Basılmamış). Ege Üniversitesi. İZMİR. 103s.

- VAROL, N., A. TANRISEVER. 2004. Annual Variation of Leaf Proteins Of Four Recognised Olive Varieties in Turkey, 5th International Symposium on Olive Growing, 27 September. 2 October 2004, İzmir/Turkey.
- WALKER, M.A. and B.D. MCKERSIE. 1993. Role Of The Ascorbate-Glutathione Antioxidant System In Chilling Resistance of Tomato. *Plant Physiology* 141: 234-239.
- WAMPLE, R.L. and A. BARY 1992. Harvest Date As A Factor In Carbohydrate Storage And Cold Hardiness of Cabernet Sauvignon Grapevines. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117: 32-36.
- WELLING A., T. MORITZ, E. TAPIO PALVA, O. JUNTILLA. 2002. Independent Activation of Cold Acclimation By Low Temperature And Short Photoperiod In Hybrid Aspen. *Plant Physiology*, 129: 1663-1641.
- WISNIEWSKI, M., C. BASSETT, R. ARORA. 2004. Distribution and Partial Characterization Of Seasonally Expresses Proteins In Different Aged Shoots and Roots Of 'Loring' Peach (*Prunus persica*). *Tree Physiology*, 24: 339-345.
- WISNIEWSKI, M., T.J. CLOSE, T. ARTLİP, R. ARORA. 1996. Seasonal Patterns of Dehydrins And 70-Kd Heat-Shock Proteins İn Bark Tissues Of Eight Species of Woody Plants. *Physiol. Plant.*, 96: 496–505.
- WISNIEWSKI, M., R. WEBB, BALSAMO R, T.J. CLOSE, X.M. YU, M. GRIFFITH. 1999. Purification, Immunolocalization, Cryoprotective, And Antifreeze Activity of PCA60: A Dehydrin From Peach (*Prunus persica*). *Physiol. Plant.*, 105:600-608.
- XIN, Z. and J. BROWSE. 2000. Cold Comfort Farm: The Acclimation of Plants to Freezing Temperatures. *Plant Cell Environ.*, 23:893-902.
- YÜCE, B. 1979. Zeytin Tohumlarının Değişik Ortam ve Zamanlarda Çimlendirilmesinin Çimlenme Yüzdesine Etkileri. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir s.25.
- YÜCE, B. 1985. Zeytin Çekirdeklerinin Çimlenmesinde Endokarpa Tatbik Edilen Değişik Muamelelerin Etkilerinin Araştırılması. İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Araştırma Özetleri, İzmir s.45.
- ZHOU, R. and H. ZHAO. 2004. Seasonal Pattern of Antioxidant Enzyme System In The Roots of Perennial Forage Grasses Grown In Alpine Habitat, Related To Freezing Tolerance. *Physiologia Plantarum*, 121: 399-408.
- ZHOU, Z., Z. DEQIANG, L.U. MENGZHU. 2007. Cloning and Expression Analysis of *PtFATB* Gene Encoding the Acyl-acyl Carrier Protein Thioesterase in *Populus tomentosa* Carr. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(3):267-274.

**EKLER****Ek-1 “Gemlik” Zeytin Çeşidi’nde Yapraklarda Zararlanma Oranları  
(%)İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	191105.300(a)	95	2011.635	153.378	.000
Kesişme	437117.288	1	437117.288	33328.240	.000
Sıcaklık	159593.796	3	53197.932	4056.105	.000
Ay	17164.592	11	1560.417	118.975	.000
Yıl	445.925	1	445.925	34.000	.000
Sıcaklık * Ay	4344.877	33	131.663	10.039	.000
Sıcaklık * Yıl	760.793	3	253.598	19.336	.000
Ay * Yıl	600.844	11	54.622	4.165	.000
Sıcaklık *Ay* Yıl	1276.172	33	38.672	2.949	.000
Hata	2137.830	163	13.116		
Toplam	638264.666	259			
Düzeltilmiş Toplam	193243.130	258			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)

**Ek-2 “Gemlik” Zeytin Çeşidi’nde Kabuklarda Zararlanma Oranları  
(%)İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	151227.676(a)	95	1591.870	180.976	.000
Kesişme	307122.007	1	307122.007	34916.054	.000
Sıcaklık	968.360	1	968.360	110.091	.000
Ay	11177.764	11	1016.160	115.525	.000
Yıl	126206.908	3	42068.969	4782.733	.000
Sıcaklık * Ay	853.735	11	77.612	8.824	.000
Sıcaklık * Yıl	681.293	3	227.098	25.818	.000
Ay * Yıl	2932.232	33	88.856	10.102	.000
Sıcaklık *Ay* Yıl	2027.342	33	61.435	6.984	.000
Hata	1477.730	168	8.796		
Toplam	455337.607	264			
Düzeltilmiş Toplam	152705.406	263			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)

**Ek-3 “Gemlik” Zeytin Çeşidi’nde Yapraklarda Düşük Sıcaklık Toleransı (LT<sub>50</sub>) (°C) İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	651.225(a)	23	28.314	42.514	.000
Kesişme	5694.966	1	5694.966	8550.975	.000
Ay	531.761	11	48.342	72.585	.000
Yıl	53.185	1	53.185	79.857	.000
Ay * Yıl	75.418	11	6.856	10.295	.000
Hata	27.972	42	.666		
Toplam	6288.276	66			
Düzeltilmiş Toplam	679.197	65			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)

**Ek-4 “Gemlik” Zeytin Çeşidi’nde Kabuklarda Düşük Sıcaklık Toleransı (LT<sub>50</sub>) (°C) İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	835.627(a)	23	36.332	33.964	.000
Kesişme	7488.988	1	7488.988	7000.875	.000
Ay	737.347	11	67.032	62.663	.000
Yıl	11.589	1	11.589	10.834	.002
Ay * Yıl	70.619	11	6.420	6.001	.000
Hata	38.510	36	1.070		
Toplam	8360.941	60			
Düzeltilmiş Toplam	874.137	59			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)

**Ek-5 “Gemlik” Zeytin Çeşidi’nde Yapraklarda Toplam Çözünebilir Şeker İçeriği (mg/gTA) İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	13751.353(a)	119	115.558	5.514	.000
Kesişme	147951.856	1	147951.856	7059.661	.000
Sıcaklık	39.899	1	39.899	1.904	.169
Ay	8208.255	11	746.205	35.606	.000
Yıl	1236.898	4	309.225	14.755	.000
Sıcaklık * Ay	2065.245	11	187.750	8.959	.000
Sıcaklık * Yıl	65.010	4	16.253	.776	.542
Ay * Yıl	1277.052	44	29.024	1.385	.067
Sıcaklık *Ay* Yıl	904.095	44	20.548	.980	.513
Hata	4820.193	230	20.957		
Toplam	167658.205	350			
Düzeltilmiş Toplam	18571.546	349			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)

**Ek-6 “Gemlik” Zeytin Çeşidi’nde Kabuklarda Toplam Çözünebilir Şeker İçeriği (mg/gTA) İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	8269.038(a)	119	69.488	5.888	.000
Kesişme	146839.001	1	146839.001	12441.368	.000
Sıcaklık	147.089	4	36.772	3.116	.016
Ay	238.974	1	238.974	20.248	.000
Yıl	5501.656	11	500.151	42.377	.000
Sıcaklık * Ay	24.910	4	6.228	.528	.716
Sıcaklık * Yıl	1156.912	44	26.293	2.228	.000
Ay * Yıl	458.382	11	41.671	3.531	.000
Sıcaklık *Ay* Yıl	723.147	44	16.435	1.393	.063
Hata	2820.793	239	11.802		
Toplam	157981.278	359			
Düzeltilmiş Toplam	11089.831	358			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)

**Ek-7."Gemlik" Zeytin Çeşidi'nde Yapraklarda Glukoz İçeriği (mg/gTA)  
İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	6682.917(a)	119	56.159	4.744	.000
Kesişme	87743.988	1	87743.988	7411.805	.000
Sıcaklık	13.862	1	13.862	1.171	.280
Ay	4187.938	11	380.722	32.160	.000
Yıl	344.909	4	86.227	7.284	.000
Sıcaklık * Ay	398.628	11	36.239	3.061	.001
Sıcaklık * Yıl	71.210	4	17.803	1.504	.202
Ay * Yıl	851.052	44	19.342	1.634	.011
Sıcaklık *Ay* Yıl	869.665	44	19.765	1.670	.009
Hata	2817.542	238	11.838		
Toplam	96874.992	358			
Düzeltilmiş Toplam	9500.458	357			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)

**Ek-8."Gemlik" Zeytin Çeşidi'nde Kabuklarda Glukoz İçeriği (mg/gTA)  
İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	5024.475(a)	119	42.222	6.010	.000
Kesişme	65748.882	1	65748.882	9359.132	.000
Sıcaklık	131.346	1	131.346	18.697	.000
Ay	3748.481	11	340.771	48.508	.000
Yıl	12.839	4	3.210	.457	.767
Sıcaklık * Ay	130.976	11	11.907	1.695	.077
Sıcaklık * Yıl	51.669	4	12.917	1.839	.123
Ay * Yıl	499.807	44	11.359	1.617	.015
Sıcaklık *Ay* Yıl	319.646	44	7.265	1.034	.424
Hata	1348.820	192	7.025		
Toplam	74694.537	312			
Düzeltilmiş Toplam	6373.296	311			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)

