

**YÜKSEK SICAKLIK STRESİNİN ÇİLEK BİTKİSİNDE
ENZİMATİK VE ENZİMATİK OLMAYAN
ANTİOKSİDANLAR İLE PROTEİN
METABOLİZMASINA ETKİLERİ**

Sergül ERGİN



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜKSEK SICAKLIK STRESİNİN ÇİLEK BİTKİSİNDE ENZİMATİK VE
ENZİMATİK OLMAYAN ANTİOKSİDANLAR İLE PROTEİN
METABOLİZMASINA ETKİLERİ**

Sergül ERGİN

Prof. Dr. Hatice GÜLEN
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BURSA - 2012

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Sergül ERGİN tarafından hazırlanan ‘‘Yüksek Sıcaklık Stresinin Çilek Bitkisinde Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar ile Protein Metabolizmasına Etkileri’’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Hatice GÜLEN

Başkan : Prof. Dr. Hatice GÜLEN
Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza

Üye : Prof. Dr. Vedat ŞENİZ
Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza

Üye : Prof. Dr. Uygun AKSOY
Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza

Üye : Doç. Dr. Himmet TEZCAN
Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi,
Bitki Koruma Anabilim Dalı

İmza

Üye : Doç. Dr. Ahmet İPEK
Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Kadri ARSLAN
Enstitü Müdürü
.../.../2012

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim

26/06/2012

İmza

Sergül ERGİN

ÖZET
Doktora Tezi

**YÜKSEK SICAKLIK STRESİNİN ÇİLEK BİTKİSİNDE ENZİMATİK VE
ENZİMATİK OLMAYAN ANTIOKSİDANLAR İLE PROTEİN
METABOLİZMASINA ETKİLERİ**

Sergül ERGİN
Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hatice GÜLEN

Çilek bitkisinde (*Fragaria x ananassa* Duch.) yüksek sıcaklıklara tolerans mekanizmasının araştırıldığı bu çalışmada yüksek sıcaklığa tolerant (R. Hope) ve hassas (CG3) iki çilek çeşidi kullanılmıştır. Çeşitlere ait frigo fideler perlit, torf ve elenmiş bahçe toprağı karışımı (1:1:1) içeren 14×12 cm çapındaki saksılarda, 30/15°C sıcaklıkta ve ortalama % 65 oransal nemde 2 ay boyunca yetiştirilmişlerdir. Daha sonra çeşitlere ait yaprak örneklerine yapay olarak kademeli ve şok yüksek sıcaklık testleri (35, 40, 43, 46, 49, 52, 55 ve 60°C) uygulanmıştır. Yüksek sıcaklık uygulamalarını takiben hücrede meydana gelen zararlanmaları belirlemek için iyon sızıntısı testleri yapılmış ve hidrojen peroksit (H₂O₂) birikimi ölçülmüştür. Yüksek sıcaklıklara ve uygulama şekline göre yaprak dokularında oluşan enzimatik olmayan antioksidanlardan askorbik asit (AsA) ve glutatyon miktarı (GSH) ile enzimatik antioksidanlardan askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR) ve peroksidaz (PRX) enzim aktiviteleri saptanmıştır. Ayrıca, yüksek sıcaklığa toleransta protein metabolizmasının açıklanması ve bu konuda kullanılabilir bir protein markırının araştırılması amacıyla toplam çözünebilir protein değişimleri ölçülerek SDS-PAGE yöntemiyle toplam çözünebilir protein profilleri çıkarılmıştır. Ardından immunoblot tekniğı ile örneklerde HSP 60 ve HSP 70 proteinleri araştırılmıştır.

Yüksek sıcaklık uygulamaları sonucu hücresel zararlanmanın sıcaklık artışına paralel olarak arttığı saptanmıştır. AsA ve GSH miktarının uygulama şekline ve sıcaklıklara göre değiştiğı belirlenmiştir. Enzimatik antioksidanlardan APX, CAT ve PRX aktivitesinin sıcaklık artışıyla birlikte arttığı, GR aktivitesinin ise değişmediğı tespit edilmiştir. SDS-PAGE’de uygulamalara göre değişen pek çok protein bandı görülmüş ancak HSP60 için yapılan immunoblot çalışmalarında sadece 23 kDa proteinin sıcaklığa bağlı olduğu tespit edilmiştir. 23 kDa HSP’nin her iki çeşitte de yüksek sıcaklıkta biriktiğı ve yoğunluğunun da R.Hope çeşidinde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla 23 kDa HSP, çilek yaprak dokularının yüksek sıcaklık toleransı ile ilişkilendirilmiştir.

Sonuç olarak, R.Hope çilek çeşidinin yaprak dokularının yüksek sıcaklık koşullarında CAT, APX ve PRX gibi enzim aktivitelerini arttırarak antioksidatif savunma sistemini harekete geçirmek ve 23 kDa HSP sentezlemek suretiyle hücre zarı yapısını koruyabildiğı saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Çilek, *Fragaria x ananassa*, sıcaklık stresi, antioksidan enzim, protein

2012, viii, 92 sayfa.

ABSTRACT
PhD Thesis

EFFECTS OF HIGH TEMPERATURE STRESS ON ENZYMATIC AND NON-ENZYMATIC ANTIOXIDANTS AND PROTEIN METABOLISM IN STRAWBERRY PLANTS

Sergül ERGİN

Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Hatice GÜLEN

In this study, the mechanism of tolerance to high temperatures was investigated in strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Duch) using two strawberry cultivars which were high temperature tolerant (R. Hope) and sensitive (CG3). Seedlings were planted in 14x12 cm pots using perlite, peat and garden mold mix (1:1:1) and grown for 2 months at 30/15°C and 65% relative humidity. Then, gradually and shock high temperature tests (35, 40, 43, 46, 49, 52, 55 and 60°C) were applied to the leaf samples. To determine the cell damages that occurred after high-temperature applications, ion leakage tests were conducted and the accumulation of hydrogenperoxide (H₂O₂) was determined. The level of non-enzymatic antioxidants such as ascorbic acid (AsA) and glutathione (GSH), and some enzymatic antioxidants such as ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and peroxidase (PRX) enzyme activities were measured. In addition, to investigate protein metabolism and identify a protein marker in tolerance to high temperature of strawberry, total soluble protein profiles were determined using SDS-PAGE method and levels of HSP 60 proteins were analysed using immunoblotting method.

As a result of high temperature applications, cellular injury was increase in parallel to the temperatures. AsA and GSH contents were varied according to the applications and temperatures. APX, CAT and PRX activities were increased by high temperature, but GR activity was not changed. On SDS-PAGE many protein bands were detected depending on the treatments. However anti-HSP60 immunoblots revealed that the 23 kDa polypeptides were detectable during heat-acclimation of strawberry cultivars. The 23 kDa HSP accumulated significantly in high temperature treatments in both cultivars. Indeed the intensities of the HSP in R. Hope were more than CG3. Therefore accumulation of 23 kDa HSP was correlated with heat-tolerance of the cultivars.

In conclusion, strawberry leaf tissues of cultivar R.Hope were found to enhance the structural stability of cellular membranes under high temperature by increasing both the activity of such enzymes as CAT, APX and PRX to activate the antioxtidative systems and the expression of 23 kDa HSP.

Keywords: Strawberry, *Fragaria x ananassa*, heat stress, antioxidative enzyme, protein
2012, viii, 92 pages.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hatice GÜLEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında bilgi, görüş ve önerileriyle beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi üyesi değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Vedat ŞENİZ'e ve Sayın Doç. Dr. Himmet TEZCAN'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları sırasında ve tezimin yazım aşamasında yardım aldığım Sayın Doç. Dr. Ahmet İPEK, Araş. Gör. Müge KESİCİ ve Araş. Gör. Dr. Asuman CANSEV'e teşekkür ederim.

108 O 063 nolu proje olarak bu çalışmayı destekleyen TÜBİTAK-TOVAG'a teşekkür ederim.

Çalışma materyali olarak kullanılan çilek fidelerini temin eden YALTIR A.Ş. (Adana)'ye teşekkür ederim.

Çalışmada kullanılan Actagro 7-7-7 besin solüsyonunu temin eden Hekimoğlu Sözmen Ltd. Şti. (Mersin)'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni maddi manevi destekleyen AİLEME, gösterdiği sabır ve anlayışından dolayı sevgili eşim Kayhan ERGİN'e teşekkür ederim.

Sergül ERGİN
26/06/2012

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	6
2.1. Hücresel Zararlanmanın Belirlenmesi.....	6
2.2. Yüksek Sıcaklık Stresinde Antioksidan Savunma Mekanizması.....	9
2.2.1. Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	9
2.2.2. Antioksidan enzimler.....	11
2.3. Yüksek Sıcaklık Stresinde Protein Metabolizması.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
3.1. Materyal.....	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Yüksek Sıcaklık Uygulamaları.....	23
3.2.2. Hücre Zarı Zararının Belirlenmesi.....	23
3.2.3. Aktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi.....	24
3.2.4. Enzimatik Olmayan Antioksidan Analizleri.....	25
3.2.4.1. Askorbik asit miktarının belirlenmesi.....	25
3.2.4.2. Glutasyon miktarının belirlenmesi.....	26
3.2.5. Enzimatik Antioksidan Analizleri.....	26
3.2.5.1. Askorbat peroksidaz (APX, EC.1.11.1.11) analizi.....	26
3.2.5.2. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) analizi.....	29
3.2.5.3. Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) analizi.....	32
3.2.5.4. Peroksidaz (PRX, EC 1.11.1.7) analizi.....	34
3.2.6. Protein Analizleri.....	36
3.2.6.1. Prolin analizi.....	36
3.2.6.2. Toplam çözünebilir protein analizi.....	37
3.2.6.3. SDS-PAGE analizi.....	39
3.2.6.4. İmmunoblot (Western blot) analizi.....	42
3.2.7. İstatistiksel Analizler.....	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. Hücre Zarı Zararının Belirlenmesi.....	45
4.2. Aktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi.....	46
4.3. Enzimatik Olmayan Antioksidan Analizleri.....	47
4.3.1. Askorbik asit miktarının belirlenmesi.....	47
4.3.2. Glutasyon miktarının belirlenmesi.....	49
4.4. Enzimatik Antioksidan Analizleri.....	51
4.4.1. Askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	51
4.4.2. Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	53
4.4.3. Glutasyon redüktaz (GR) enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	55
4.4.4. Peroksidaz (PRX) enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	57
4.5. Protein Analizleri.....	59

4.5.1. Prolin miktarı.....	59
4.5.2. Toplam çözünebilir protein miktarı.....	60
4.5.3. SDS-PAGE.....	62
4.5.4. İmmunoblot (Western blot) analizi.....	63
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	66
KAYNAKLAR	74
EKLER.....	84
ÖZGEÇMİŞ.....	91

KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
APX	Askorbat peroksidaz
AsA	Askorbik asit
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Katalaz
DTNB	Dithio nitro benzoik asit
DTT	1,4 dithiothreitol
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfit
HSP	Isı şoku proteini (Heat shock protein)
IPCC	(Intergovernmental Panel on Climatic Change)
NADPH	β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NEM	N-etilmaleimide
OD	Absorbans değeri (Optical density)
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PRX	Peroksidaz
PVPP	Polivinilpolipirrolidon
ROS	Reaktif oksijen türevleri (Reactive oxygen species)
Rf	Oransal ilerleme (Relative mobility)
rpm	Dakikadaki dönme sayısı (Revolution per minute)
SD	Serbestlik derecesi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamid jel elektroforezi
SOD	Superoksit dismütaz
SS	Standart sapma
TBS	Tris Buffer Saline
TBST	Tris Buffer Saline Tween-20
TCA	Trikloro asetik asit
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametiletilediamin
TA	Taze ağırlık

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. Çilek çeşitlerine ait bitkilerin genel görünümü.....	22
Şekil 4.1. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin hücre zarı zararlanmaları.....	45
Şekil 4.2. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarları.....	47
Şekil 4.3. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin toplam askorbik asit (AsA) miktarı (mg/gTA).....	48
Şekil 4.4. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin redükte askorbik asit (AsA) miktarı (mg/gTA).....	49
Şekil 4.5. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin toplam glutatyon (GSH) miktarı (µg/gTA).....	50
Şekil 4.6. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi (µmol / gTA).....	51
Şekil 4.7. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin spesifik askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi (µmol / mg prot.).....	52
Şekil 4.8. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin katalaz (CAT) enzim aktivitesi (nmol/gTA/dak.).....	53
Şekil 4.9. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin spesifik katalaz (CAT) enzim aktivitesi (nmol/mg prot.).....	54
Şekil 4.10. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi (nmol/g TA).....	55
Şekil 4.11. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin spesifik glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi (nmol/ ünite/ mg prot.).....	56
Şekil 4.12. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamalarının R. Hope ve CG3 çilek çeşitlerinin peroksidaz (PRX) enzim aktivitesine etkileri.....	57
Şekil 4.13. Şok yüksek sıcaklık uygulamalarının R. Hope ve CG3 çilek çeşitlerinin peroksidaz (PRX) enzim aktivitesine etkileri.....	58
Şekil 4.14. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin prolin miktarı (µM/g TA).....	60
Şekil 4.15. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin toplam çözünebilir protein miktarı (mg/gTA).....	61
Şekil 4.16. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin SDS-PAGE protein profilleri.....	62
Şekil 4.17. Şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin SDS-PAGE protein profilleri.....	63
Şekil 4.18. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinde 23 kDa HSP 60 proteininin görünümü.....	63
Şekil 4.19. Şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinde 23 kDa HSP 60 proteininin görünümü.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.2.1. Spesifik enzim aktivitesinin belirlenmesi için BSA standartlarının hazırlanması.....	28
Çizelge 3.2.2. Spesifik enzim aktivitesinin belirlenmesi için örneklerin hazırlanması.....	28
Çizelge 3.2.3. Toplam çözünebilir protein miktarının belirlenmesi için BSA standartlarının hazırlanması.....	38
Çizelge 3.2.4. Toplam çözünebilir protein miktarının belirlenmesi için örneklerin hazırlanması.....	39

1. GİRİŞ

Çileğin tarihçesi Romalılara hatta eski Yunanlılara kadar inmekte, ancak tarımına ilişkin eski devirlere ait yazılı bir kaynak bulunmamaktadır. M.S. 1300 tarihleri civarında Avrupa'da çilek kültürünün yapıldığı, orman çileği olarak adlandırılan *Fragaria vesca* L.'nin ilk kültüre alınan çilek türü olduğu bildirilmiştir (Ağaoğlu 1986). *Fragaria ananassa* Duch. en çok yetiştiriciliği yapılan türdür, *Fragaria vesca* L. (Avrupa ve Kuzey Amerika'da) ve *F. moschata* (Avrupa'da) ise daha sınırlı alanlarda yetiştirilmektedir. Kültür çileği *Fragaria ananassa* Duch., *F. chiloensis* L. ve *F. virginiana* Miller melezi olup oktaploid ($2n=56$)'dir (Staudt 1989).

Rosaceae familyasında yer alan çilek (*Fragaria x ananassa*) üretimi, kaliteli ve verimli çeşitlerinin elde edilmesinden sonra ülkemizde ve dünyada giderek yaygınlaşmış ve büyük bir ekonomik öneme sahip olmuştur. Hem sanayi amaçlı hem de sofralık tüketime elverişli ve vitamince zengin bir meyve olması ve diğer meyve türlerinin az bulunduğu bir dönemde piyasaya sunulması üretimine olan talebi arttırmaktadır. Dünya çilek üretimi 2010 yılında toplam 4 366 662 ton olmuştur ve A.B.D. 1 292 780 ton ile üretimde ilk sırada yer almaktadır (<http://faostat.fao.org>, 2010). Ülkemiz çilek üretimi ise, 1975 yılında 16 000 ton iken, 2010 yılında 299 940 tona ulaşarak dünya üretiminde ikinci sırada yer almıştır. Türkiye'yi 275 300 tonluk üretimi ile İspanya takip etmektedir. Türkiye çilek üretiminin %59'unu Akdeniz, %19'unu Ege ve % 14'ünü Marmara Bölgesi karşılamaktadır (<http://tuik.gov.tr>, 2010).

Bitkiler, yaşadıkları çevrelerde gelişimlerini kısıtlayıcı değişik olumsuz koşullara maruz kalırlar. Yaşam için optimal olan koşullardan önemli sapmalar olarak açıklanan stres, organizmanın bütün fonksiyonel düzeylerinde değişiklikler meydana getirebilmektedir (Gürel ve Avcıoğlu 2004). Bitkiler üzerinde etki yapan stres faktörlerini kaynaklarına göre biyotik (fungus, bakteri, virüs, zararlılar v.b.) ve abiyotik (sıcaklık, su, radyasyon, kimyasal, manyetik v.b.) stres faktörleri olarak ayırmak mümkündür (Larcher 1995). Abiyotik stres faktörlerinden olan sıcaklık stresi; yüksek sıcaklık, üşüme (düşük pozitif sıcaklık) ve don (düşük negatif sıcaklık) stresi olarak üç tipe ayrılabilir. Bahçe bitkileri yetiştiriciliğinde, bir bölgede bitki tür veya çeşitlerinin yetiştirilmesini sınırlayan en

önemli faktörlerin başında sıcaklık gelmektedir. Son yıllarda artan küresel ısınma ile birlikte sıcaklık stresi, özellikle ılıman iklim bölgelerinde verim ve kuru madde oranı kayıplarının en önemli nedenleri arasında yer almaktadır (Levitt 1980, Giaveno ve Ferrero 2003, Wahid ve ark. 2007). İnsan aktiviteleri, atmosferde var olan karbondioksit, metan, kloroflorokarbon ve azot oksitler gibi sera gazlarının konsantrasyonunun artmasına neden olmakta, bu da küresel ısınmaya yol açmaktadır (Wahid ve ark. 2007). IPCC (Intergovernmental Panel on Climatic Change) 2012 raporuna göre; 21. yüzyılın ortalarına kadar küresel sıcaklığın 1-3°C artması, bu artışın 21. yüzyılın sonlarına doğru ise 2-5°C olacağı beklenmektedir.

Sıcaklık stresi genellikle, sıcaklığın belli bir süre bitki büyüme ve gelişmesinde geri dönüşümsüz zararlanmalara neden olan eşik seviyesinin üzerine çıkması olarak tanımlanır. Ortam sıcaklığının geçici olarak 10-15°C artması sıcaklık şoku ya da sıcaklık stresi olarak kabul edilir. Ancak, sıcaklık stresi, sıcaklığın yoğunluğuna (derece sıcaklık), süresine ve sıcaklık artış oranına bağlı karmaşık bir olaydır yani, uzun süreli daha az sıcaklık, kısa süreli yüksek sıcaklık kadar çok zarara yol açabilmektedir (Larcher 1995, Peet ve Willits 1998). Bitkilerde yüksek sıcaklıklara uyum sağlama sırasında ortaya çıkan değişikliklerin birçoğu geri dönüşümlü (reversible) olmalarına rağmen, daha sonra geri dönüşümsüz (irreversible) hale de gelebilirler (Çakırlar ve Topçuoğlu 1985, Lester 1985, Larcher 1995, Lichtenthaler 1996, Arora ve ark. 1998, Taiz ve Zeiger 1998, Saelim ve Zwiazek 2000).

Bitkilerin normal büyüme sıcaklıklarının üzerindeki sıcaklıklara maruz kalması hücre zarı yapısında geri dönüşümsüz değişikliklere ve kararsızlıklara neden olmaktadır. Yüksek sıcaklık stresi sırasında zar akışkanlığındaki değişiklikler, zar bileşenlerinin yeniden düzenlenmesi veya lipid içeriğindeki değişimlerden kaynaklanmaktadır (Yıldız ve Terzi 2007). Hücre zarı zararlanması, sıcaklığın tetiklediği oksidatif stresten meydana gelen reaktif oksijen türevlerinin (ROS) varlığından kaynaklanmaktadır (Kumar ve ark. 2007). Serbest radikaller ve diğer aktif oksijen türevleri biyolojik redoks tepkimeleri sonucu oluşurlar (Smirnoff 2005). ROS olarak bilinen süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri (OH^-), metabolizmanın oksijenle etkileşimi sonucunda oluşmaktadırlar. ROS'lar biyomoleküllerle tepkimeye girerek

oksidatif zararlanmalara neden olabilmektedirler. ROS'lar, enzimleri inhibe etmekte ve önemli hücre bileşenleri üzerinde zararlı etkileri bulunmaktadır ve bunların üretimi stres koşullarında oldukça artmaktadır (McKersie ve Lehsem 1994). Bitkiler ve diğer organizmalar, ROS'ların neden olduğu zararlanmayı azaltmak ve tamir edebilmek için zaman içinde çok çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bitkilerde moleküler savunma mekanizması çevresel stres faktörlerine adaptasyonun bir parçasıdır ve stres toleransının kazanılmasını sağlar (Peet ve Willits 1998).

Örneğin; stres koşullarında farklı bitki türleri şekerler ve şeker alkolleri (polioller), prolin, tersiyer ve kuaterner amonyum bileşikleri ve tersiyer sülfonyum bileşikleri gibi çeşitli ozmolitler biriktirirler (Sairam ve Tyagi 2004). Absisik asit (ABA) ve etilen (C₂H₄) gibi hormonlar stres sırasında sinyal moleküllerini harekete geçirerek birçok fizyolojik olayı düzenler (Larkindale ve Huang 2005). Ayrıca, yüksek sıcaklık stresi bitkilerde abiyotik strese karşı toleransta rol oynayan en önemli sekonder metabolitlerden fenolik bileşiklerin birikimine neden olur (Wahid ve Ghazanfar 2006, Wahid 2007). Bitkilerin strese karşı geliştirdiği diğer bir savunma sistemi de antioksidan savunma sistemidir (Foyer ve ark. 1994). Bitkilerdeki antioksidan savunma sistemi antioksidan molekül ve enzimlerden oluşmaktadır (Alscher ve ark. 1997). Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların karmaşık işbirliği sayesinde ROS'ların konsantrasyonunun kontrolü ve oksidatif zararlanmanın tamiri mümkün olmaktadır (Smirnoff 2005). Enzimatik savunma sistemi, süperoksit radikallerini H₂O₂'ye dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1), katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) ve H₂O₂'nin su ve oksijene dönüşümünü tetikleyen peroksidazları (PRX, EC 1.11.1.7) ve özellikle de askorbat peroksidazı (APX, EC 1.11.1.11) ve glutatyonun (GSH) yenilenmesini sağlayan glutatyon redüktazı (GR, EC 1.6.4.2) kapsamaktadır (Jeffrey 2002, Arora ve ark. 2002, Noctor ve Foyer 1998, Liu ve Huang 2000, Gülen ve Eriş 2004, Xu ve ark. 2006). Enzimatik olmayan antioksidan savunma sisteminde ise, askorbik asit (AsA), GSH, β-karoten ve α-tokopherol gibi antioksidan bileşikler toksik oksijen bileşiklerinin uzaklaştırılmasında önemli rol oynarlar (Hodges ve ark. 1996, Noctor ve Foyer 1998).

Abiyotik strese karşı başa çıkma yollarından biri de stres proteinlerinin sentezlenmesidir. Stres proteinlerinin pek çoğu suda çözünür olduğundan, hücresel

yapıların stres toleransına muhtemelen hidrasyon yoluyla katkıda bulunurlar (Wahid ve Close 2007). Stres koşullarında protein yapılarının ve fonksiyonlarının korunması hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi açısından çok önemlidir (Wang ve ark. 2004). Sıcaklık stresi, protein yapısı ve aktivitesi üzerinde de negatif bir etkiye sahiptir (Wery ve ark. 1993). Sıcaklık stresi sırasında özel bazı proteinlerin sentezlendiği bilinmektedir ve bu proteinler ısı şoku proteinleri (HSP'ler) olarak belirlenmiştir (Nakamoto ve Hiyama 1999). Bitkiler yüksek sıcaklıklara maruz kaldıklarında normal hücrel proteinlerde azalma olduğu, buna karşılık HSP'lerde ise artış olduğu belirlenmiştir. HSP'ler, birçok normal hücrel süreçte protein katlanması, montaj, translokasyon ve yıkımından sorumludur, stres koşullarında ise proteinlerin yeniden katlanmalarını ve denatürasyonlarını önlerler (Hartl 1996, Boston ve ark. 1996, Wang ve ark. 2004). Abiyotik stres koşullarına bitkilerin verdiği tepkiler ve abiyotik stres toleransları konusunda küçük ısı şoku proteinleri (sHSP) ailesi dışında, diğer HSP'lerin rolüne nispeten daha az odaklanılmıştır ve bu konudaki çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır (Wang ve ark. 2003, Burke ve ark. 2000, Burke 2001, Hong ve Vierling 2000, 2001; Hong ve ark. 2003).

Çilek bitkisi 10 ile 26°C'ler arasında optimum gelişme gösteren bir ılıman iklim bitkisidir (Ledesma ve ark. 2004). Ülkemizde çilek yetiştiriciliği açık alanlarda, seralarda ve plastik tünellerde yapılmakta ve bitkiler gelişimlerinin farklı dönemlerinde sık sık yüksek sıcaklıklara maruz kalmaktadırlar. Yüksek sıcaklığın gelecekte küresel iklim değişiklikleri ile birlikte pek çok bitki türünün yetiştiriciliğinde sınırlandırıcı bir faktör olacağı ön görülmektedir. Bu yüzden, bitkilerde türler ve hatta çeşitler bazında yüksek sıcaklık stresinin metabolizması üzerine araştırmalar gelecek için büyük önem taşımaktadır. Ancak pek çok bitki türünde olduğu gibi çilek bitkisinin de yüksek sıcaklığa toleransı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Wang ve Zheng 2001, Ledesma ve ark. 2004, Gülen ve Eriş 2003, 2004, Kadir ve ark. 2006, Wang ve Lin 2006).

Bitkilerde yüksek sıcaklık stresinde son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar genellikle antioksidan enzimler üzerine yoğunlaşmakla birlikte, çilek bitkisinde bu konuda yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu konuda 'Camarosa' çeşidinde yapılan bir

çalışmada bitkilere 30, 35, 40 ve 45°C'lik yüksek sıcaklıklar uygulanmış ve sıcaklık artışına bağlı olarak PRX aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Gülen ve Eriş 2004). Çilekte yapılan başka bir çalışmada 'Chandler' ve 'Sweet Charlie' çeşitlerinin net CO₂ asimilasyon hızının ve verimin sıcaklık artışıyla birlikte azaldığı belirlenmiştir (Kadir ve ark. 2006).

Ayrıca bitkilerde sıcaklık stresinin enzimatik olmayan antioksidanların değişimi, protein ve karbonhidrat mekanizması üzerine etkileri ile ilgili çok az bilgi mevcuttur. Çilekte 'Camarosa' çeşidinde yapılan çalışmalarda sıcaklık artışına bağlı olarak toplam protein miktarının ve toplam DNA'nın azaldığı belirlenmiştir (Gülen ve ark. 2003, 2004). Ledesma ve ark. (2004) 'Nyoho' ve 'Toyonaka' çeşitlerinde sıcaklık stresiyile birlikte pek çok protein içeriğinin azaldığını, buna karşılık yapraklarda 19-29 kDa aralığında çiçeklerde ise 16-26 kDa aralığında HSP'lerin ortaya çıktığını saptamışlardır. Ancak, mevcut bilgilerimize göre çilek bitkisinin yüksek sıcaklık stresine karşı geliştirdiği enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizması ile HSP'lerin rolü tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Son olarak Kesici (2009) tarafından yapılan çalışmada yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan 15 çilek çeşidinin sıcaklık stresi toleransları belirlenmiştir. Bu çeşitlerden El Santa ve Redlands Hope yüksek sıcaklığa göreceli olarak tolerant; Aromas, Ruby Gem ve Kabarla orta derecede tolerant; Festival ve Cal-Giant3 çeşitlerinin ise göreceli olarak daha hassas oldukları saptanmıştır. Yapılan bu tez çalışmasında ise, yüksek sıcaklığa hassas [Cal-Giant3 (CG3)] ve tolerant [Redlands Hope (R. Hope)] olan ve çilek çeşitleri kullanılarak, yüksek sıcaklıklara bağlı yaprak dokularında oluşan fizyolojik ve moleküler biyolojik değişimlerin belirlenebilmesi amacıyla bazı enzim ve ozmoregülanların etkinliği ve protein yapısındaki değişimler incelenmiştir. Yüksek sıcaklığa tolerans kazanılmasında etkili olabilecek HSP'ler araştırılarak çeşitler arasındaki genotipsel farklılıklar ortaya konulmuştur. Bu çalışmanın sonucunda elde edilen veriler çilek bitkisinde yüksek sıcaklık stresinin metabolik etkilerinin ortaya çıkarılmasını sağlayacağı gibi bitkilerde yüksek sıcaklığın fizyolojik mekanizmasının anlaşılmasına da katkıda bulunacaktır. Böylece bu konuda ileride yapılacak gen düzeyindeki biyoteknolojik çalışmalara temel oluşturarak, yüksek sıcaklık stresine toleranslı çeşitlerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu bölümde tez konusuyla ilgili olarak, yüksek sıcaklık stresi koşullarında antioksidan ve protein metabolizmasında meydana gelen fizyolojik ve moleküler biyolojik değişimlerle ilgili çilek bitkisinde sınırlı sayıda çalışmanın olması nedeniyle diğer türlerde yapılan çalışmalara da yer verilmiştir.