**Ek-9."Gemlik" Zeytin Çeşidi'nde Yapraklarda Sukroz İçeriği (mg/gTA)  
İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	587.614(a)	119	4.938	16.803	.000
Kesişme	800.704	1	800.704	2724.744	.000
Sıcaklık	1.640	1	1.640	5.581	.019
Ay	517.834	11	47.076	160.196	.000
Yıl	10.232	4	2.558	8.705	.000
Sıcaklık * Ay	15.347	11	1.395	4.748	.000
Sıcaklık * Yıl	.531	4	.133	.452	.771
Ay * Yıl	20.311	44	.462	1.571	.019
Sıcaklık *Ay* Yıl	6.808	44	.155	.527	.994
Hata	62.005	211	.294		
Toplam	1448.913	331			
Düzeltilmiş Toplam	649.619	330			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)

**Ek-10."Gemlik" Zeytin Çeşidi'nde Kabuklarda Sukroz İçeriği (mg/gTA)  
İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	615.414(a)	119	5.172	14.373	.000
Kesişme	3728.521	1	3728.521	10362.624	.000
Sıcaklık	8.431	1	8.431	23.431	.000
Ay	505.178	11	45.925	127.640	.000
Yıl	25.099	4	6.275	17.440	.000
Sıcaklık * Ay	8.780	11	.798	2.218	.014
Sıcaklık * Yıl	1.181	4	.295	.821	.513
Ay * Yıl	37.207	44	.846	2.350	.000
Sıcaklık *Ay* Yıl	30.518	44	.694	1.928	.001
Hata	85.634	238	.360		
Toplam	4402.606	358			
Düzeltilmiş Toplam	701.048	357			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)



**Ek-11."Gemlik" Zeytin Çeşidi'nde Yapraklarda Katalaz Enzim Aktivitesi  
( $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ) İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	62282.620(a)	119	523.383	13.595	.000
Kesişme	98210.567	1	98210.567	2550.986	.000
Sıcaklık	11.147	1	11.147	.290	.591
Ay	32728.575	11	2975.325	77.283	.000
Yıl	15987.246	4	3996.811	103.816	.000
Sıcaklık * Ay	1066.165	11	96.924	2.518	.006
Sıcaklık * Yıl	268.341	4	67.085	1.743	.143
Ay * Yıl	12138.606	44	275.877	7.166	.000
Sıcaklık *Ay* Yıl	1808.909	44	41.112	1.068	.372
Hata	6929.830	180	38.499		
Toplam	177265.884	300			
Düzeltilmiş Toplam	69212.450	299			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)

**Ek-12."Gemlik" Zeytin Çeşidi'nde Kabuklarda Katalaz Enzim Aktivitesi  
( $\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$ ) İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	31117.779(a)	119	261.494	5.665	.000
Kesişme	89972.623	1	89972.623	1949.314	.000
Sıcaklık	661.372	1	661.372	14.329	.000
Ay	15111.102	11	1373.737	29.763	.000
Yıl	1921.454	4	480.364	10.407	.000
Sıcaklık * Ay	832.637	11	75.694	1.640	.091
Sıcaklık * Yıl	222.369	4	55.592	1.204	.310
Ay * Yıl	7769.811	44	176.587	3.826	.000
Sıcaklık *Ay* Yıl	3620.650	44	82.287	1.783	.004
Hata	8677.336	188	46.156		
Toplam	134229.562	308			
Düzeltilmiş Toplam	39795.115	307			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)

**Ek-13."Gemlik" Zeytin Çeşidi'nde Yapraklarda Askorbat Peroksidaz Enzim Aktivitesi (µmol/mgprotein) İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	69.360(a)	119	.583	16.118	.000
Kesişme	123.856	1	123.856	3424.918	.000
Sıcaklık	.013	1	.013	.362	.548
Ay	41.412	11	3.765	104.103	.000
Yıl	5.442	4	1.360	37.618	.000
Sıcaklık * Ay	1.889	11	.172	4.749	.000
Sıcaklık * Yıl	.684	4	.171	4.729	.001
Ay * Yıl	13.544	44	.308	8.512	.000
Sıcaklık *Ay* Yıl	3.470	44	.079	2.181	.000
Hata	6.907	191	.036		
Toplam	191.284	311			
Düzeltilmiş Toplam	76.268	310			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)

**Ek-14."Gemlik" Zeytin Çeşidi'nde Kabuklarda Askorbat Peroksidaz Enzim Aktivitesi (µmol/mgprotein) İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	187.613(a)	119	1.577	7.810	.000
Kesişme	529.259	1	529.259	2621.953	.000
Sıcaklık	37.847	1	37.847	187.494	.000
Ay	74.578	11	6.780	33.587	.000
Yıl	25.031	4	6.258	31.001	.000
Sıcaklık * Ay	8.320	11	.756	3.747	.000
Sıcaklık * Yıl	1.241	4	.310	1.537	.193
Ay * Yıl	17.188	44	.391	1.935	.001
Sıcaklık *Ay* Yıl	11.506	44	.261	1.295	.119
Hata	41.179	204	.202		
Toplam	773.359	324			
Düzeltilmiş Toplam	228.792	323			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)

**Ek-15."Gemlik" Zeytin Çeşidi'nde Yapraklarda Toplam Çözünebilir Protein İçeriği (mg/gTA) İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	3641.045(a)	119	30.597	66.799	.000
Kesişme	8891.950	1	8891.950	19412.720	.000
Sıcaklık	2455.943	4	613.986	1340.441	.000
Ay	473.494	11	43.045	93.975	.000
Yıl	12.155	1	12.155	26.536	.000
Sıcaklık * Ay	333.079	44	7.570	16.527	.000
Sıcaklık * Yıl	4.062	4	1.016	2.217	.068
Ay * Yıl	167.820	11	15.256	33.307	.000
Sıcaklık *Ay* Yıl	130.639	44	2.969	6.482	.000
Hata	109.931	240	.458		
Toplam	12789.711	360			
Düzeltilmiş Toplam	3750.977	359			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)

**Ek-16."Gemlik" Zeytin Çeşidi'nde Kabuklarda Toplam Çözünebilir Protein İçeriği (mg/gTA) İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	160.012(a)	119	1.345	17.269	.000
Kesişme	539.579	1	539.579	6929.850	.000
Sıcaklık	2.708	1	2.708	34.773	.000
Ay	24.605	11	2.237	28.728	.000
Yıl	91.523	4	22.881	293.858	.000
Sıcaklık * Ay	11.626	11	1.057	13.574	.000
Sıcaklık * Yıl	3.071	4	.768	9.860	.000
Ay * Yıl	10.940	44	.249	3.193	.000
Sıcaklık *Ay* Yıl	6.094	44	.139	1.779	.005
Hata	13.315	171	.078		
Toplam	714.365	291			
Düzeltilmiş Toplam	173.326	290			

SD: Serbertlik Derecesi, Ö.D: Önem Derecesi (%5)

## TEŞEKKÜR

Öncelikle tez konusunun seçiminden sonuçlandırılmasına kadar tüm aşamalarda bilgi ve tecrübesini ile desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Atilla ERİŞ'e teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında görüş ve öneri ile beni yönlendiren Tez İzleme Komitemin değerli üyelerinden Sayın Prof.Dr. Rahmi BİLALOĞLU'na ve Prof.Dr. Erdoğan BARUT'a teşekkür ederim.

Çalışmada bitkisel materyelin temin edildiği zeytin bahçesinin sahibi Rahmetli Sayın Mehmet YILMAZ'a, eşine ve çocuklarına şükranlarımı sunarım.

Araştırmada bulunan Western Blot analizleri için laboratuvarında bana çalışma imkanı veren Massachusetts Institute of Technology (Cambridge, Massachusetts, U.S.A) öğretim üyesi Sayın Dr. Richard J. WURTMAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca yine Western analizlerinde kullanılan "dehidrin antikorunu"nu hiçbir maddi imkan beklemeden temin eden University of California öğretim üyesi Sayın Dr. Timothy J. CLOSE'a teşekkür ederim.