2.1. Hücresel Zararlanmanın Belirlenmesi

Bitki gelişimi; yüksek sıcaklık, tuzluluk ve kuraklık gibi çeşitli abiyotik stres koşullarından olumsuz etkilenmektedir (Berry ve Bjorkman 1980). Bitki büyüme ve gelişmesi ile verimini etkileyen en önemli faktörlerden biri de yüksek sıcaklıktır (Havaux 1993). Yüksek sıcaklık stresi, bitki metabolizmasında fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler bazı değişikliklere neden olmaktadır (Levitt 1980). Çok yüksek sıcaklıklarda, hücresel organizasyonun çöküşüne bağlı olarak birkaç dakika içerisinde çok ciddi hücresel zararlanmalar hatta hücre ölümü gerçekleşebilmektedir (Schöffl ve ark. 1999). Orta derecede yüksek sıcaklıklarda, yaralanma veya ölüm sadece uzun süreli maruz kalma sonrasında ortaya çıkmaktadır. Yüksek sıcaklıklar hücrede doğrudan proteinlerin denatürasyonuna, çökmesine ve membran lipidlerinde akışkanlığın artmasına; dolaylı olarak ise, kloroplast ve mitokondri enzimlerinin inaktivasyonuna, protein sentezinin engellenmesine, proteinlerde bozunma ve zar bütünlüğünün kaybına etki etmektedir (Howarth 2005). Yüksek sıcaklık, oksidatif stresi tetikleyerek (Gong ve ark. 1997), bitkilerde lipid peroksidasyonu sonucu zar hasarına, pigment ağarmasına ve DNA iplikçiklerinde bozulmalara neden olur (Anderson ve Padhye 2004, Imlay ve Linn 1988). Hücrede meydana gelen bu zararlanmalar, büyümenin engellenmesine, düşük iyon hareketliliğine, toksik bileşiklerin ve ROS'ların oluşumuna ve hatta sonuçta açlıktan ölümlere yol açabilir (Schöffl ve ark. 1999, Howarth 2005). Bitkilerde, ROS'ların neden olduğu zararlanmayı azaltmak ve tamir edebilmek için; enzimatik antioksidanlar, enzimatik olmayan antioksidanlar, proteinler, karbonhidratlar, lipitler, sekonder metabolitler ve hormonlardan oluşan çok çeşitli savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Çilek bitkisi 10 ile 26°C'ler arasında optimum gelişme gösteren bir ılıman iklim bitkisidir (Ledesma ve ark. 2004). Ülkemizde çilek yetiştiriciliği açık

alanlarda, seralarda ve plastik tünellerde yapılmakta ve bitkiler gelişimlerinin farklı dönemlerinde sık sık yüksek sıcaklıklara maruz kalmaktadırlar. Bu yüzden, bitkilerde türler ve hatta çeşitler bazında yüksek sıcaklık stresinin metabolizması üzerine araştırmalar gelecek için büyük önem taşımaktadır. Sıcaklık stresi konusunda yapılan çalışmalar genellikle düşük sıcaklık stresi konularında yoğunlaşmış olup, yüksek sıcaklıkla ilgili çalışmalara gereken önem verilmemiştir. Pek çok bitki türünde olduğu gibi çilek bitkisinin de yüksek sıcaklığa toleransı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Wang ve Zheng 2001, Ledesma ve ark. 2004, Gülen ve Eriş 2003, 2004, Kadir ve ark. 2006, Wang ve Lin 2006).

Bitkilerde sıcaklıkla ilgili strese karşı oluşan zararlanma oranını (hücre zarı zararlanması) belirlemek için “iyon sızıntısı testleri” (elektrisel iletkenlik) kullanılmaktadır (Eugenia ve ark 2003, Gusta ve ark. 2003). Bu test, zararlanmanın bir sonucu olarak ortaya çıkan hücre zarındaki fonksiyon bozuklukları nedeniyle sitoplazmadan apoplastik sıvıya sızan iyonların miktarının belirlenmesi prensibine dayanmaktadır (Eugenia ve ark 2003). Zar lipidlerinin serbest radikal kaynaklı peroksidasyonunun, hücresel düzeyde stres kaynaklı zararlanmanın bir yansıması olduğu bilinmektedir (Jain ve ark. 2001).

Hücrede normal koşullarda düşük miktarlarda bulunan H_2O_2 , bitki büyüme ve gelişmesi ile farklılaşması için gerekli olan çeşitli sekonder metabolitlerin biyosentezini başlatmaktadır. Normal koşullarda H_2O_2 'nin domates ve pirinçte sHSP'lerin (HSP 26) sentezini indüklediği, böylece abiyotik stres toleransında sinyal iletiminde önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir (Liu ve Shono 1999, Lee ve ark. 2000, Uchida, ve ark. 2002). Ancak stres koşullarında miktarının artması hücre için ölümcül olabilmektedir (Gaspar ve ark. 1985, McKersie ve Lehsem 1994). Bitkilerde H_2O_2 'nin detoksifikasyonu, hücrenin korunması ve hücresel sinyalizasyon için oldukça önemlidir (Dat ve ark. 2000, Mitler 2002). Bitkilerde H_2O_2 'yi etkisiz hale getiren en az beş enzim bulunmaktadır (askorbat peroksidazlar, katalazlar, glutatyon peroksidazlar, peroksiredoksinler ve tip III peroksidazlar). Bu enzimler AsA ve GSH gibi antioksidanlarla birlikte hücrede H_2O_2 'nin parçalanmasında görev alırlar (Noctor ve Foyer 1998).

Liu ve Huang (2000)'ın yaptığı araştırmada sıcaklığa tolerant (L-93) ve hassas (Pencross) çim (*Agrostis palustris* Huds.) bitkilerine iki farklı sıcaklık (22/16°C ve 35/25°C, gündüz/gece) uygulaması yapılmıştır. Bitkiler bu sıcaklık derecelerinde 56 gün boyunca yetiştirildikten sonra artan sıcaklık stresiyle birlikte iyon sızıntısı içeriğinde de artışlar saptanmıştır. İyon sızıntısının kontrole göre L-93'te 2 kat ve Pencross'ta 3 kat fazla olduğu görölmüştür.

Optimum gelişme sıcaklığı 25°C/15°C (gündüz/gece) olan lima fasulyesinde (*Phaseolus lunatus*) yapılan bir çalışmada bitkilere 37°C'de 4 - 12 saatlik alıştırma uygulaması yapıldıktan sonra 45°C'lik yüksek sıcaklık uygulanmıştır. Yüksek sıcaklık uygulamaları sonucunda alıştırma uygulaması yapılan bitkilerde hücrel zararlanmanın, alıştırma uygulaması yapılmayanlara göre daha az olduğu, ayrıca alıştırma süresi uzadıka hücrel zararlanmanın azaldığı belirlenmiştir (Keeler ve ark. 2000).

Biberde (*Capsicum annuum* L.) yapılan çalışmada bitkiler 24/20°C (gündüz/gece) sıcaklıkta yetiştirilmişlerdir. 8 haftalık bitkilere 15'er dakika 24, 48 ve 54°C'lik sıcaklıklar uygulanmıştır. Bu uygulamalar sonucunda bitkilerde yapılan analizlerde, iyon sızıntısının sıcaklık artışıyla birlikte arttığı saptanmıştır (Anderson 2002).

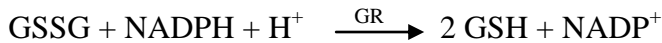
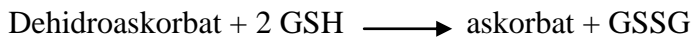
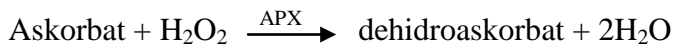
Uzun süreli yüksek sıcaklık uygulamalarının çilekteki (*Fragaria x ananassa* cv. Camarosa) etkisinin araştırıldığı çalışmada, fidelere 48 saat boyunca 30, 35, 40 ve 45°C'lik kademeli ve şok yüksek sıcaklık stresi uygulanmıştır. Yaprak oransal su kapsamı (%), turgor kaybı, klorofil içeriği ve sıcaklık stres toleransı (LT₅₀), kontrol ve stres uygulamalarında ölçölmüştür. Klorofil içeriği hariç diğer tüm parametrelerde kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarının etkileri önemli bulunmuştur. Sıcaklık derecesi artıka bitkilerin hücrel zararlanma oranları da artmıştır. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasındaki bitkilerin şok yüksek sıcaklık uygulamasına göre sıcaklık stres toleransında artış belirlenmiştir (Gölen ve Eriş 2003).

Yin ve ark. (2008) zambaklarda (*Lilium longiflorum* L.) yaptıkları çalışmada, sıcaklık stresi koşullarında artan O_2^- konsantrasyonuna bağlı olarak iyon sızıntısı ve MDA miktarının da arttığını tespit etmişlerdir.

2.2. Yüksek Sıcaklık Stresinde Antioksidan Savunma Mekanizması

2.2.1 Enzimatik olmayan antioksidanlar

Bitkinin antioksidan savunma sistemi içinde çeşitli antioksidan moleküller de bulunmaktadır (Foyer ve ark. 1994, Peet ve Willits 1998). AsA bitkilerin stres koşullarında toksik radikallere karşı kendisini korumak için kullandığı önemli antioksidanlardandır (Demming-Adams ve Adams 1996, Noctor ve Foyer 1998). AsA bitkilerin çoğu hücrelerinde, organellerde ve apoplastlarda tespit edilmiştir. Bitkilerin yapraklarında ve kloroplastların özellikle stromasında yoğunlaşmış olarak askorbat halinde redükte formda bulunur (Çaylak 2011). AsA, O_2^- 'i, H_2O_2 'yi ve OH^- 'ı doğrudan indirgeyebilme yeteneğindedir (Foyer, 1993). GSH stres durumunda oluşan serbest radikallerle reaksiyona girerek enzimlerin SH gruplarının okside olmasını önler. Ayrıca askorbat-glutatiyon döngüsüne katılarak askorbatın, dehidroaskorbattan rejenerasyonunu sağlar ve stresin oluşturabileceği hasarı gidermede rol oynar (Foyer, 1993). Askorbat- glutatiyon döngüsünün kloroplastların ve diğer hücrel birimlerin oksidatif stresten korunmasında önemli bir rolü bulunmaktadır. Oksidatif zararın sınırlanması ve normal sinyal iletimi veya metabolizma için gerekli olandan fazla ROS'ların yok edilmesinde bu antioksidan savunma sistemlerinin kapasitesi ve etkinliği oldukça önemlidir (Foyer ve ark. 1994). Askorbat-glutatiyon döngüsü aşağıdaki şekilde gerçekleşmektedir.



Redükte formdaki GSH, H₂O₂'nin bozulması sırasında oksitlenerek yükseltgenmektedir. Yükseltgenen glutatyon (GSSG) ise GR tarafından indirgenmekte ve GSH/GSSG dengesi korunmaktadır (Kocsy ve ark., 2003). Genellikle GSSG'nin yani metabolik olarak aktif formda iken, protein, sistein ve homosisteini muhafaza ettiği varsayılır (Rennenberg 1982).

Nieto-Sotelo ve Ho (1986) mısırdaki (*Zea mays* L.) yaptıkları çalışmada mısır köklerini değişen sürelerde 40°C'lik yüksek sıcaklık uygulamışlardır. Yüksek sıcaklık uygulaması yapılan bitkilerde GSH miktarının, yüksek sıcaklık uygulanmayan kontrol bitkilerine göre iki kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Artan GSH sentezinin sıcaklık stresi koşullarıyla başa çıkma kapasitesi ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Bezelye (*Pisum sativum* L.) bitkileri 42°C'lik yüksek sıcaklık uygulamasına maruz bırakılmıştır. Sıcaklık uygulamasından 30-60 dakika sonra GSH miktarında artışlar saptanmıştır (Kurganova ve ark., 1999).

Yüksek sıcaklık stresinin, dona tolerant ve hassas buğday (*Triticum aestivum* L.) genotiplerinde GSH sentezine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bitkiler 15/10°C (gündüz/gece) sıcaklıkta yetiştirildikten sonra bunlardan bir kısmına 7 gün boyunca 37°C'lik yüksek sıcaklık uygulanmıştır. Yüksek sıcaklığın dona hassas genotiplerde tolerat olan genotiplere göre daha az zararlanma yaptığı ve GSH seviyelerinin de sıcaklık stresi sırasında düştüğü tespit edilmiştir (Kocsy ve ark. 2004).

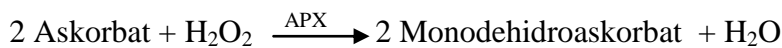
Yüksek sıcaklığa tolerat ve hassas olan kamışsı yumak (*Festuca arundinacea* cv. Barlexus) ve İngiliz çimi (*Lolium perenne* cv. Accent) bitkileri 22/16 °C'lik gündüz/gece sıcaklığında 14 gün yetiştirildikten sonra, bu bitkilerin yarısı sıcaklık alıştırmaları için 3 gün boyunca 30°C'lik sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Daha sonra bu bitkilere ve alıştırmaları yapılmayan diğer bitkilere 14 saatlik 38, 42 ve 46°C'lik yüksek sıcaklık uygulanmıştır. Sıcaklık stresi altında AsA ve GSH miktarının iki türde de azaldığı görülmüştür (Xu ve ark. 2006).

Yin ve ark. (2008) zambaklarda (*Lilium longiflorum* L.) yaptıkları bir çalışmada bitkilere 10 saat boyunca 37, 42 ve 47°C'lik yüksek sıcaklıklar uygulamıştır. Kontrol bitkileriyle kıyaslandığında (20°C) iyon sızıntısı ve MDA (Malondialdehide) konsantrasyonunun 37 ve 42°C'lerde hafifçe arttığını ancak 47°C'de artışın belirgin hale geldiğini tespit etmişlerdir. 37 ve 42°C'lerde 10 saatlik uygulama sonucunda AsA ve GSH konsantrasyonlarının yüksek seviyelerde olduğunu belirlemişlerdir. Ancak, 47°C'de 10 saatlik uygulamadan sonra GSH konsantrasyonunun kontrolle aynı olduğu AsA konsantrasyonunun ise O_2^- ve H_2O_2 artışına bağlı olarak kontrole göre düştüğünü bildirmişlerdir.