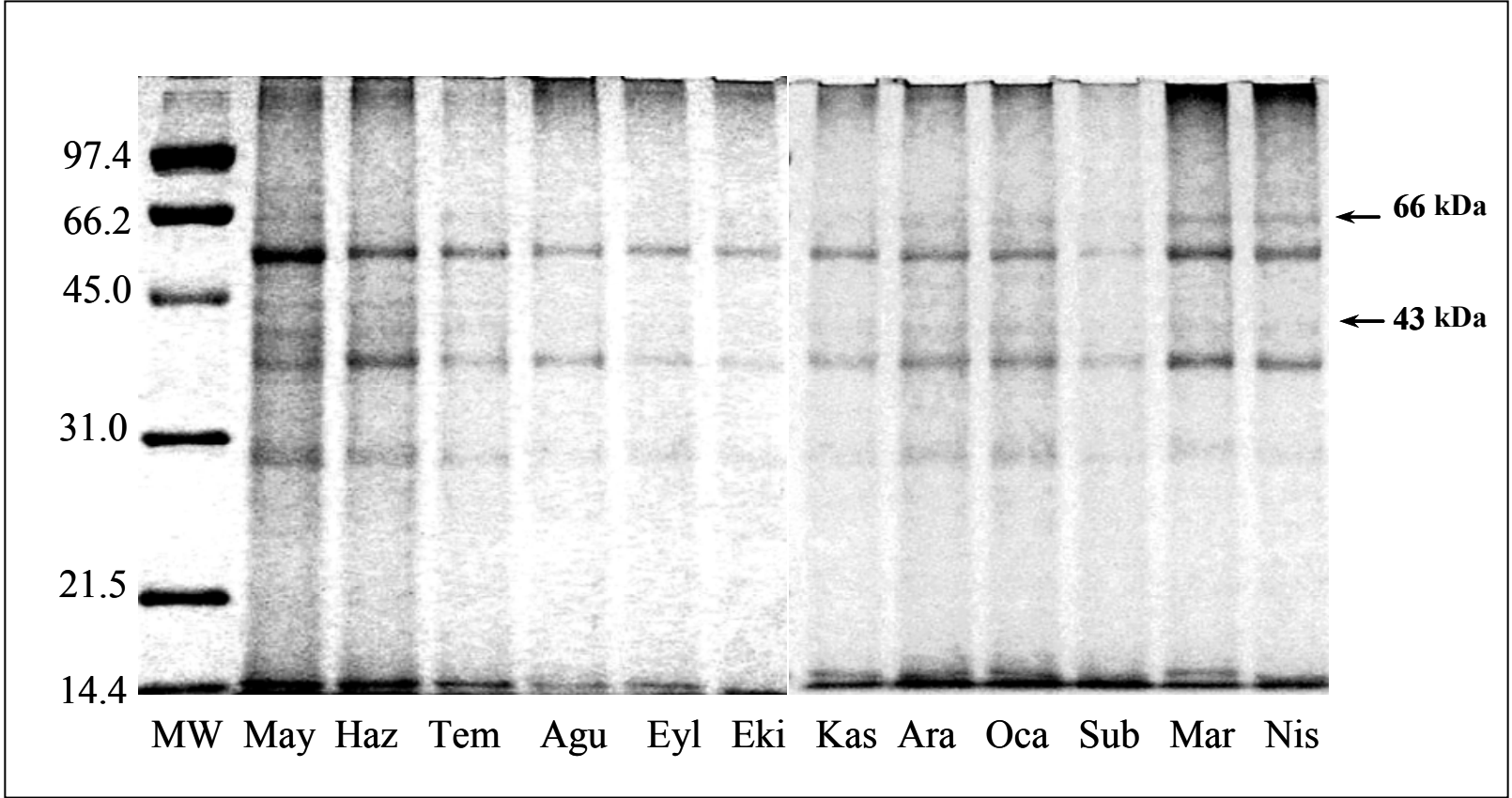
Laboratuar çalışmaları sırasında ve tez yazımı aşamasında bilgi birikimi ve tecrübeleri ile yardım ve desteğini gördüğüm Sayın Doç.Dr. Hatice GÜLEN'e teşekkür ederim.

Ayrıca tezin deneme ve yazım aşamalarında yardımcı olan Sayın Yrd.Doç.Dr. Ahmet İPEK ve Uzm.Dr. Nezihe KÖKSAL'a teşekkür ederim.

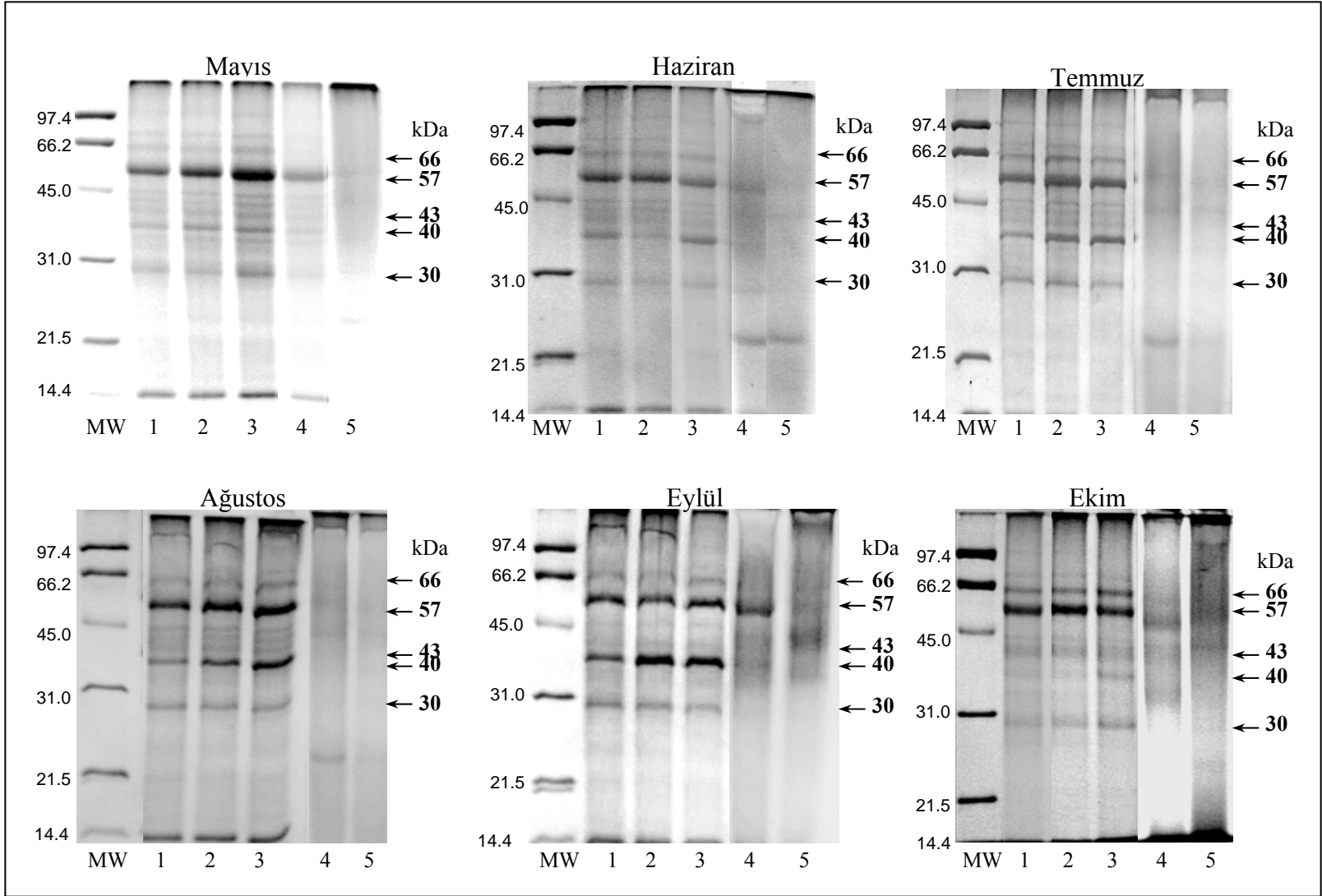
Her zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme, eşim Dr. Mehmet CANSEV'e ve kızlarım Zeynep ve Sedef'e gösterdikleri sabır ve anlayıştan dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

## ÖZGEÇMİŞ

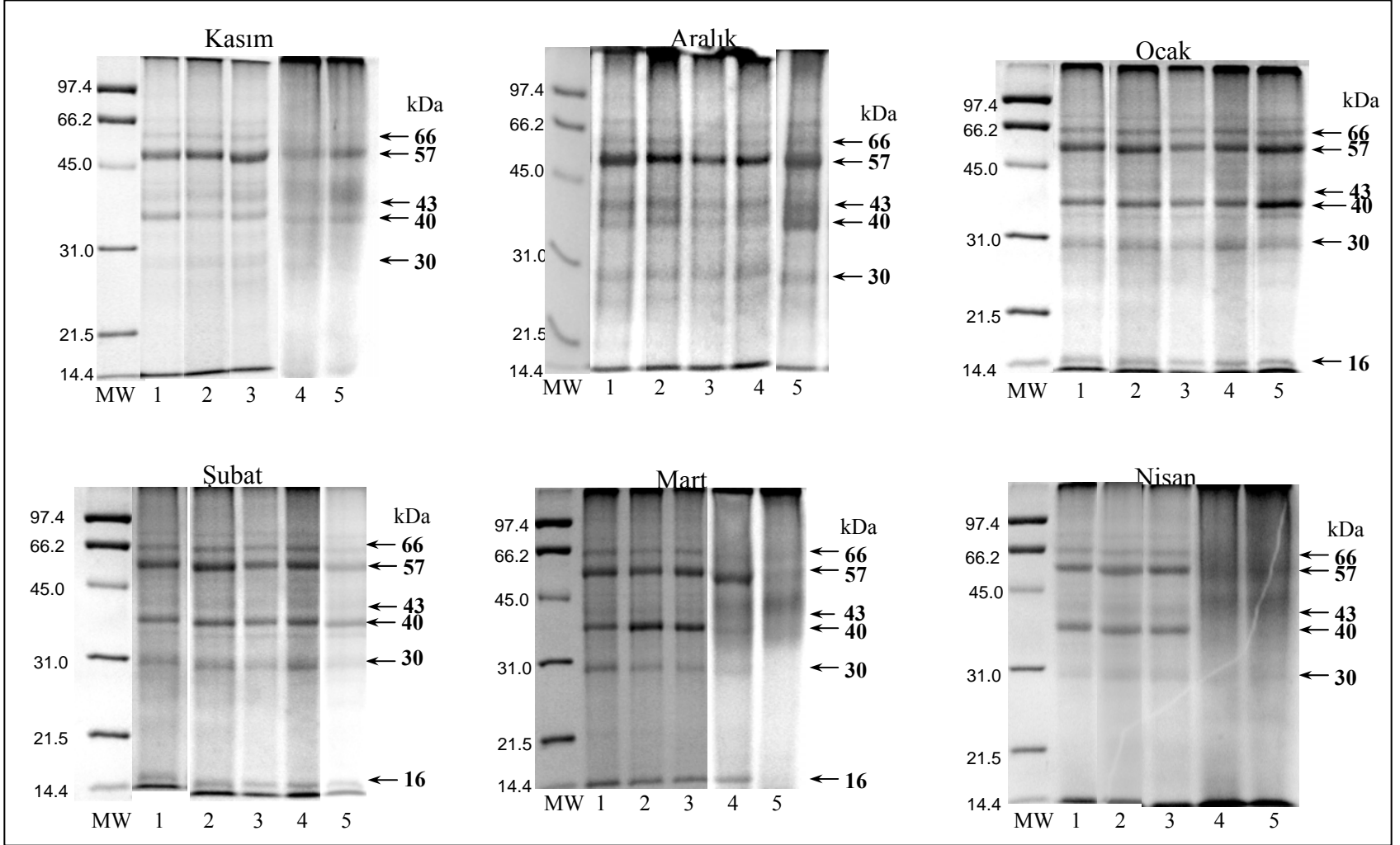
1977 yılında Uşak ilinde doğdu. 1998 yılında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden mezun oldu. 1999 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 1999-2002 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Yüksek Lisans eğitimi aldı. Haziran 2006- Mayıs 2007 tarihleri arasında tez konusu ile ilişkili olarak western blot ve fosfolipid analizleri yapmak amacıyla Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan Massachusetts Institute of Technology, Brain and Cognitive Science bölümünde Dr. Richard J. Wurtman'ının laboratuvarında Araştırma Görevlisi olarak çalıştı. Halen Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.



**Şekil 3.16.** Gemlik zeytin çeşidi yapraklarında aylara göre SDS- PAGE toplam protein profilleri, MW: Moleküler Ağırlık Standardı (kDa).

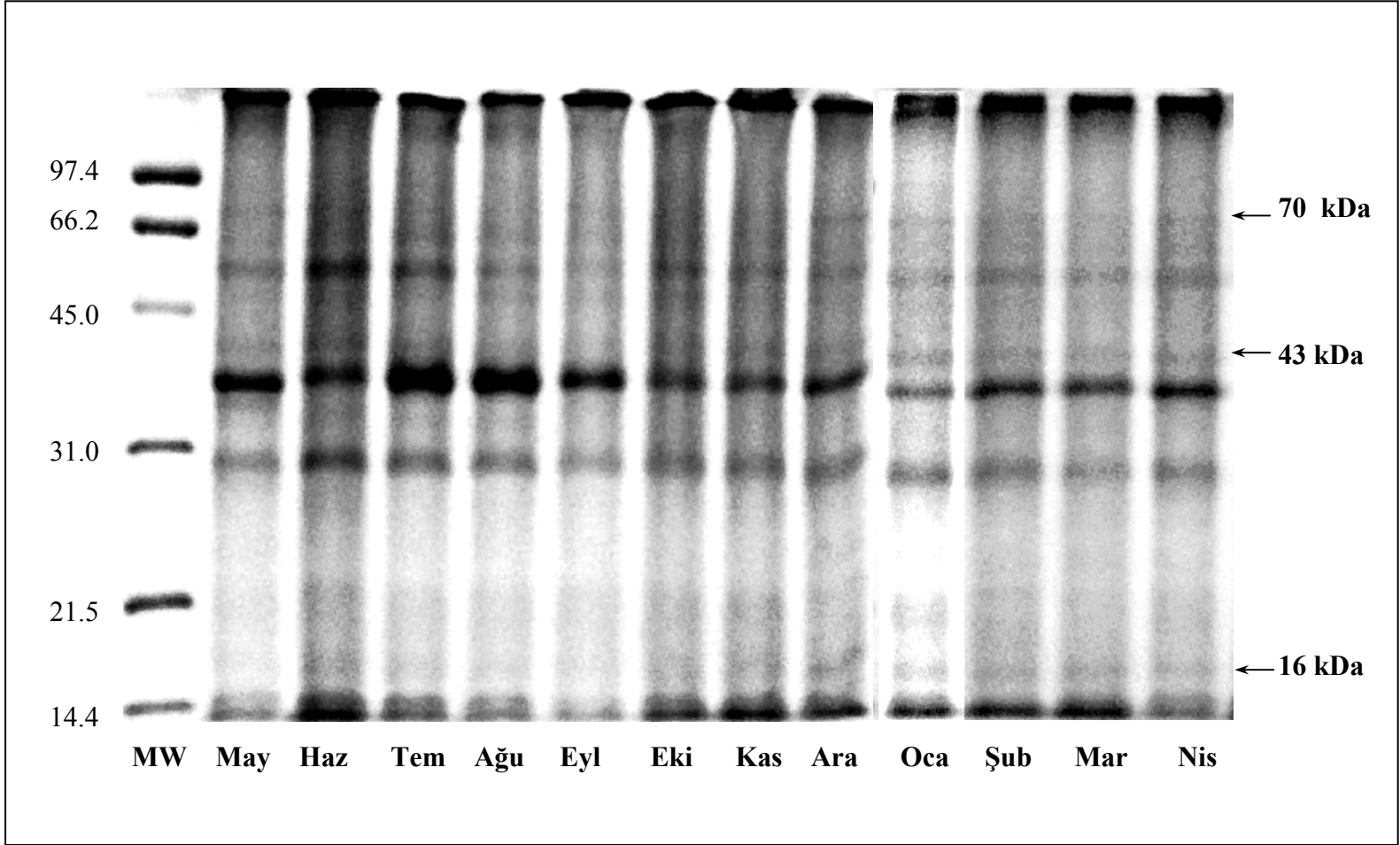


**Şekil 3.17 A. Gemlik zeytin çeşidi yapraklarında aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre SDS- PAGE toplam protein profilleri. MW: Moleküler Ağırlık Standardı (kDa), Düşük Sıcaklık Uygulamaları: (1). Kontrol, (2). 4 °C, (3). -5 °C, (4). -10 °C, (5). -20 °C**