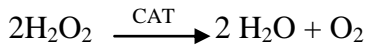
2.2.2. Antioksidan enzimler

Serbest radikaller ve diğer aktif oksijen türevleri biyolojik redoks tepkimeleri sonucu oluşurlar (Smirnoff 2005). ROS'lar, enzimleri inhibe etmekte ve önemli hücre bileşenleri üzerinde zararlı etkileri bulunmaktadır (McKersie ve Lehem 1994). Ayrıca proteinlerin oksidasyonunu ve karbonil gruplarının kümelenmelerini katalizler ve bunları proteazlar tarafından parçalanmak üzere işaretlerler (Stadtman 1992). Toksik oksijen türevlerinin üretimi stres koşullarında oldukça artmaktadır. Bitkiler ve diğer organizmalar, zaman içinde bu problemle mücadele ederek çok çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir (Foyer ve ark. 1994, Hodges ve ark. 1996, Alscher ve ark. 1997, Peet ve Willits 1998, Noctor ve Foyer 1998, Sairam ve Tyagi 2004, Larkindale ve Huang 2005, Wahid ve Ghazanfar 2006, Wahid 2007). Bu savunma mekanizmalarından biri antioksidan savunma sistemidir. Bitkilerdeki antioksidan savunma sistemi antioksidan molekül ve enzimlerden oluşmaktadır (Alscher ve ark. 1997).

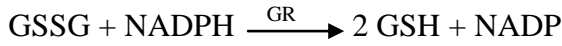
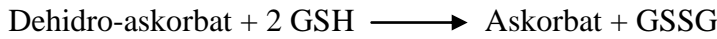
APX, bitkilerde ve alglerde bulunmakta ve substratın azaltılmasında hücre tarafından askorbik aside göre daha çok tercih edilmektedir (Asada ve Takahashi 1987, Raven 2003). APX, yüksek bitkilerin kloroplastlarında SOD tarafından üretilen H_2O_2 'nin ortadan kaldırılmasında aktif olan önemli bir enzimdir (Asada 1992). APX tepkimeyi aşağıdaki gibi katalizlemektedir (Foyer ve Halliwell 1976, Asada ve Takahashi 1987).



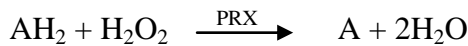
CAT'lar aerobik organizmalarda sık rastlanan enzimlerdendir. O_2^- ve H_2O_2 mitokondri ve kloroplastlarda fotosentez ve solunum olaylarındaki elektron taşıma sistemi sırasında oluşurlar. Fotosentetik bitki hücrelerinde yüksek miktarlarda H_2O_2 üretimi gerçekleşmektedir. Kloroplastlarda H_2O_2 miktarının $80-160 \mu M s^{-1}$ olduğu tahmin edilmektedir (Asada 1992). CAT'lar H_2O_2 'yi oksijen ve suya dönüştürmektedir.



GSH, disülfid indirgeyici olarak enzimlerin tiyol gruplarını korur, askorbatı yeniler ve O_2^- ve OH^- radikalleriyle reaksiyona girer. Bazı tepkimelerde GSH, glutatyon disülfite (GSSG) oksitlenir. GSH, NADPH'a bağlı reaksiyon olarak GR tarafından yenilenir (Arora ve ark. 2002).



PRX'ler, H_2O_2 'yi kullanarak fenoller ve hidrokinonlar gibi çok sayıda aromatik bileşenlerin dehidrojenasyonunu katalizleyen enzimlerdir (Bergmeyer ve Grabl 1983). Çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahip olan PRX'ler, bitkilerde yüksek oranlarda bulunmaktadır. PRX'ler, elverişsiz dış faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenleyerek SOD ve CAT'larla birlikte bitki hücresinin koruyucu enzim kompleksinin parçasını oluştururlar (Bakardjieva ve Christov 1996). PRX'ler H_2O_2 'nin parçalanmasını aşağıdaki şekilde katalizler.



Bitkilerde bu reaksiyonlar sonucu, PRX'ler hücre için toksik olan H_2O_2 'nin kontrolünü sağlayarak hücre duvarının yapısına katılmasını sağlar. Asidik PRX'lerin hücre duvarı ve lignin oluşumundan, bazik PRX'lerin ise diğer PRX'ler için H_2O_2 oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Walter 1992). PRX'lerin çok çeşitli izoelektrik

noktalarına sahip ve pek çok işlevleri bulunan spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimleri bulunur (Huystee 1987, Odabaşoğlu 1998). Gülen ve Eriş (2004) tarafından yapılan bir çalışmada sıcaklık stresi koşullarında çilek yapraklarında ligninleşme ve hücre zarı zararlanmasının onarımından sorumlu bazik bir izoperoksidaz bandı ($R_f=0,22$) saptanmıştır. 15 farklı zeytin çeşidinde yapılan bir çalışmada ise, soğuk stresine toleranstan sorumlu, farklı bant yoğunluklarına sahip asidik PRX bantların varlığı tespit edilmiştir (Cansev ve ark., 2005). Fiziksel, kimyasal ve biyolojik stresin değişikliğine tepki olarak bitkilerde PRX'lerin aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Kim ve ark., 2000).

Patates (*Solanum tuberosum* L.) bitkilerine *in vitro*'da beş hafta boyunca 35°C yüksek sıcaklık uygulanmıştır. Yüksek sıcaklık uygulaması ile birlikte kontrol bitkilerine göre CAT aktivitesi azalırken, H₂O₂ miktarı daha yüksek bulunmuştur (Lopez-Delgado ve ark. 1998).

Bezelye (*Pisum sativum* L.) bitkileri 42°C'lik yüksek sıcaklık uygulamasına maruz bırakılmıştır. 30-60 dakikalık sıcaklık uygulamasından sonra bitkilerin SOD ve GR aktivitesinde artış olduğu saptanmıştır (Kurganova ve ark., 1999).

Sıcaklığa tolerant (L-93) ve hassas (Pencross) iki çim bitkisi (*Agrostis palustris* Huds.) 56 gün boyunca 22/16°C (kontrol) ve 35/25°C'de (yüksek sıcaklık) (gündüz/gece) yetiştirilmişlerdir. Yüksek sıcaklık stresinde SOD aktivitesinin Pencross'ta L-93'e göre daha az olduğu bulunmuştur. CAT aktivitesinin iki çeşitte de 14, 28, 42 ve 56. günlerde giderek belirgin bir şekilde azaldığı ve Pencross'ta L-93'e göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. PRX aktivitesinin ise 14 ile 56. günler arasında arttığı ve Pencross'ta aktivitenin daha yoğun olduğu belirlenmiştir (Liu ve Huang 2000).

Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) üç farklı genotipte yapılan bir araştırmada (C 306, HD 2285 ve HD 2329) geç ekimle birlikte artan sıcaklıklar bütün genotiplerde AsA miktarının düşmesine ve H₂O₂ miktarının artmasına neden olmuştur. SOD ve CAT

aktivitesi HD 2285’te en yüksek, HD 2329’da en düşük bulunurken, PRX aktivitesinin en yüksek olduğu genotip C 306 olarak tespit edilmiştir (Sairam ve ark. 2000).

Uzun çayırotu (*Festuca arundinaca* L.) ve mavi çimde (*Poa pratensis* L.) bitkiler 35/30°C’lik (gündüz/gece) yüksek sıcaklıklara maruz bırakılmış, kontrol bitkileri ise 20/15°C’lik (gündüz/gece) sıcaklıkta yetiştirilmişlerdir. Yüksek sıcaklık koşullarında her iki çim türünde de SOD aktivitesi artarken, CAT, APX ve GR aktiviteleri azalmıştır (Jiang ve Huang 2001).

Chaitanya ve ark. (2001) dutta (*Morus alba* L.) üç farklı çeşitte (cv. K-2, MR-2 ve BC2-59) yapmış oldukları bir çalışmada 120, 240 ve 360 dakika boyunca bitkilere uygulanan 40°C’lik yüksek sıcaklık sonucunda SOD, CAT, APX ve GR enzim aktivitesinin sıcaklık artışına bağlı olarak arttığını ortaya koymuşlardır.

Biberde (*Capsicum annuum* L.) yapılan çalışmada bitkiler 24/20°C (gündüz/gece) sıcaklıkta yetiştirilmişlerdir. Daha sonra bitkiler 24 saat boyunca, 38/30°C (gündüz/gece)’ye alınarak yüksek sıcaklıklara alıştırmışlardır. 8 haftalık bitkilere 15’er dakika 24, 48 ve 54°C’lik sıcaklıklar uygulanmıştır. Bu uygulamalar sonucunda bitkilerde yapılan analizlerde, CAT aktivitesinin azaldığı, APX aktivitesinin ise sıcaklıkla birlikte önce arttığı daha sonra azaldığı, H₂O₂ miktarının ise sıcaklık uygulamalarından etkilenmediği saptanmıştır (Anderson 2002).

Rivero ve ark. (2003) domates (*Lycopersicon esculentum* L. cv. RX-335) ve karpuz (*Citrullus lanatus* Mansf. c.v. F-90) bitkilerini 10, 25 ve 30°C’lik sıcaklıklarda 30 gün boyunca yetiştirmişlerdir. Domateste H₂O₂ miktarı 25°C’de en düşük, 35°C’de ise en yüksek düzeylerde bulunurken, karpuzda ise sıcaklık arttıkça miktar azalmıştır. CAT aktivitesi her iki türde de 25°C’de en yüksek, 35°C’de ise en düşük bulunmuştur.

Gülen ve Eriş (2004) ‘Camarosa’ çilek (*Fragaria x ananassa*) çeşidinde yaptıkları çalışmada kademeli ve şok yüksek sıcaklık stresinin PRX aktivitesi ve yaprak proteinleri üzerine etkisinin belirgin olduğunu saptamışlardır. Yüksek sıcaklık uygulamasına bağlı olarak PRX aktivitesinin arttığı, ancak toplam protein içeriğinin

azaldığı belirlenmiştir. Kademeli yüksek sıcaklık stresine maruz kalan bitkiler, şok yüksek sıcaklık stresine göre daha fazla PRX aktivitesi göstermiştir.

Yüksek sıcaklık stresinin, dona tolerant ve hassas buğday (*Triticum aestivum* L.) genotiplerinde glutatyon sentezine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bitkiler 15/10°C (gündüz/gece) sıcaklıkta yetiştirildikten sonra bunların bir kısmına 7 gün boyunca 37°C'lik yüksek sıcaklık uygulanmıştır. Yüksek sıcaklığın dona hassas genotiplerde tolerant olan genotiplere göre daha az zararlanma yaptığı ve GR aktivitesinin dona hassas genotiplerde tolerant olanlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Kocsy ve ark. 2004).

Buğday genotiplerinde (PBW 343, PBW 175, HDR-77, HD285 ve HD 2865) yüksek sıcaklık stresinin antioksidan enzim aktivitesine etkileri araştırılmıştır. Bitkilerde farklı sıcaklık rejimleri oluşturmak amacıyla farklı zamanlarda ekim yapılmıştır (normal: kasım, geç: aralık ve çok geç: ocak). APX aktivitesinin geç ve çok geç ekimlerde bütün çeşitlerde ve bitki gelişme dönemlerinin bütün aşamalarında belirgin bir artış gösterdiğini tespit etmişlerdir (Almeselmani ve ark. 2006).

Sıcaklık stresine farklı hassasiyetteki iki saz (*Phragmites communis* Trin.) ekotipinin (kum sazi [DR] ve bataklık sazi [SR]) kalluslarında yapılan bir çalışmada, sıcaklık stresine karşı bitkilerin uyum sağlamaları konusu araştırılmıştır. Olgun tohumlardan elde edilen embriyogenik kalluslar 4 aylık bir alt kültür döneminden sonra Murashige ve Skoog ortamına alınmışlardır. Daha sonra 2 saat boyunca 45°C'lik sıcaklığa maruz bırakılan (kontrol 25°C) kalluslarda iyon sızıntısı miktarları DR'de daha az, SR'da daha fazla olarak belirlenmiştir. Yüksek sıcaklık stresinde DR kalluslarında APX, SOD ve CAT aktivitesi daha yüksek bulunurken, SR kalluslarında daha düşük bulunmuştur. PRX aktivitesi de DR'de artarken SR'de azalmıştır (Song ve ark. 2006).

Guo ve ark. (2006) Satsuma mandarini (*Citrus unshiu* Marc.) ve Navel portakalında (*Citrus sinensis* Osbeck) yaptıkları çalışmada, bitkileri 25°C'de kontrollü koşullarda yetiştirdikten sonra bunlardan bir kısmını alarak 15 gün boyunca 38°C yüksek sıcaklık koşullarında yetiştirmişlerdir. Daha sonra bitkiler 10 gün boyunca tekrar 25°C'ye

alınarak geri kazanımları (recovery) sağlanmıştır. Yüksek sıcaklık koşullarında O_2^- üretimi ve H_2O_2 konsantrasyonu artmış ancak, bu artış geri kazanım koşullarında ortadan kaybolmuştur. Antioksidan enzimlerden SOD, CAT, APX ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) aktiviteleri yüksek sıcaklık koşullarında özellikle 15. günde satsuma mandarinlerinde Navel portakalına göre daha yüksek bulunmuştur. SOD aktivitesi de yüksek sıcaklıkla artmasına rağmen türler arasında farklılık bulunamamıştır.

Yüksek sıcaklığa tolerant ve hassas olan çayırotu (*Festuca arundinacea* cv. Barlexas) ve karaçayır (*Lolium perenne* cv. Accent) bitkileri 22/16 °C'lik (gündüz/gece) sıcaklıkta 14 gün yetiştirildikten sonra, bu bitkilerin yarısı sıcaklık alıştırmaları için 3 gün boyunca 30°C'lik sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Daha sonra bu bitkiler ve alıştırmaları yapılmayan diğer bitkilere 14 saatlik 38, 42 ve 46°C'lik yüksek sıcaklık uygulanmıştır. Her iki bitki türünde ROS'lardan H_2O_2 ve O_2^- 'in sıcaklık artışıyla birlikte arttığı gözlemlenmiştir. Çayırotu bitkisinde ROS'ların birikiminin karaçayır bitkisine göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir, bununla birlikte H_2O_2 miktarının iki türde de sıcaklık alıştırmaları yapılanlarda yapılmayanlara göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Xu ve ark. 2006).