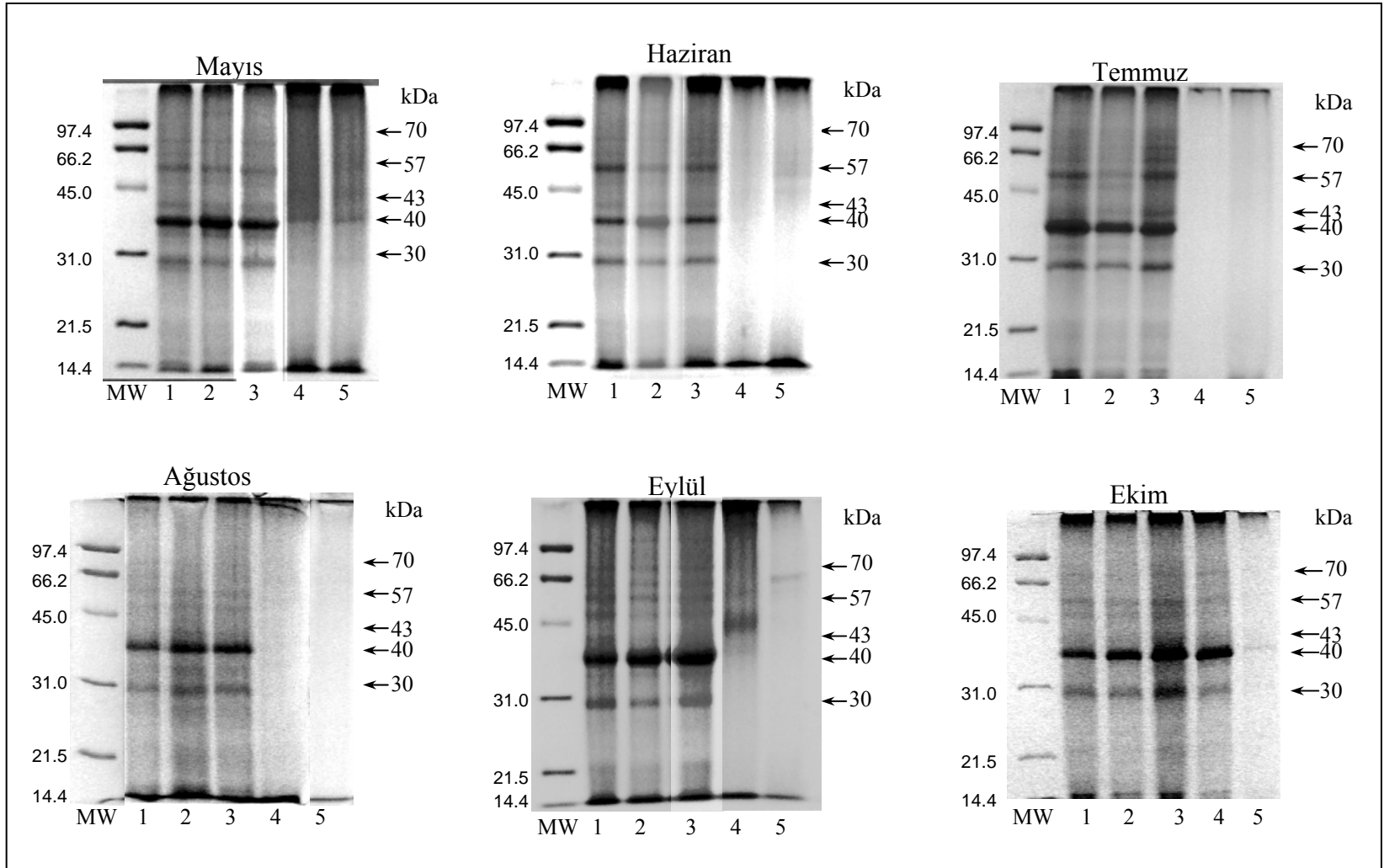


**Şekil 3.17 B.Gemlik zeytin çeşidi yapraklarında aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre SDS- PAGE toplam protein profilleri. MW: Moleküler Ağırlık Standardı (kDa), Düşük Sıcaklık Uygulamaları: (1). Kontrol, (2). 4 °C, (3). -5 °C, (4). -10 °C, (5). -20 °C**

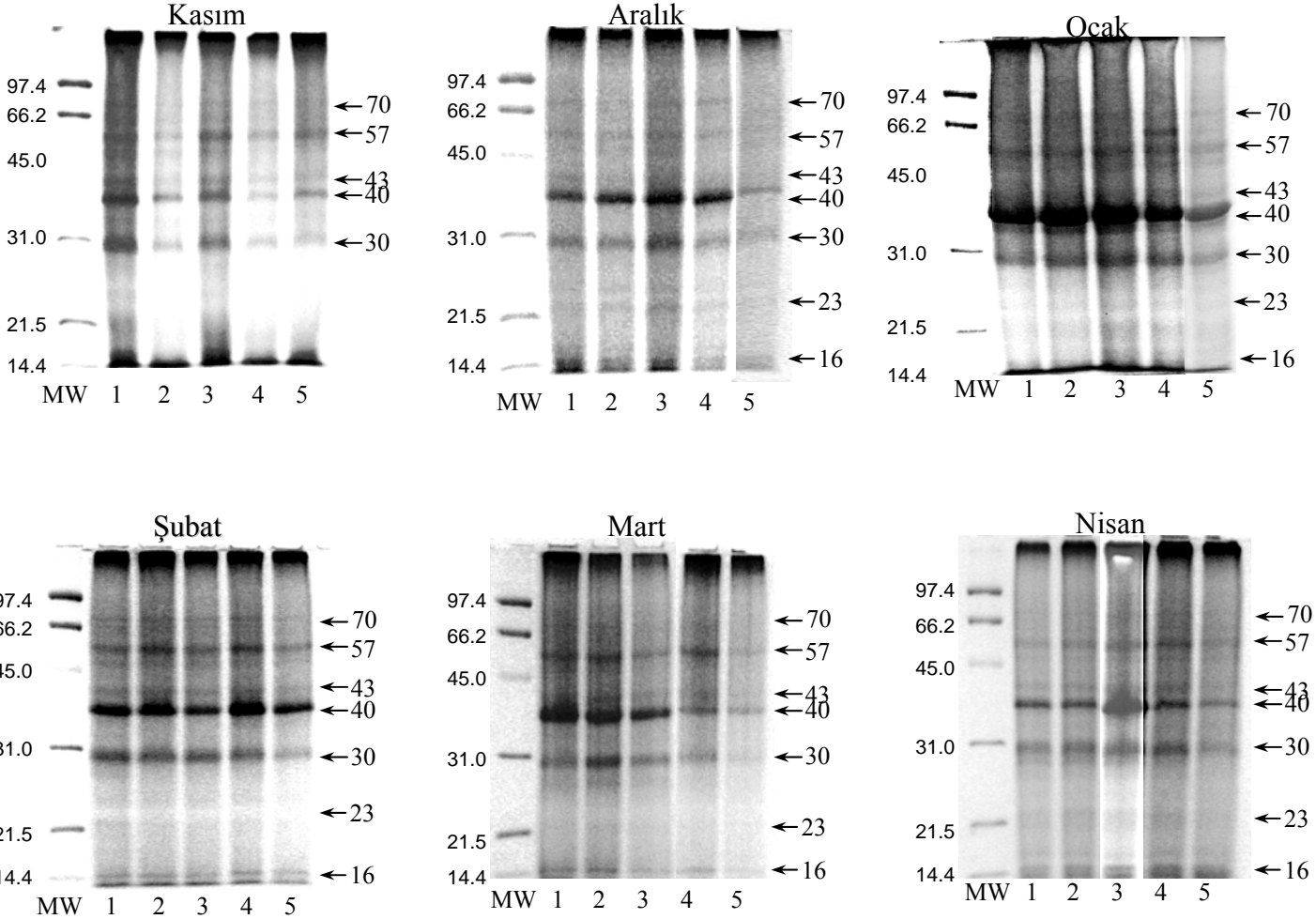




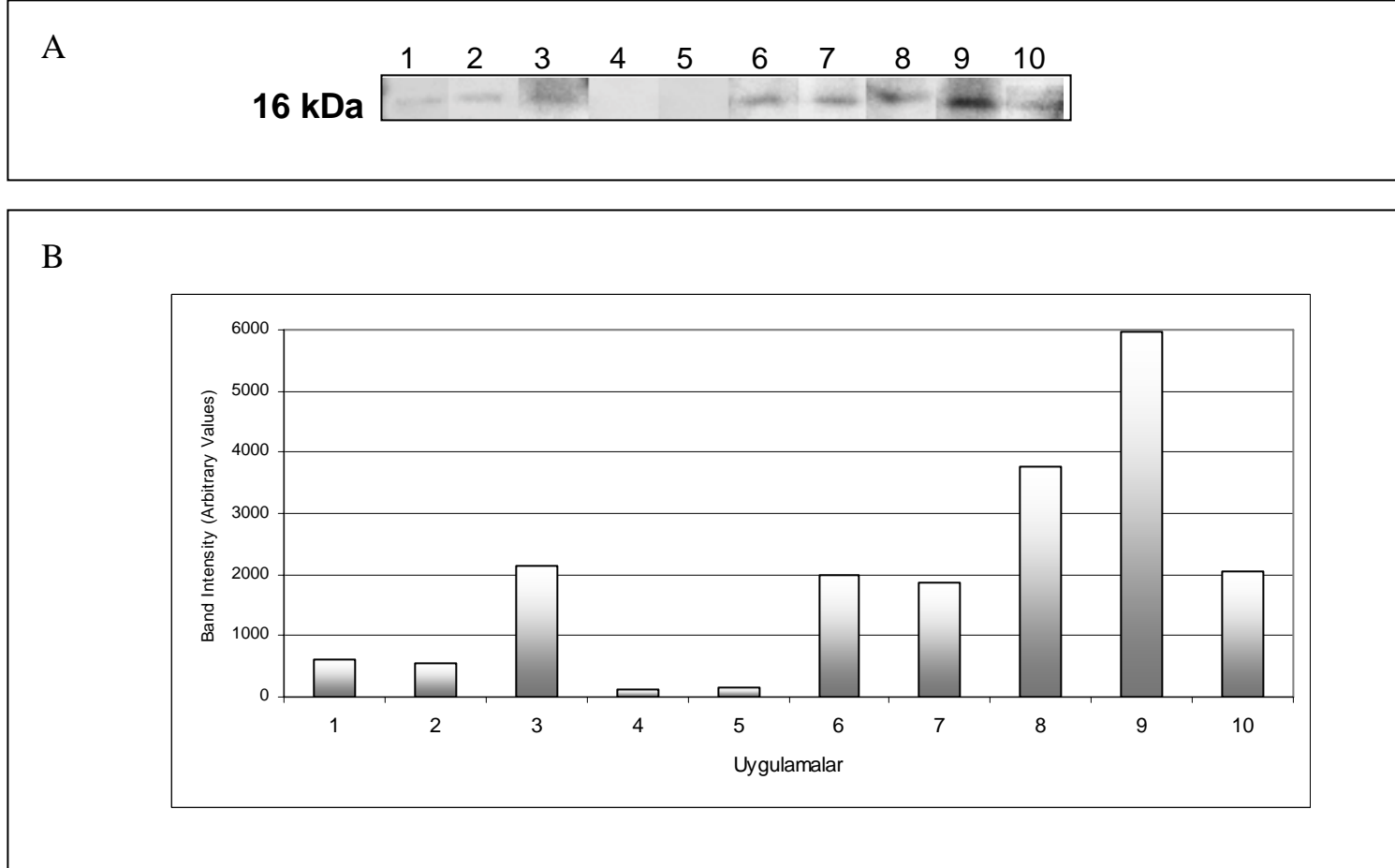
Şekil 3.18. Gemlik zeytin çeşidi kabuklarında aylara göre SDS- PAGE toplam protein profilleri. MW: Moleküler Ağırlık Standardı (kDa).



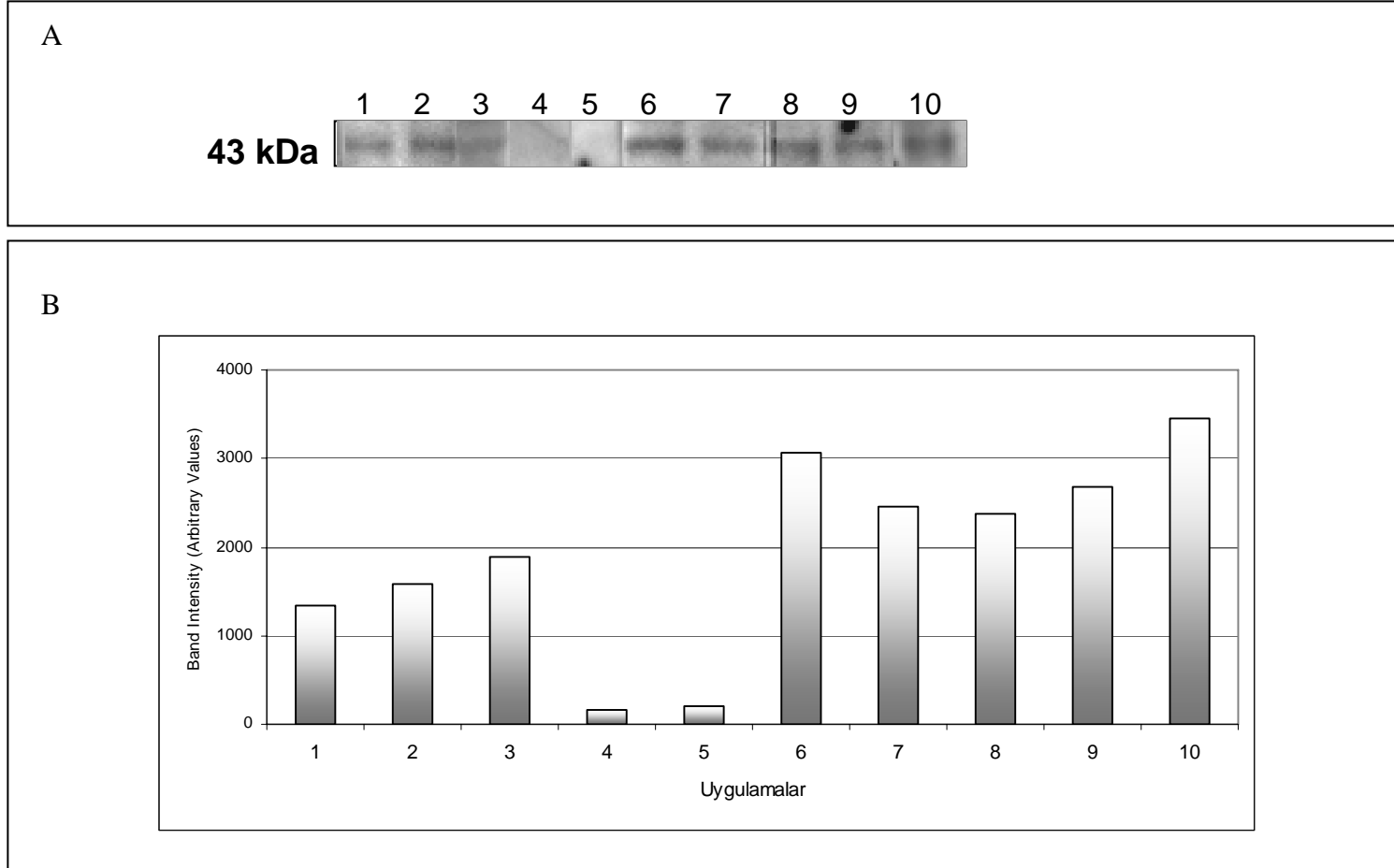
**Şekil 3.19 A.Gemlik zeytin çeşidi kabuklarında aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre SDS- PAGE toplam protein profilleri. MW: Moleküler Ağırlık Standardı (kDa), Düşük Sıcaklık Uygulamaları: (1). Kontrol, (2). 4 °C, (3). -5 °C, (4). -10 °C, (5). -20 °C**



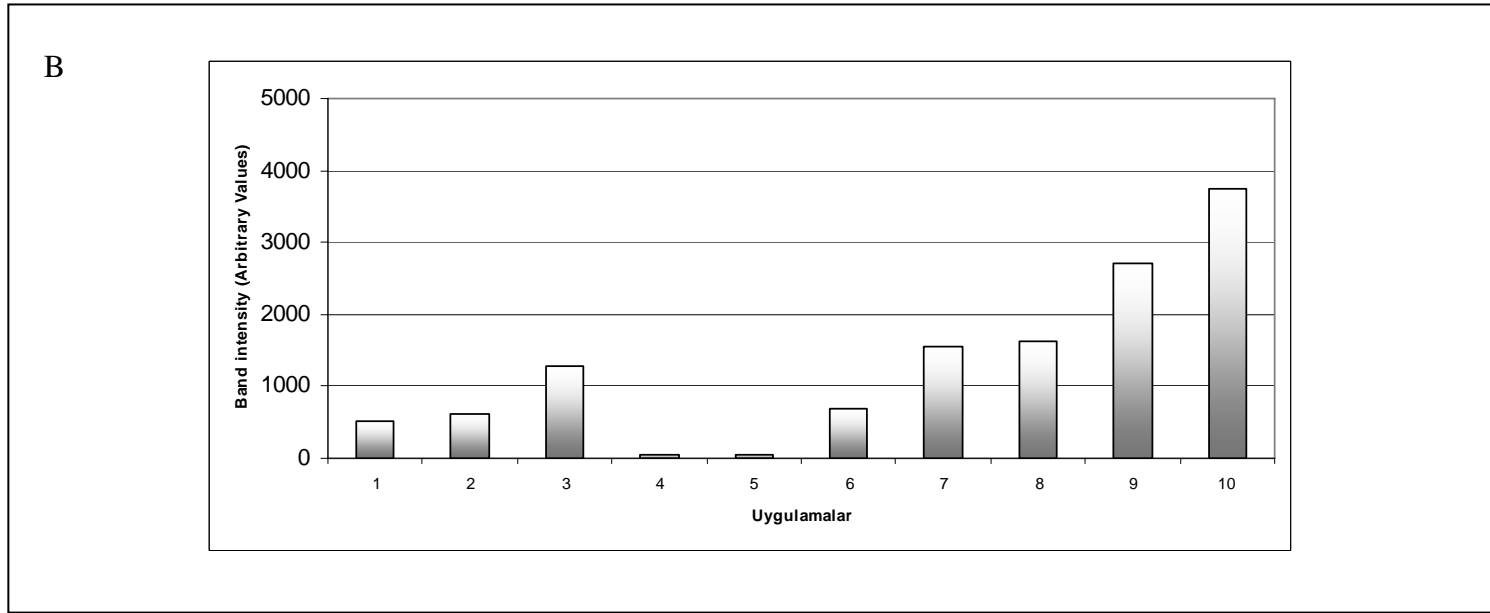
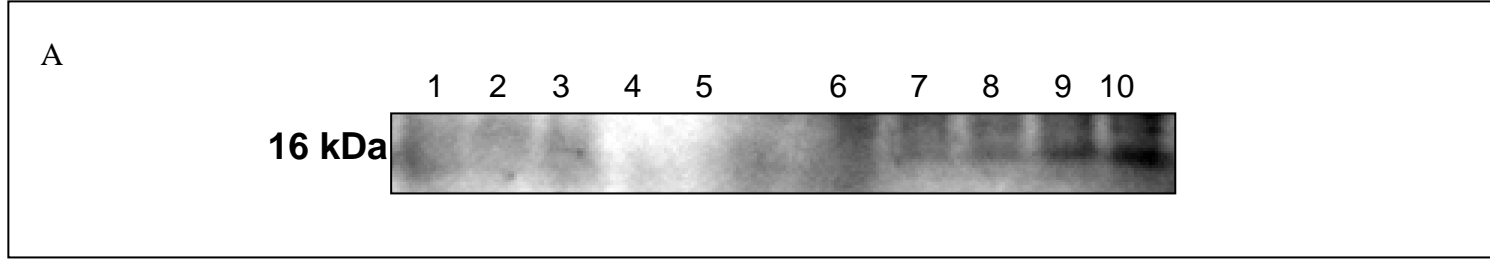
**Şekil 3.19 B.** Gemlik zeytin çeşidi kabuklarında aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre SDS- PAGE toplam protein profilleri. MW: Moleküler Ağırlık Standardı (kDa), Düşük Sıcaklık Uygulamaları: (1). Kontrol, (2). 4 °C, (3). -5 °C, (4). -10 °C, (5). -20 °C