Zambaklarda (*Lilium longiflorum* L.) yapılan bir çalışmada bitkiler 10 saat boyunca 37, 42 ve 47°C'lik sıcaklıklara maruz bırakılmışlardır. Kontrol (20°C) bitkileriyle kıyaslandığında iyon sızıntısı ve MDA miktarının 37 ve 42°C'lerde hafifçe arttığı ancak 47°C'de artışın belirgin hale geldiği tespit edilmiştir. 37 ve 42°C'lerde 10 saatlik uygulama sonucunda SOD, APX, CAT, PRX ve GR gibi bazı antioksidan enzim aktivitelerinin uyarıldığı ve AsA ve glutatyon GSH konsantrasyonlarının da yüksek seviyelerde olduğu belirlenmiştir. Ancak, 47°C'de 10 saatlik uygulamadan sonra SOD, APX, GR aktivitesinin ve GSH konsantrasyonunun kontrolle aynı olduğu; PRX ve CAT aktivitesi ile AsA konsantrasyonunun ise O_2^- ve H_2O_2 artışına bağlı olarak kontrole göre düştüğü görülmüştür (Yin ve ark. 2008).

He ve Huang (2010), mavi çimde yaptıkları çalışmada (*Poa pratensis*) 'Eagleton' (tolerant) ve 'Brilliant' (hassas) çeşitlerine ait bitkilere iklim kabininde 28 gün boyunca 20 °C (kontrol) ve 40 °C sıcaklık uygulamışlardır. 28. gün sonunda 40°C'de SOD aktivitesinin Eagleton çeşidinde Brilliant çeşidine göre belirgin bir şekilde daha yüksek

olduğunu, ancak CAT aktivitesinin ise Brilliant'ta artarken, Eagleton'da değişmediğini belirlemişlerdir.

Pamuk bitkileri (*Gossypium hirsutum* L.) 2 saat boyunca 30°C (kontrol)'de tutulduktan sonra sıcaklık kademeli olarak (her 10 dakikada bir 1°C) artırılarak 38°C (orta sıcaklık)'ye getirilmiş ve bu sıcaklıkta da bitkiler 2 saat tutulmuştur. Daha sonra 1 saat 45 dakikalık süre içerisinde sıcaklık yine kademeli olarak artırılarak 45°C (yüksek sıcaklık)'ye getirilmiş ve bitkiler bu sıcaklığa da 2 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Uygulamalar sonucunda CAT aktivitesinin 45°C'de, PRX aktivitesinin 38°C'de ve APX aktivitesinin ise 38 ve 45°C'de arttığı tespit edilmiştir (Gür ve ark., 2010).

Yüksek sıcaklığa hassas (PBW343) ve tolerant (C306) iki buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşidinin tohumları 22°C'de çimlendirildikten sonra, 7 günlük fidelere 2'şer saatlik 22, 30, 35 ve 40 °C'lik yüksek sıcaklıklar uygulanmıştır. Her iki çeşitte de sıcaklık şokuna tepki olarak birçok yeni proteinin ifade olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda C306'da sekiz, PBW343'te iki farklı APX izoenzim aktivitesi saptanmıştır (Kumar ve ark., 2011).

Tıbbi bitki olan *Scutellaria baicalensis* fideleri 25 ve 40°C'lik sıcaklıklarda büyütülmüşlerdir. 24 gün sonra 40°C'de SOD aktivitesinin, 24 ve 26. günlerin sonunda da CAT aktivitesinin 40°C'de kontrole göre düştüğü tespit edilmiştir. PRX aktivitesinin de 40°C'de 24 gün sonunda düştüğü, ancak bitkiler normal sıcaklık koşullarına getirildiğinde aktivitenin tekrar arttığı gözlenmiştir (Yuan ve ark., 2011).

Buğday (*Triticum aestivum* L.) bitkilerine sıcaklık her 10 dakikada 1°C artırılarak 2'şer saat 30, 35 ve 40°C'lik yüksek sıcaklıklar uygulanmıştır. Uygulama sonucunda en yüksek SOD ve CAT aktivitesi sırasıyla 35 ve 40 °C'lik yüksek sıcaklık uygulamalarında gözlenmiştir (Kumar ve ark., 2012).

2.3. Yüksek Sıcaklık Stresinde Protein Metabolizması

Prolinin hücrede koruyucu görevleri olup, osmotik dengenin ayarlanmasında, hücre altı yapıların korunması ile serbest radikallerin uzaklaştırılmasında enzim ve zar bütünlüğü üzerine olumlu etkileri bulunmakta ve dolayısıyla bir aminoasit olarak strese toleransta önemli rolü bulunmaktadır (Srinavas ve Balasubramanian 1995, Mani ve ark. 2002, Ashraf ve Foolad 2007). Stres koşullarında yetiştirilen bitkilerde yüksek miktarlarda prolin sentezlenmektedir (Holmstrom ve ark. 1996, Öztürk ve Demir 2002).

Stres koşullarında pek çok bitki türünde prolin birikimi stres toleransı ile alakalı olduğu ve genellikle birikimin strese tolerant olan bitkilerde hassas olanlara karşı daha fazla olduğu bildirilmekle beraber bazı çalışmalar stres koşullarındaki konsantrasyon artışının bir ürün olduğunu ve strese adaptasyonla ilgisi olmadığını belirtmektedir (Ashraf ve Foolad 2007). Prolinle ilgili çalışmalar özellikle tuz ve kuraklık stresi üzerine yoğunlaşmıştır. Örneğin, *Agrostis stolonifera*'nın tuza tolerant ekotiplerinde prolin birikiminin tuza hassas ekotiplerine göre daha fazla olduğu, benzer şekilde hardalda (*Brassica juncea*) yapılan *in vitro* çalışmada tuza adapte olan kalluslarda tuz stresi uygulanmayan kalluslara göre daha fazla serbest prolin birikimi olduğu bildirilmiştir (Ahmad ve ark. 1981, Madan ve ark. 1995). Kuraklık stresine maruz bırakılan pirinç bitkilerinde yapraklarda prolin birikiminin arttığı tespit edilmiştir (Hsu ve ark. 2003). Yüksek sıcaklıkla ilgili olarak Chaitanya ve ark. (2001) dutta (*Morus alba*) yaptıkları çalışmada yapraklarda yüksek sıcaklıkla birlikte prolin birikiminin kontrol koşullarına göre 1,5 kez arttığını bildirmişlerdir.

Yüksek sıcaklığa adaptasyon konusunda ileri sürülen hipotezlerden biri de, protein teşviki ve farklılaşmış protein fonksiyonunu kapsayan bazı adaptasyon mekanizmalarının varlığıdır (Teeri 1980). Bitkiler optimumun dışında kalan sıcaklıklara maruz kaldıklarında, normal hücresel proteinler azalmakta ve HSP'lerin sentezi artmaktadır (Vierling 1991, Parsell ve Lindquist 1993, Gülen ve Eriş 2004). Bitkiler yüksek sıcaklıklara maruz kaldıktan ve sinyallerin algılanmasından hemen sonra, moleküler düzeyde değişiklikler meydana gelir, gen ifadesi değiştirilerek stres tolerans stratejisi olarak stresle ilişkili proteinlerin sentezi gerçekleştirilir (Iba 2002). Bu

bağlamda HSP sentezi, bitkilerin stresle başa çıkma yollarında önemli bir rol oynamaktadır. Geçtiğimiz yıllarda HSP'lerin biyokimyasal fonksiyonları hakkında birçok detay ortaya çıkarılmıştır (Baniwal ve ark. 2004). Moleküler ağırlıkları 10 ila 200 kDa arasında değişen HSP'lerin, şaperon benzeri fonksiyonları bulunmaktadır (Schöffl ve ark. 1999, Lee ve Vierling 2000). Optimum veya kötü gelişme koşullarında hücrel dengenin sağlanmasında, moleküler şaperonlar anahtar bileşenlerdir. Bunlar proteinlerin katlanmasından, hücre içi dağılımlarından, alt ünitelerinin bir araya getirilmesinden, normal hücrel süreçte translokasyon ve yıkımlarından; ayrıca, stres koşulları altında protein ve zarların dengelenmesinden ve proteinlerin tekrar katlanmasından sorumludurlar. Moleküler şaperonların birçoğu stres proteinleridir ve bunlar HSP'ler olarak tanımlanmışlardır (Lindquist 1986, Lindquist ve Craig 1988, Forreiter ve Nover 1998, Ellis 2000). Ökaryotlar tarafından sentezlenen HSP'ler altı ana grupta toplanmaktadır. Bunlar; HSP 100, HSP 90, HSP 70, HSP 60, yaklaşık 17-30 kDa moleküler ağırlığındaki küçük HSP'ler (sHSP) ve ubiquitinden (8,5 kDa) oluşan protein aileleridir (Lindquist 1986, Waters ve ark. 1996, Vierling 1997). HSP 100 ailesindeki proteinler genellikle proteinlerin denatürasyonu sonucu toplanarak çökmelerinin engellenmesinden sorumludurlar (Wang ve ark. 2004). *Arabidopsis*'te sıcaklık stres toleransında HSP 104'ün önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Burkee 2001). HSP 90 ailesinin başlıca görevi protein katlanmasını yönetmektir, fakat ayrıca sinyal iletim ağında, hücre döngüsü kontrolünde, proteinlerin yıkımında da görev alırlar. HSP 90'lar birçok organizmada sentezlenmelerine rağmen miktarları sıcaklık stresinde artmaktadır (Wang ve ark. 2004). HSP 70'lerin sentezi sıcaklık şokunda artmakla birlikte stressiz koşullarda da temel görevleri bulunmaktadır. HSP 70'ler ATP'yi ve katlanmamış veya kısmen denatüre olmuş proteinleri bağlarlar (Hartl ve ark., 1992). HSP 60'lar yaklaşık 60 kDa ağırlığındaki şaperonlardır ve protein katlanmasına ve alt ünitelerinin bağlanmasına yardımcı olurlar (Nover ve ark. 1989). Bitkilerin somatik dokularında bulunan 17-30 kDa'luk bitkilere özgü sHSP'ler HSP'lerin en yaygın bulunan gruplarından. sHSP'lerin bolluğu ve heterojenliği bunların eşsiz fizyolojik fonksiyonlara sahip olabileceğini düşündürmektedir (Vierling ve Nguyen 1992).

Lin ve ark. (1984) yaptıkları çalışmada, soya fasulyesi (*Glycine max*) fidelerini 28°C'lik kontrol sıcaklığında yetiştirdikten sonra 40°C'lik yüksek sıcaklık uyguladıklarında

bitkilerde normal protein sentezinin azaldığını, buna karşılık HSP sentezinin arttığını bildirmişlerdir.

Tahıllarda yapılan çalışmada (*Triticum aestivum* L., *Triticum durum* Desf., *Hordeum vulgare* L., *Secale cereale* L. ve *Secale triticale*) 40°C'lik sıcaklık uygulamasından sonra kontrol sıcaklığında görülen bazı protein bantlarına ilaveten 13 farklı protein bandı saptanmıştır (Necchi ve ark. 1987).

Bezelyede (*Pisum sativum*) yapılan çalışmada 34, 36, 38 ve 40°C'lik yüksek sıcaklıklar uygulanmıştır. Sıcaklık derecesi arttıkça yapraklarda HSP 21 ve HSP 70 proteinin arttığı saptanmıştır. Daha sonra bitkiler kontrol sıcaklıklarına alındıklarında, bu proteinler 50 saatlik yarılanma ömründen sonra yok olmuşlardır. Yarılanma ömürlerinin bu kadar uzun süreli olması bu proteinlerin geri kazanım sürecinde de önemli rolleri olabileceğini göstermektedir (Chen ve ark. 1990).

Mısırda (*Zea mays* L.) 42°C'de 4 saatlik yüksek sıcaklık uygulamasından sonra HSP70 proteininin sentezinde bir artış olmadığı, buna karşılık HSP 22 proteininin sentezinde önemli derecede bir artış olduğu bildirilmiştir (Lund ve ark 1998).

Domateste (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv UC82B) yapılan bir çalışmada bitkiler 25/18°C gündüz/gece sıcaklığında yetiştirildikten sonra sıcaklık kademeli olarak 2 saatte bir 1°C arttırılarak 42°C'ye getirilmiş ve bu sıcaklıkta bitkiler 6 saat tutulmuştur. Daha sonra sıcaklık tekrar kademeli olarak düşürülerek normal koşullara getirilmiştir. Sıcaklık stresinin, kloroplastlarda küçük molekül ağırlıklı HSP'lerinin sentezini arttırdığı belirlenmiştir (Heckathorn ve ark. 1998).

Keeler ve ark. (2000) lima fasulyesine (*Phaseolus lunatus*) yaptıkları çalışmada 37°C'lik yüksek sıcaklığa maruz kalan bitkilerde HSP 100/ClpB protein sentezinin arttığını belirlemişlerdir. HSP'lerin zar proteinlerinin stabilitesini arttırarak zar bütünlüğünü koruduğu, bu şekilde stres sırasında iyon sızıntısı miktarını da azalttığı düşünülmektedir (Swan 1997, Keeler 2000).

Kumar ve ark. (2003)'nin yaptığı araştırmada ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) bitkilerine değişen sürelerle (1, 2 ve 3 saat) 49, 50, 51 ve 52°C'lik yüksek sıcaklıklar uygulamışlardır. Sıcaklık uygulamaları sonucunda bitkilerde HSP 90 ve HSP 104 proteinlerinin yüksek miktarlarda sentezlendiğini tespit etmişlerdir.

Uzun süreli yüksek sıcaklık uygulamalarının çilekteki (*Fragaria x ananassa* cv. Camarosa) etkisinin araştırıldığı çalışmada, fidelere 30, 35, 40 ve 45°C'lik kademeli ve şok yüksek sıcaklık stresi 48 saat süresince uygulanmıştır. Toplam protein ve DNA içerikleri sıcaklık stresi uygulamaları ve sıcaklık artışı ile önemli değişiklik göstermiştir. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasındaki bitkilerin şok yüksek sıcaklık uygulamasına göre sıcaklık stres toleransında artış belirlenmiştir, bunun sebebinin de muhtemelen kademeli sıcaklık uygulamasındaki sıcaklık stresiyle ilgili bazı proteinlerin sentezlenmesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Gülen ve Eriş 2003).

Ledesma ve ark. (2004) 'Nyoho' ve 'Toyonaka' çilek (*Fragaria x ananassa* Duch.) çeşitlerine 4 saatlik 20, 23 ve 42°C'lik sıcaklıklar uygulamışlar ve yaprak ve çiçeklerin protein yapılarını incelemişlerdir. Yapılan bu çalışmada yaprak ve çiçek dokularında her iki çeşitte de sıcaklık stresiyle birlikte pek çok protein içeriğinin azaldığı, buna karşılık sıcaklık stresine tepki olarak bazı yeni proteinlerin ortaya çıktığı saptanmıştır. Bu proteinlerin yapraklarda 19-29 kDa aralığında çiçeklerde ise 16-26 kDa aralığında HSP'ler olduğu tespit edilmiştir. Her iki çeşitte de PeaHSP17.7 antikoru kullanılarak, yapraklarda yaklaşık 26 kDa'luk ve çiçeklerde ise yaklaşık 16 kDa ve 17 kDa'luk iki bant tespit edilmiş ve sıcaklık stresinin çilekte HSP sentezine etkilerinin çeşitlere ve bitki organlarına göre farklılık gösterebileceğini belirmişlerdir.

Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) tolerant (HD2285) ve hassas (WH542) çeşitlerde yapılan çalışmada bitkiler 2'şer saat 15, 25, 35 ve 45°C'lik sıcaklıklara maruz bırakılmışlardır. HD2285 çeşidinin HSP 100 içeriği bütün sıcaklık derecelerinde WH542 çeşidine göre daha yüksek bulunmuştur bununla birlikte her iki çeşitte de HSP 100 içeriğinde sıcaklık derecelerine göre artış saptanamamıştır (Sumesh ve ark. 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma, 2009-2012 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nün Örtüaltı Araştırma ve Uygulama Ünitesi ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Araştırmada yüksek sıcaklığa hassas ve tolerant oldukları önceki çalışmalarla belirlenen Cal Giant3 (CG3) ve Redlands Hope (R. Hope) çeşitleri kullanılmıştır (Kesici 2009). Bu çeşitlerin özellikleri kısaca şöyledir:

CG3: Kaliforniya'da geliştirilen kısa gün çeşididir ve birçok uluslar arası lokasyona uyum sağlamıştır. Meyveler düzgün konik şekilli ve parlaktır. Meyve verim süresi ilkbahar, yaz ve sonbahar aylarına kadar uzanır. Soğuk havalarda bile tozlaşma sağlanabilmektedir. *Verticillium* solgunluğu, *Phytophthora* çürüklüğü ve antraknoza dayanıklıdır (Okie 2004).

R. Hope: Orijini Avustralya'dır. Kısa gün çeşididir ve erkencidir. Yazlık dikime uygundur. Meyveleri konik şekilli, orta parlaklıkta, kırmızı portakal renktedir meyve eti serttir. Akdeniz, Ege, Karadeniz ve Marmara Bölgesi'nde yetiştiriciliği önerilmektedir (Özdemir ve ark. 2007).



CG3



R. Hope

Şekil 3.1. Çilek çeşitlerine ait bitkilerin genel görünümü

Çeşitlere ait frigo fideler alınarak serada perlit, torf ve elenmiş bahçe toprağı karışımı (1:1:1) içeren ortama 14×12 cm çapındaki saksılara dikilmiştir. Bitkilerin düzenli olarak bakımları yapılmış ve haftada bir Actagro Seven (7:7:7) (Actagro LLC, Biola, CA, USA) ticari gübresi ile gübrenmiştir. Bitkilerin yetiştirildiğı ortamda gündüz/gece sıcaklığı 30/15°C, ortalama oransal nem % 65 ve ortalama güneşlenme şiddeti 405 cal/cm² olarak ölçülmüştür.

3.2. Yöntem

3.2.1. Yüksek Sıcaklık Uygulamaları

Dikimden yaklaşık iki ay sonra bitkiler 5-6 gerçek yapraklı aşamada iken, çeşit özelliğini temsil eden ve gelişimini tamamlamış yaprak örnekleri alınarak zaman kaybetmeden buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen yaprak örnekleri kapaklı polikarbonat tüpler (Corning tüp) içerisine yerleştirildikten sonra sıcak su banyosuna konulmuştur. Sıcaklık kademeli olarak her 10 dakikada 1°C arttırılarak 35, 40, 43, 46, 49, 52, 55 ve 60 °C'ye kadar yükseltilmiş ve örnekler her sıcaklık kademesinde iki saat tutulmuştur (Hong ve ark., 2009). Aynı zamanda şok yüksek sıcaklık etkisi de yaratmak amacıyla, seradan getirilen yeni yaprak örnekleri, belirlenen her sıcaklık kademesinde yine 2 saat süreyle yüksek sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Yüksek sıcaklığa maruz kalma süresini tamamlayarak su banyosundan çıkarılan yaprak örneklerinin bir kısmı hücre zarı zararlanmasının tespitinde kullanılırken diğer kısmı ise sıvı azot içerisinde dondurularak moleküler analizler için -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Yüksek sıcaklık uygulamaları üç kez tekrar edilmiştir.

3.2.2. Hücre Zarı Zararının Belirlenmesi

Yüksek sıcaklık uygulamaları sonucu oluşan hücre zarı zararını tespit edebilmek amacıyla “iyon sızıntısı” (electrolyte leakage) testleri, Arora ve ark. (1998)'nin yönteminde bazı değişiklikler yapılarak (Gülen ve Eriş 2004) uygulanmıştır. Bu amaçla, yüksek sıcaklığa maruz kalma süresini tamamlayan örnekler su banyosundan

çıkarıldıktan sonra iyon sızıntısı testi uygulanmıştır. Bu amaçla kontrol grubu ve yüksek sıcaklık uygulaması yapılmış yapraklardan 3 tekerrürlü olarak 2 cm çapında diskler alınmıştır. Bu diskler saf su ile yıkanıp kurulandıktan sonra deney tüplerine alınmış ve üzerlerine 20 ml saf su eklenmiştir. Hazırlanan örnekler 250 rpm hızındaki çalkalayıcıda oda sıcaklığında 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Meydana gelen iyon sızıntısını belirlemek amacıyla ilk okumalar EC metre (WTW TetraCon 325 model, InoLab Cond Level 1, Weilheim, Germany) ile yapılmıştır, daha sonra tüpler dokuların tamamen ölmesi amacıyla 15 dakika 121°C’de otoklavlanmış ve örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra iyon sızıntısı ölçümü tekrarlanmıştır. İyon sızıntısı ölçümleri her iki uygulamada da (kademeli ve şok sıcaklık uygulamaları) üç tekrarlamalı olarak yapılmıştır. Hücre zarı zararlanması aşağıdaki formüllerle hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İyon Sızıntısı} = (O.D_1 / O.D_2) \times 100$$

O.D₁ = 1. Okuma değeri

O.D₂ = 2. Okuma değeri

$$\% \text{ Zararlanma} = [(\% \text{ İyon sız. (U) } - \% \text{ İyon sız. (K) }) / 100 - \% \text{ İyon sız. (K) }] \times 100$$

U= Uygulama

K= Kontrol

Bu yöntemle çeşitlerin hücre zarı zararlanmaları yüzde (%) olarak belirlenmiştir.

3.2.3. Aktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi

Çalışmada aktif oksijen türlerinden H₂O₂ miktarı ölçümleri yapılmıştır. Analizlerde Ngo ve Lenhoff (1980) yöntemi takip edilmiştir. Buna göre her bir uygulamadan 500 mg yaprak örneği alınarak 0,2 N HClO₄ çözeltisi içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler 10 000 g’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Tüm ekstraksiyon aşamaları 4°C’de gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrasında örneklerin üst fazı alınarak temiz plastik tüplere alınmış ve pH’ları 7,5’e ayarlanarak tekrar 1 000 g’de

1 dak. santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj edilen örneklerin üst fazından 400 µl alınmış ve üzerine 1,6 ml saf su eklenerek Ion Exchange Chromatography kolonlarından geçirilmişlerdir. Daha sonra 590 nm’de spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Enzimatik Olmayan Antioksidan Analizleri

Enzimatik olmayan antioksidanlardan AsA ve GSH miktarları ölçülmüştür.

3.2.4.1. Askorbik asit miktarının belirlenmesi

AsA miktarı Law ve ark. (1983)’na göre belirlenmiştir. Yöntemin esası, ortama ilave edilen Fe^{+3} ’ün AsA ile Fe^{+2} ’ye indirgenmesi ve Fe^{+2} ’nin bipyridin ile komplekslenerek oluşan kırmızı rengin 525 nm’de ölçümüne dayanmaktadır. $-80^{\circ}C$ ’de saklanan yaprak örneklerinden 1 g alınarak, 10 ml %5’lik metafosforik asitle homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler, santrifüj tüplerine alınarak 22 000 g’de oda sıcaklığında 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra toplam AsA’i belirlemek için, üstteki sıvı fazdan 0,2 ml alınmış, üzerine 5 mM EDTA içeren 0,5 ml 150 mM’lık sodyum fosfat tamponu (pH 7,4), 0,1 ml 10 mM DTT (1,4 dithiotreitol) eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda ortamdan DTT’yi uzaklaştırmak için bu çözeltilerin üzerine 0,1 ml % 0,5’lik (ağırlık/hacim) NEM (N-ethylmaleimide) ilave edilmiştir. AsA miktarına bağlı renk oluşumunun gerçekleşmesi için, reaksiyon ortamına sırasıyla 0,4 ml % 10’luk TCA (trichloroacetic acid), 0,4 ml % 44’lük orto-fosforik asit, 0,4 ml % 70’lik etanolde çözüldürülmüş % 4’lük 2,2’-bipyridin ve 0,2 ml % 3’lük $FeCl_3$ ilave edilmiştir. İndirgenmiş AsA’i, belirlemek için ortama yukarıda belirtilen kimyasallardan sadece DTT ve NEM ilave edilmemiş ve diğer işlemler toplam AsA analizinde olduğu gibi yapılmıştır. 0-100 µg/ml aralığında, L(+) askorbik asit kullanılarak hazırlanan standartlara da aynı işlemler uygulanmıştır. Daha sonra toplam ve indirgenmiş AsA ölçümleri için hazırlanan örnekler ve standartlar renk gelişimi için $+40^{\circ}C$ ’de 40 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda spektrofotometrede 525 nm’de okumalar yapılmıştır.

3.2.4.2. Glutasyon miktarının belirlenmesi

Ellman (1959) yöntemi temel alınarak bazı değişikliklerle, ilek yaprak dokularında serbest GSH miktarı belirlenmiştir. -80°C’de saklanan örneklerden 0,5 g alınarak, %5’lik 5 ml metafosforik asitle homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler, 15 ml’lik santrifüj tüplerine alınarak 4 000 g’de 4°C’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstteki sıvı fazın 0,5 ml’si alınarak üzerine 5 mM EDTA içeren, 2,5 ml sodyum fosfat tamponu (150 mM pH: 7,4) ilave edilmiştir. Son olarak 0,5 ml 6 mM DTNB ilave edilip vortekslenen örnekler 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Renklenen örnekler spektrofotometrede 412 nm’de standartlarla karşılaştırılarak okunmuştur. GSH miktarının hesaplanması için; 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/ml’lik redükte glutasyon standartları kullanılmıştır. Standartlar, %5’lik metafosforik asitte çözündürülerek hazırlanmıştır.

3.2.5. Enzimatik Antioksidan Analizleri

Enzimatik antioksidantlardan askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), glutasyon redüktaz (GR) ve peroksidaz (PRX) aktiviteleri aşağıdaki yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.5.1. Askorbat peroksidaz (APX, EC.1.11.1.11) analizi

Askorbat peroksidaz (APX) Ekstraksiyonu

APX ekstraksiyon işleminde Nakano ve Asada (1980)’nin yöntemi esas alınarak, bazı değişikliklerle ilek yaprak örneklerine adapte edilmiştir. -80°C’de saklanan örneklerden 200 mg alınarak ekstraksiyon için kullanılmıştır. Tüm aşamalar 4°C’de gerçekleştirilmiştir.

APX ekstraksiyon çözeltisi için kullanılan çözeltiler:

- 50 mM K-PO₄ çözeltisi, pH 7,8 100 ml
- 50 mM askorbik asit 2 ml

Havanlara yukarıdaki şekilde hazırlanan ekstraksiyon çözeltilerinden 2 ml ve çok az miktarda PVPP (Polivinilpolipirrolidon) ile kuvars kum eklenerek örnekler homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler, 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 10 000 g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstteki sıvı faz 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktararak aktivite belirlenmesinde kullanılmıştır.

Askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesinin belirlenmesi

APX enzim aktivitesinin belirlenmesinde aşağıdaki stok çözeltiler kullanılmıştır. Askorbat ve H₂O₂ çözeltileri analiz sırasında taze hazırlanmıştır.

- 50 mM reaksiyon çözeltisi K-PO₄, pH 7,0
- 5 mM Askorbat çözeltisi
- 1 mM H₂O₂ çözeltisi

Enzim aktivite ölçümleri, spektrofotometrede 290 nm dalga boyunda kuvars küvet kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aktivite ölçümleri 100 saniye süreyle 10 saniye aralıklarla gerçekleştirilmiş ve 10. ve 90. saniyedeki okuma değerleri kullanılmıştır.

Kör örneklerin okumasında kullanılan çözelti aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

950 µl reaksiyon çözeltisi + 75 µl H₂O₂ + 100 µl askorbat çözeltisi

Örneklerin enzim aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan çözelti aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

900 µl reaksiyon çözeltisi + 75 µl H₂O₂ + 100 µl askorbat çözeltisi + 50 µl örnek

Spesifik APX enzim aktivitesi için örneklerdeki toplam protein miktarı Bradford (1976)'a göre BSA (Bovine serum albumin) standartları kullanılarak belirlenmiştir. BSA stok çözeltisi 10 mg BSA/ 10 ml dH₂O olacak şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2.1. Spesifik enzim aktivitesinin belirlenmesi için BSA standartlarının hazırlanması

Standartlar	Konsantrasyon (µg/µl)	BSA Stok (µl)	dH ₂ O (µl)	Protein Boya Çözeltisi (µl)
STD 0	0	0	100	2000
STD 10	10	10	90	2000
STD 20	20	20	80	2000
STD 40	40	40	60	2000
STD 60	60	60	40	2000

Çizelge 3.2.2. Spesifik enzim aktivitesinin belirlenmesi için örneklerin hazırlanması

Örnekler (µl)	Protein Boya Çözeltisi (µl)
100	2000

Askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi hesaplanması

APX enzim aktivitesinin hesaplanmasında enzim aktivite değeri belirlenmiş ve toplam protein miktarı ile oranlanarak µmol/mg protein olarak ifade edilmiştir. Enzim aktivite miktarının hesaplanmasında spektrofotometre okumaları sırasında belirlenen aktivite değerlerinde öncelikle aktivite ve net aktivite değerleri belirlenmiştir.

$$\text{Aktivite} = 2. \text{OD} - 1. \text{OD}$$

1. OD: 10. sn absorbans
2. OD: 90. sn absorbans

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

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

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

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

TA: Taze ağırlık

NA: Net aktivite değeri

SD: Standart değer (803,25)

SF: Örnek seyreltme faktörü

ÖM: Örnek miktarı (mg)

Bu formüle göre hesaplanan aktivite değerleri, toplam protein miktarı ile oranlanarak spesifik enzim aktivitesi belirlenmiştir.

$$APX (\mu\text{mol/mg protein}) = AD (\mu\text{mol/gTA}) / TPM$$

APX: Askorbat peroksidaz

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

TA: Taze ağırlık

TPM: Toplam protein miktarı (mg protein/gTA)

3.2.5.2. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) analizi

Katalaz (CAT) ekstraksiyonu

Nakano ve Asada (1980)'nin yöntemine göre CAT ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. -80°C'de saklanan örneklerden 200 mg alınarak ekstraksiyon için kullanılmıştır. Tüm aşamalar 4°C'de gerçekleştirilmiştir.