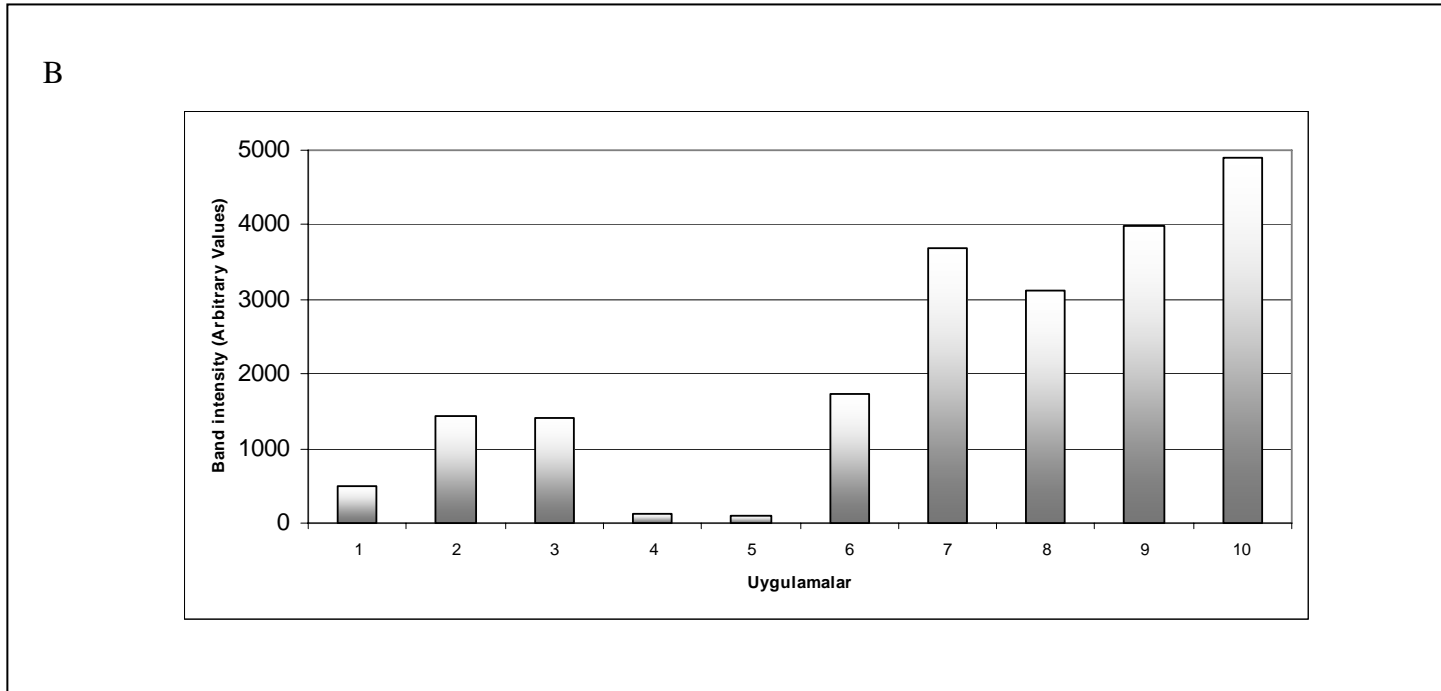
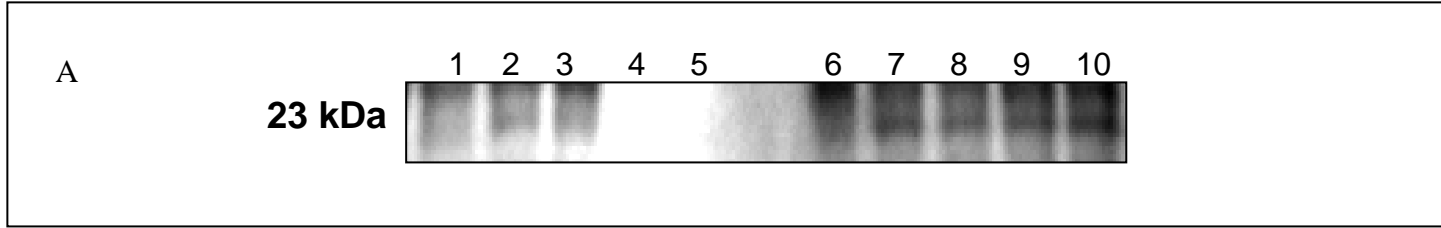
**Şekil 3.20. Gemlik zeytin çeşidi'inde yapraklarda aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre 16 kDa dehidrin proteinin görünümü (A) ve 16 kDa dehidrin proteinin band yoğunluğu (B). Uygulamalar: 1: Temmuz-Kontrol; 2: Temmuz - 4 °C; 3: Temmuz-(-5) °C; 4: Temmuz - (-10) °C ; 5:Temmuz - (-20) °C ; 6:Ocak-Kontrol; 7: Ocak - 4 °C; 8: Ocak-(-5) °C; 9: Ocak - (-10) °C ; 10: Ocak - (-20) °C**



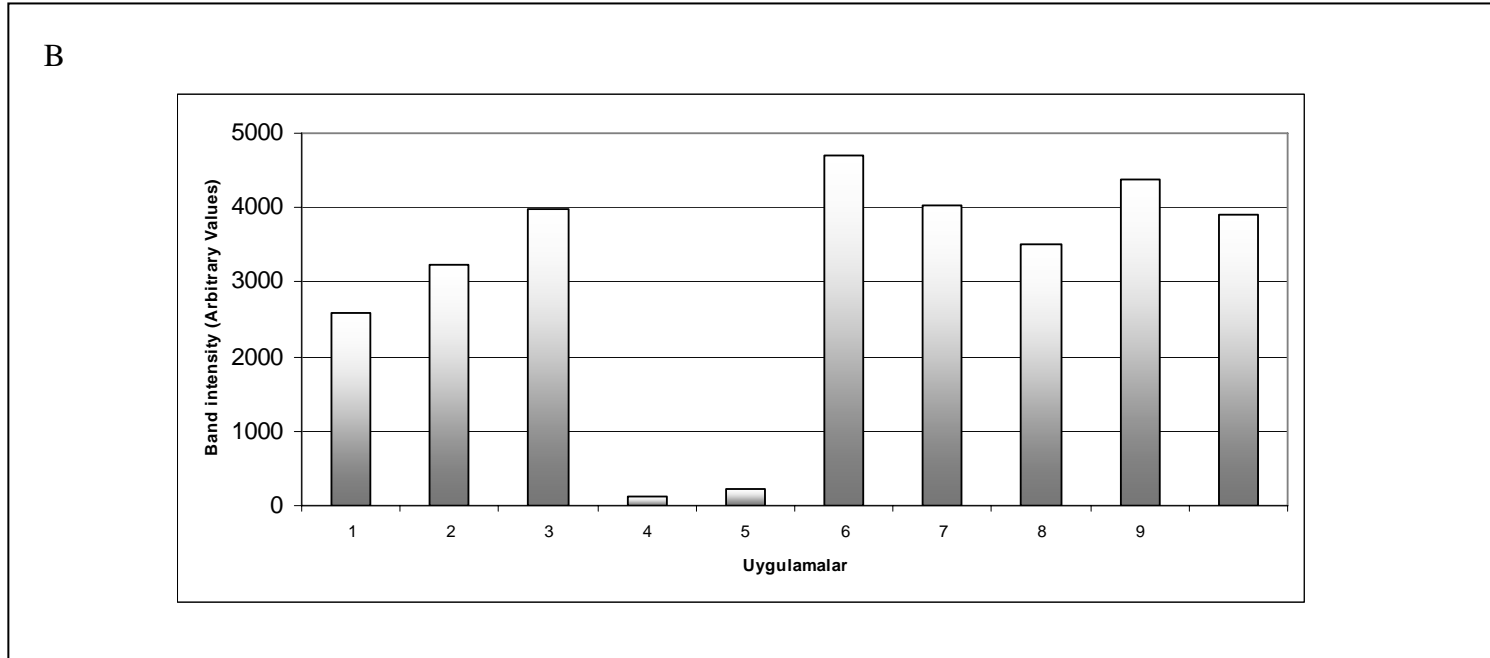
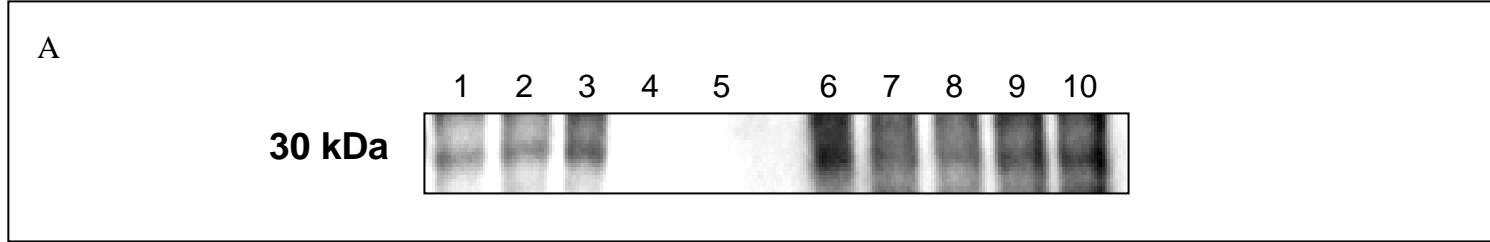
**Şekil 3.21. Gemlik zeytin çeşidi'inde yapraklarda aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre 43 kDa dehidrin proteinin görünümü (A) ve 43 kDa dehidrin proteinin band yoğunluğu (B). Uygulamalar: 1: Temmuz-Kontrol; 2: Temmuz - 4 °C; 3: Temmuz-(-5) °C; 4: Temmuz - (-10) °C ; 5:Temmuz - (-20) °C ; 6:Ocak-Kontrol; 7: Ocak - 4 °C; 8: Ocak-(-5) °C; 9: Ocak - (-10) °C ; 10: Ocak - (-20) °C**