CAT ekstraksiyon çözeltisi için kullanılan çözeltiler

- 0,1 M K-PO₄ çözeltisi, pH 7,0 200 ml
- Triton 200 μl (Toplam hacimde % 0,1 oranında)

Havanlara yukarıdaki şekilde hazırlanan ekstraksiyon çözeltisinden 2 ml ve çok az miktarda PVPP (Polivinilpolipirrolidon) ile kuvars kum eklenerek örnekler homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler, 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 760 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstteki sıvı faz 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktararak aktivite belirlenmesinde kullanılmıştır.

Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin belirlenmesi

CAT aktivitesi 260 nm'de ($E = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) H_2O_2 'nin parçalanma oranı esas alınarak belirlenmiştir. CAT enzim aktivitesinin belirlenmesinde aşağıdaki stok çözeltiler kullanılmıştır. H_2O_2 çözeltisi okuma sırasında taze olarak hazırlanmıştır.

- 0,1 M K- PO_4 çözeltisi, pH 7,0 200 ml
- 0,1 M EDTA 200 μl (toplamda hacimde 0,1 mM)
- 150 mM H_2O_2 çözeltisi

Enzim aktivite ölçümleri, spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda kuvars küvet kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aktivite ölçümleri 60 saniye süreyle 10 saniye aralıklarla gerçekleştirilmiş ve 10. ve 50. saniyedeki okuma değerleri kullanılmıştır.

Kör örneklerin okumasında kullanılan çözelti aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

900 μl reaksiyon çözeltisi + 750 μl H_2O_2

Örneklerin enzim aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

825 μl reaksiyon çözeltisi + 750 μl H_2O_2 + 75 μl örnek

Spesifik CAT enzim aktivitesi için örneklerdeki toplam protein miktarının belirlenmesi spesifik APX enzim aktivitesinin belirlenmesinde belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Katalaz (CAT) enzim aktivitesi hesaplaması

CAT 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 hesaplanmasında spektrofotometre okumaları sırasında belirlenen aktivite değerlerinde öncelikle aktivite ve net aktivite değerleri belirlenmiştir.

$$\text{Aktivite} = 2. \text{OD} - 1. \text{OD}$$

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.

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

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

TA: Taze ağırlık

NA: Net aktivite değeri

SD: Standart değer (41,91)

SF: Örnek seyreltme faktörü

ÖM: Örnek miktarı (mg)

Bu formüle göre hesaplanan aktivite değerleri, toplam protein miktarı ile oranlanarak spesifik enzim aktivitesi belirlenmiştir.

$$\text{CAT } (\mu\text{mol}/\text{mg protein}) = \text{AD}(\mu\text{mol}/\text{gTA}) / \text{TPM}$$

CAT: Katalaz

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

TA: Taze ağırlık

TPM: Toplam protein miktarı (mg protein/gTA)

3.2.5.3. Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) analizi

Glutasyon redüktaz (GR) ekstraksiyonu

Enzim ekstraksiyonu Çakmak ve Marschner (1992)'in yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. -80°C'de saklanan örneklerden 200 mg alınarak ekstraksiyon için kullanılmıştır. Tüm aşamalar 4°C'de gerçekleştirilmiştir.

GR ekstraksiyon çözeltisi için kullanılan çözeltiler

- 50 mM K-PO₄ çözeltisi, pH 7,6 200 ml
- 0,1 M EDTA 200 µl (toplam hacimde 0,1 mM)

Havanlara konulan örneklerin üzerine yukarıdaki şekilde hazırlanan ekstraksiyon çözeltisinden 2 ml eklenerek örnekler homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler, 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 15 000 g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstteki sıvı faz 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılarak aktivite belirlenmesinde kullanılmıştır.

Glutasyon redüktaz (GR) enzim aktivitesinin belirlenmesi

340 nm'de ($E = 6,2 \text{ mM cm}^{-1}$) NADPH'nın (β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) oksidasyonu esas alınarak GR enzim aktivitesi belirlenmiştir. GR enzim aktivitesinin belirlenmesinde aşağıdaki stok çözeltiler kullanılmıştır. NADPH ve GSSG (yükseltgenmiş glutasyon) çözeltileri okuma sırasında taze olarak hazırlanmıştır.

- 50 mM K-PO₄ çözeltisi, pH 7,6 200 ml
- 0,1 M EDTA 200 µl (toplam hacimde 0,1 mM)
- 10 mM GSSG
- 0,25 mM NADPH

Enzim aktivite ölçümleri, spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda kuvars küvet kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aktivite ölçümleri 100 saniye süreyle 10 saniye aralıklarla gerçekleştirilmiş ve 10. ve 90. saniyedeki okuma değerleri kullanılmıştır.

Kör örneklerin okumasında kullanılan çözelti aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

925 µl reaksiyon çözeltisi + 50 µl GSSG + 25 µl

Örneklerin enzim aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

825 µl reaksiyon çözeltisi + 50 µl GSSG + 25 µl + 100 µl

Spesifik GR enzim aktivitesi için örneklerdeki toplam protein miktarının belirlenmesi spesifik APX enzim aktivitesinin belirlenmesinde belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Glutatiyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi hesaplaması

GR enzim aktivitesinin hesaplanmasında enzimin aktivite değeri belirlenmiş ve toplam protein miktarı ile oranlanarak µmol/mg protein olarak ifade edilmiştir. Enzim aktivite miktarının hesaplanmasında spektrofotometre okumaları sırasında belirlenen aktivite değerlerinde öncelikle aktivite ve net aktivite değerleri belirlenmiştir.

Aktivite= 2. OD- 1. OD

1. OD: 10. sn absorbans
2. OD: 90. sn absorbans

Net Aktivite Değeri: Aktivite- kör okuma (blank)

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

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

AD: Aktivite değeri (µmol/gTA)

TA: Taze ağırlık

NA: Net aktivite değeri

SD: Standart değer (161)

SF: Örnek seyreltme faktörü

ÖM: Örnek miktarı (mg)

Bu formüle göre hesaplanan aktivite değerleri, toplam protein miktarı ile oranlanarak spesifik enzim aktivitesi belirlenmiştir.

$$\text{GR } (\mu\text{mol/mg protein}) = \text{AD}(\mu\text{mol/gTA}) / \text{TPM}$$

GR: Glutasyon redüktaz

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

TA: Taze ağırlık

TPM: Toplam protein miktarı (mg protein/gTA)

3.2.5.4. Peroksidaz (PRX, EC 1.11.1.7) analizi

Peroksidaz ekstraksiyonu

Bu yönteme göre PRX enzim ekstraksiyonu için, -80°C 'de saklanan örneklerden 0,1 g alınarak, 1 ml ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir (Gülen, 2000; Gülen ve ark., 2002).

Ekstraksiyon çözeltisi bileşenleri (50 ml için):

- 0,1 M potasyum fosfat çözeltisi pH 7,5 50 ml
- 30 mM borik asit 0,09 g
- 50 mM askorbik asit 0,44 g
- 17 mM sodyum metabisülfid 0,16 g
- 16 mM dietil ditiyokarbamik asit 0,14 g
- 1 mM EDTA 18 mg
- %4 PVP-40 2 g

Kimyasallar çözündürüldükten sonra, NaOH kullanılarak pH tekrar 7,5'e ayarlanmıştır (Gülen ve ark., 2002). Elde edilen homojenizat 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine alınmış ve vorteks yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra 15 dakika boyunca soğukta ($+4^{\circ}\text{C}$) çalkalanmaya bırakılmıştır. Daha sonra örnekler $16\ 000\ \text{g}'de$, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjden çıkan örneklerin üstteki sıvı kısmı alınarak temiz tüplere

aktarılp, üzerlerine 1'er damla %10'luk gliserol ve eser miktarda brom fenol mavisi eklenerek jele yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

Peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

PRX enzim aktivitesi, Native-PAGE yöntemine göre belirlenmiştir. Elektroforez analizi mini PROTEAN III elektroforez ünitesi (Bio-Rad) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Asidik peroksidaz jel profilleri için Davis (1964) yöntemine göre, bazik peroksidaz jel profilleri için ise Reisfeld (1962)'e göre jeller ayrı ayrı hazırlanmış ve örneklerden 20 µl'si alınarak kuyucuklara yüklenmiştir.

Asidik PRX Ayırma Jeli Çözeltisi Bileşenleri

- 3 M Tris-HCl pH 8,9
- %30 Akrlamid / %0,8 Bis
- %10 Amonyum persülfat

Asidik PRX Yükleme Jeli Çözeltisi Bileşenleri

- 0,5 M Tris-HCl pH 6,7
- % 10 Akrlamid / % 1,25 Bis
- %10 Amonyum persülfat

Asidik PRX Yürütme Tamponu Çözeltisi Bileşenleri (1 L için)

- Glisin 28,8 g
- Tris-HCl 6 g

Bazik PRX Ayırma Jeli Çözeltisi Bileşenleri

- %30 Akrlamid / %0,8 Bis
- %60 sükröz
- Potasyum asetat çözeltisi pH 4,6
- %10 Amonyum persülfat

Bazik PRX Yükleme Jeli Çözeltisi Bileşenleri

- % 10 Akrilamid / % 1,25 Bis
- Potasyum asetat çözeltisi pH 5,0
- %10 Amonyum persülfat

Bazik PRX Yürütme Tamponu Çözeltisi Bileşenleri (1 L için)

- β - Alanin 31,2 g
- Asetik asit 8 ml

Yüklemeden sonra, jeller tank içerisine yerleştirilmiş ve yürütme tamponu çözeltisi ilave edilmiştir. Jele önce 20 dakika 10 mA, sonra 20 dakika 20 mA ve son olarak da 3 saat 15 dakika boyunca 40 mA'lık akım verilmiştir. Reisfeld sistemde ters akım uygulanmıştır. Yürütme işlemi +4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Elektroferez sonrası PRX aktivitesinin belirlenmesi için jeller Wendel ve Weeden (1989) yöntemine göre boyanmıştır. Boyanan jeller, florasan ışık altında fotoğraflanmıştır.

3.2.6. Protein Analizleri

3.2.6.1. Prolin analizi

Prolin ekstraksiyonu ve prolin miktarının belirlenmesinde Bates ve ark. (1973)'nin geliştirdiği yöntem kullanılmıştır. Reaksiyonun temeli prolin aminoasidinin ninhidrinle renk tepkimesi vermesi sonucu pembe (menekşe mor) renkli bileşik oluşturmasıdır. Ekstraksiyonda %3'lük sülfosalisilik asit kullanılmıştır, prolin miktarının belirlenmesinde kullanılan ninhidrin reaktifi aşağıda verildiği gibi hazırlanmış ve bir gece 4 °C'de dinlenmeye bırakılmıştır.

1,25 g ninhidrin + 30 ml glasiyel asetik asit + 6 M 20 ml fosforik asit

-80°C'de saklanan örneklerden 200 mg alınarak 1 ml %3'lük sülfosalisilik asit ile havanda homojenize edilerek ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Homojenize edilen örnekler 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 5 000 g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstteki sıvı fazdan 100 μ l alınarak 2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Örneklerin üzerine 200 μ l ninhidrin reaktifi, 200 μ l glasiyel

asetik asit ve 100 µl %3'lük sülfosalisilik asit ilave edilerek örnekler iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan örnekler tepkimenin gerçekleşmesi için su banyosunda 100 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir ve inkübasyondan çıkarılan örnekler reaksiyonun sonlandırılması için hemen buz banyosuna alınmıştır. Buz banyosunda 5 dakika soğutulan örnekler buz içerisinden alınıp oda sıcaklığına gelmesi beklendikten sonra üzerlerine 1 ml toluen ilave edilmiş ve iyice karıştırılıp 4 000 g'de 20 saniye santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra üstteki sıvı fazın tamamı alınarak plastik spektroskopik küvetlerine alınan örneklerin okumaları spektrofotometrede 520 nm'de gerçekleştirilmiştir. Kör örnek olarak 1 ml toluen kullanılmıştır.

Prolin miktarının hesaplaması

Prolin miktarının hesaplanmasında 0-1 000 µM/prolin içeren standartlar hazırlanmıştır ve çizilen standart eğrisinden prolin miktarları hesaplanmıştır.

$$\text{Prolin miktarı } (\mu\text{M} / \text{g TA}) = [(A - 0,046 \mu\text{M}) / 0,00069] / \text{g TA}$$

TA: Taze ağırlık

A: 520 nm dalga boyundaki absorbans değeri

3.2.6.2. Toplam çözünebilir protein analizi

Toplam çözünebilir protein ekstraksiyonu

Toplam çözünebilir protein ekstraksiyonu Arora ve ark. (1992, 1997)'nin yöntemi kullanılarak, Gülen ve Eriş (2003)'in önerdiği bazı değişikliklerle -80°C'de saklanan örneklerden 1 g alınarak, yapılmıştır.