**Şekil 3.22. Gemlik zeytin çeşidi'inde kabuklarda aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre 16 kDa dehidrin proteinin görünümü (A) ve 16 kDa dehidrin proteinin band yoğunluğu (B). Uygulamalar: 1: Temmuz-Kontrol; 2: Temmuz - 4 °C; 3: Temmuz-(-5) °C; 4: Temmuz - (-10) °C ; 5:Temmuz - (-20) °C ; 6:Ocak-Kontrol; 7: Ocak - 4 °C; 8: Ocak-(-5) °C; 9: Ocak - (-10) °C ; 10: Ocak - (-20) °C**

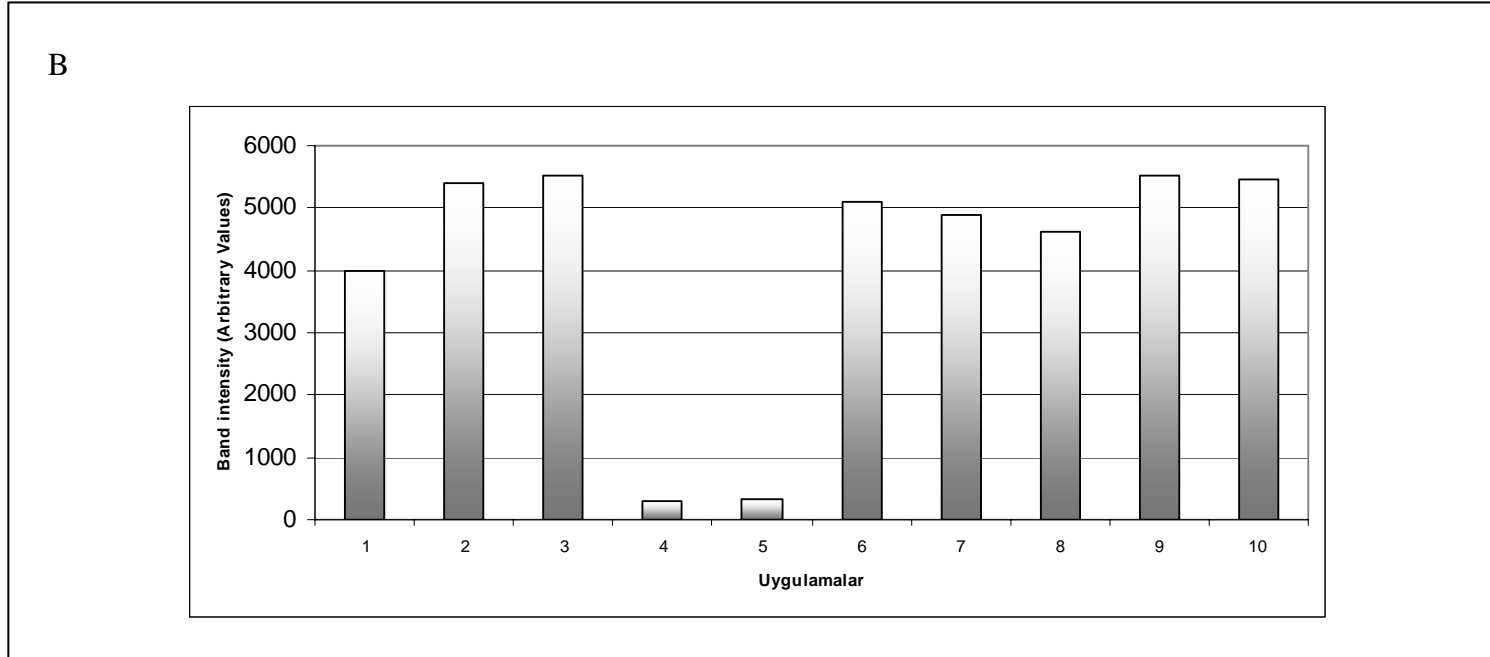
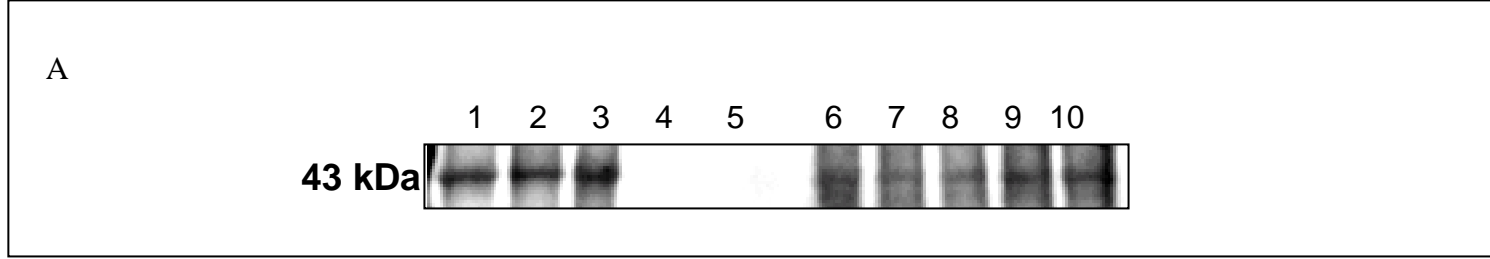


**Şekil 3.23.**Gemlik zeytin çeşidi'inde kabuklarda aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre 23 kDa dehidrin proteinin görünümü (A) ve 23 kDa dehidrin proteinin band yoğunluğu (B). Uygulamalar: 1: Temmuz-Kontrol; 2: Temmuz - 4 °C; 3: Temmuz-(-5) °C; 4: Temmuz - (-10) °C ; 5:Temmuz - (-20) °C ; 6:Ocak-Kontrol; 7: Ocak - 4 °C; 8: Ocak-(-5) °C; 9: Ocak - (-10) °C ; 10: Ocak - (-20) °C



**Şekil 3.24.**Gemlik zeytin çeşidi'inde kabuklarda aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre 30 kDa dehidrin proteinin görünümü (A) ve 30 kDa dehidrin proteinin band yoğunluğu (B). Uygulamalar: 1: Temmuz-Kontrol; 2: Temmuz - 4 °C; 3: Temmuz-(-5) °C; 4: Temmuz - (-10) °C ; 5:Temmuz - (-20) °C ; 6:Ocak-Kontrol; 7: Ocak - 4 °C; 8: Ocak-(-5) °C; 9: Ocak - (-10) °C ; 10: Ocak - (-20) °C





**Şekil 3.25. Gemlik zeytin çeşidi'inde kabuklarda aylar ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre 43 kDa dehidrin proteinin görünümü (A) ve 43 kDa dehidrin proteinin band yoğunluğu (B). Uygulamalar: 1: Temmuz-Kontrol; 2: Temmuz - 4 °C; 3: Temmuz-(-5) °C; 4: Temmuz - (-10) °C ; 5:Temmuz - (-20) °C ; 6:Ocak-Kontrol; 7: Ocak - 4 °C; 8: Ocak-(-5) °C; 9: Ocak - (-10) °C ; 10: Ocak - (-20) °C**