Toplam çözünebilir protein ekstraksiyonunda kullanılan çözelti bileşenleri:

- 50 mM Boraks (Sodyum tetraborat)
- 50 mM askorbik asit
- 1 mM PMSF (Fenilmetilsülfonil)
- %1 β-mekaptoetanol

Yukarıdaki şekilde hazırlanan ekstraksiyon çözeltisinden 5 ml alınarak, örnekler havanlarda homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler, 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 26 000 g'de 4°C'de 1,5 saat santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstteki sıvı faz alınarak 0,45 ve 0,22 µm çaplı filtrelerden geçirilmiştir. Elde edilen süzütünün 1000 µl'si alınarak SDS-PAGE'de kullanılmak üzere TCA (trikloroasetikasit) ile çöktürülmüştür. Geri kalan süzüntü toplam çözünebilir protein miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Toplam çözünebilir protein miktarının belirlenmesi

Toplam çözünebilir protein miktarı Arora ve Wisniewski (1994) tarafından önerildiği şekilde Bradford (1976) yöntemine göre belirlenmiştir. Protein ekstraksiyonundan elde edilen süzüntüdeki protein miktarı spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir. Ölçümler, 595 nm dalga boyunda tek kullanımlık polikarbonat küvetler kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve toplam çözünebilir protein miktarının hesaplanması için 0, 10, 20, 30, 40, 50 µg/µl'lik BSA (Bovine serum albumin) standartları kullanılmıştır. BSA stok çözeltisi 5 mg BSA/ml ekstraksiyon çözeltisi olacak şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2.3. Toplam çözünebilir protein miktarının belirlenmesi için BSA standartlarının hazırlanması

Standartlar	Konsantrasyon (µg/µl)	BSA Stok (µl)	Ekstraksiyon Çözeltisi (µl)	HCl (µl)	dH ₂ O (µl)	Protein Boya Çözeltisi (ml)
STD 0	0	0	10	10	80	3,5
STD 10	10	2	8	10	80	3,5
STD 20	20	4	6	10	80	3,5
STD 30	30	6	4	10	80	3,5
STD 40	40	8	2	10	80	3,5
STD 50	50	10	0	10	80	3,5

Çizelge 3.2.4. Toplam çözünebilir protein miktarının belirlenmesi için örneklerin hazırlanması

Örnekler	Protein Ekstraktı (μ l)	HCl (μ l)	dH ₂ O (μ l)	Protein Boya Çözeltisi (ml)
1.1	10	10	80	3,5
1.2	10	10	80	3,5
1.3	20	10	70	3,5
1.4	20	20	70	3,5
2.1	10	10	80	3,5
...	10	10	80	3,5

3.2.6.3. SDS-PAGE analizi

Sıcaklık uygulamalarının çeşitlerin protein profillerine olan etkisi SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamid jel elektroforezi) yöntemiyle belirlenmiştir (Lim ve ark., 1999; Gülen 2000). Ekstrakte edilen toplam protein çözeltisinden 1000 μ l'si alınarak üzerine %10 TCA eklenmiş ve 16 000 rpm'de santrifüj edilerek proteinler çöktürülmüştür. Çöktürülen proteinler soğuk asetonla (-20°C) üç kez yıkanmıştır. Protein çökeltisinin kuruması ve asetonun buharlaşması için tüpler ağzı açık şekilde oda sıcaklığında yaklaşık 12 saat bekletilmiştir. Kurutulan protein örnekleri, Laemmli (1970) çözeltisi yardımıyla çözündürülerek SDS-PAGE için yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

Laemmli çözeltisi bileşenleri:

- 60 mM Tris-HCl pH 6,8
- %10 Gliserol
- %2 SDS

Hazırlanan yükleme çözeltisinden, her örnek için 100 μ l alınarak üzerine % 5 β -Merkaptoetanol eklenmiştir, karışıma renk vermesi amacıyla çok az miktarda 'bromphenolblue' katılmış ve karıştırılmıştır. Bu karışımdan her bir örnek (kuru protein

çökeltisi) üzerine 100 µl konulmuştur. Örnekler, 5 dakika kaynar suda bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlandıktan sonra vortekslenerek çözümleri sağlanmıştır. Son olarak 16 000 g'de 30 sn santrifüj işlemi uygulanan örnekler yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

SDS- PAGE jelinin hazırlanması

SDS-PAGE jeli hazırlanmasında Mini Protean III dikey elektroforez sistemi (Bio-Rad) kullanılmıştır. SDS-PAGE jeli, %12,5'lük ayırma jeli ve %4'lük yükleme jelinden oluşmaktadır. Jel kalınlığının 0,75 mm olmasını sağlayan jel kasetleri kullanılmıştır.

% 12,5 ayırma jeli bileşenleri

• Saf su	1000 µl
• 1 M Tris-HCl ph 8,8	2200 µl
• %1 SDS	600 µl
• %36 Acrylamide/Bis (29:1)	2100 µl
• %3 Amonyum persülfat	100 µl
• TEMED	4 µl

Yukarıda verilen kimyasallar karıştırıldıktan hemen sonra mikro pipet yardımıyla bu karışımdan jel kaseti içerisine 3,5 ml dökülmüştür. Jelin havayla temasın kesmek için üzerine 200 µl saf su eklenerek 45 dakika boyunca polimerizasyona bırakılmıştır.

% 4 örnek yükleme jeli bileşenleri

• Saf su	1662 µl
• 1 M Tris-HCl ph 6,8	620 µl
• %36 Acrylamide/Bis (29:1)	500 µl
• %3 Amonyum persülfat	25 µl
• TEMED	4 µl

Polimerize olmuş ayırma jeli üzerindeki saf su peçete ile alındıktan sonra, taraklar takılarak yukarıdaki şekilde hazırlanan örnek yükleme jeli, ayırma jeli üzerine mikro

pipet yardımıyla dökülmüştür. Jelin polimerizasyonu için 45 dakika beklendikten sonra jel kasetleri elektroforez işlemi için tank içerisine yerleştirilmişlerdir.

Elektroforez

Elektroforezde yürütme tamponu olarak Tris-Glisin-SDS çözeltisi kullanılmıştır.

Yürütme tamponu çözeltisi bileşenleri (1 l, 10X)

- 250 mM Tris-base 30 g
- 1,92 M Glycine 144 g
- % 0,5 SDS 5 g

Çözelti elektroforez tankı içerisine, yerleştirilmiş jel kasetlerinin üzerini örtecek şekilde boşaltılmıştır. Bu aşamadan sonra, hazırlanan örneklerden alınarak her bir kuyucuğa 30 µg protein olacak şekilde mikro pipet yardımıyla yükleme yapılmıştır. Thermo EC 1000-900 güç kaynağı kullanılarak jele 250 V ve 40 mA'lık elektrik akımı verilerek örneklerin jelin sonuna kadar yürümeleri sağlanmıştır (~1,5 saat).

Jelin Boyanması

Jel üzerindeki toplam protein bantlarının görüntülenmesinde "Commasie Brilliant Blue G-250" çözeltisi kullanılmıştır. Elektroforezin ardından, kasetten çıkarılan jeller oda sıcaklığında %12'lik TCA çözeltisi içinde 2 saat boyunca bekletilerek proteinlerin jellere sabitlenmesi sağlanmıştır. Jel, üzerindeki TCA kalıntılarının temizlenmesi için jel 3 kez saf su ile yıkandıktan sonra metanolde seyreltilmiş Commasie Brilliant Blue G-250 (Commasie Brilliant Blue G-250: metanol; 4:1) çözeltisine alınmıştır. Jeller gece boyunca düşük hızda çalışan çalkalayıcı üzerinde bırakılarak boyanmaları sağlanmıştır. Bu işlemin sonunda protein bantları mavi renkli olarak görünür hale gelmiştir. 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 bantları florasan ışık altında görüntülenmiştir.

Protein Bantlarının Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi

Örneklerin elektroforezi sırasında SDS-PAGE moleküler ağırlık standardı kullanılmıştır (BioRad, SDS-PAGE low molecular weight standard). Böylece molekül ağırlıkları bilinen bantlar temel alınıp, örneklere ait protein bantlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

3.2.6.4. İmmunoblot (Western blot) analizi

HSP'lerin (Heat Shock Proteinler = Isı Şoku Proteinleri) immunoblotting tekniği ile belirlenmesinde Arora ve Wisniewski (1994)'nin önerdiği yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla, daha önce açıklandığı gibi protein örnekleri bitkilerden ekstrakte edilmiş ve "Toplam çözünebilir protein analizi" bölümünde anlatıldığı gibi SDS-PAGE'de yürütülmüşlerdir.

Elektroforezden sonra jeller kasetten çıkarılarak blotlama işlemine geçilmiştir, bu aşamada Bio-Rad Western blot ıslak blotlama ünitesi kullanılmıştır. Jeller, yeni kasetlere sandviç sistemi oluşturmak için yerleştirilmiştir. Sandviç sistemini hazırlamak için süngerler ve filtre kağıtları önceden transfer tamponunda bekletilerek ıslatılmışlardır. Daha sonra sünger-filtre kağıdı-jel-membran-filtre kağıdı-sünger olacak şekilde ve aralarında hava boşluğu kalmayacak şekilde sandviç sistemi hazırlanmış ve kasetlere yerleştirilmiştir. Hazırlanan kasetler elektroforez tankına konduktan sonra üzerlerini kapatacak şekilde transfer tampon çözeltisi boşaltılmıştır

Transfer tampon çözeltisi bileşenleri (1 l):

- 25 mM Tris baz 3,03 g
- 192 mM Glisin 14,4 g
- %20 Metanol 200 ml

Elektroforez sırasında 1 saat 15 dakika boyunca 250 V, 50 W, 40 mAmp'lik akım uygulanarak proteinler nitroselüloz membranlara (Nitrocellulose membranes BioRad) aktarılmıştır.

Membranlar % 5'lik yağsız süttozu içeren TBS (Tris Buffer Saline)'de 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek membran yüzeyinin tamamen proteinle kaplanması sağlanmıştır. Süttozundan çıkarılan membranlar, fazla süttozunu gidermek amacıyla TBST (Tris Buffer Saline Tween-20) çözeltisi ile 2'şer kez 2'şer dakika çalkalanarak yıkanmıştır. Birinci antikör olarak 1:1500 oranında HSP 70 [Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 70 Clone BRM -22 (mouse)] %1 BSA (Bovine serum albumin) içeren TBST'de çözülerek hazırlanmıştır. Membranlar, birinci antikorda +4°C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldıktan sonra, TBST'de 2'şer kez 10'ar dakika çalkalanarak yıkanmıştır. Aynı işlem HSP 60 [Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 60 Clone LK-2 (mouse)] antikoru için de aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

TBS çözeltisi bileşenleri (1 l)

- Tris baz 6,05 g
- Sodyum klorür 8,76 g
- pH 7,5

TBST çözeltisi bileşenleri (1 l)

- Tris baz 6,05 g
- Sodyum klorür 8,76 g
- % 0,1 Tween-20 100 µl
- pH 7,5

Yıkama işleminden sonra , %1 BSA içeren TBST'de çözülerek hazırlanan, 1:5000 oranındaki ikinci antikorda [Anti rabbit IgG (Fc) AP Conjugate] oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyondan sonra membranlar TBST'de 4'er kez 10'ar dakika çalkalanarak yıkanmıştır. Daha sonra, substrat (alkalin fosfataz enzimi) içerisinde yaklaşık 10-15 dakika kadar tutulan membranlardaki bantların renklenecek görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Substrattan alınan membranlar saf suda yıkandıktan sonra kurutulup değerlendirilene dek saklanmışlardır.

Membranlar üzerinde ortaya çıkan bant görüntüleri bir tarayıcı yardımıyla dijital ortama aktarılmıştır. Bantların densitometrik analizleri ise “Image J” programı yardımıyla yapılmıştır.

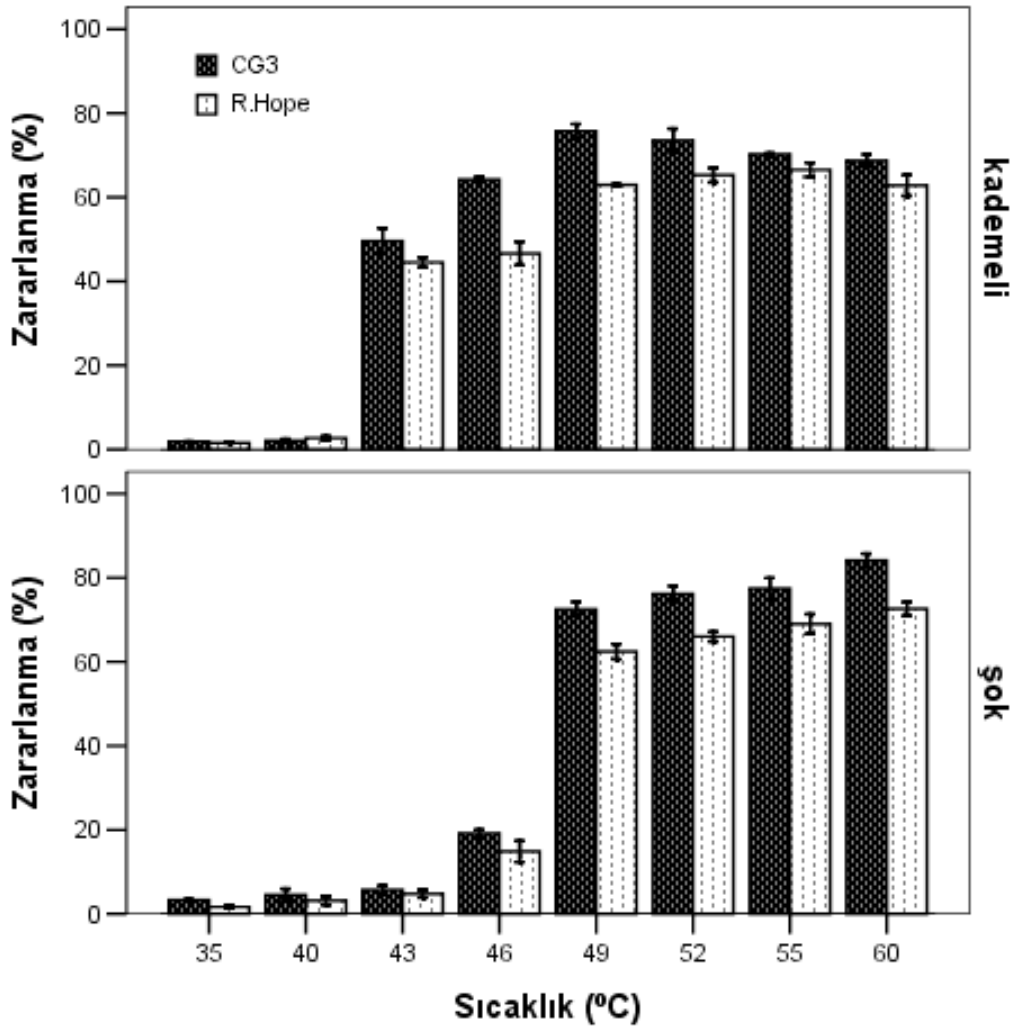
3.2.7. İstatistiksel Analizler

Deneme “Tasadüf Parselleri Deneme Desenine” göre 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Araştırmadan elde edilen tüm sonuçlar “SPSS 1.3 Windows” paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Uygulama ortalamalarının farklılıkları, “Duncan” testi ile ortaya konmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Zarı Zararının Belirlenmesi

Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarının, CG3 ve R. Hope çeşitlerinin hücre zarı zararlanmalarının değişimi üzerine etkisi Şekil 4.1.'de görülmektedir.



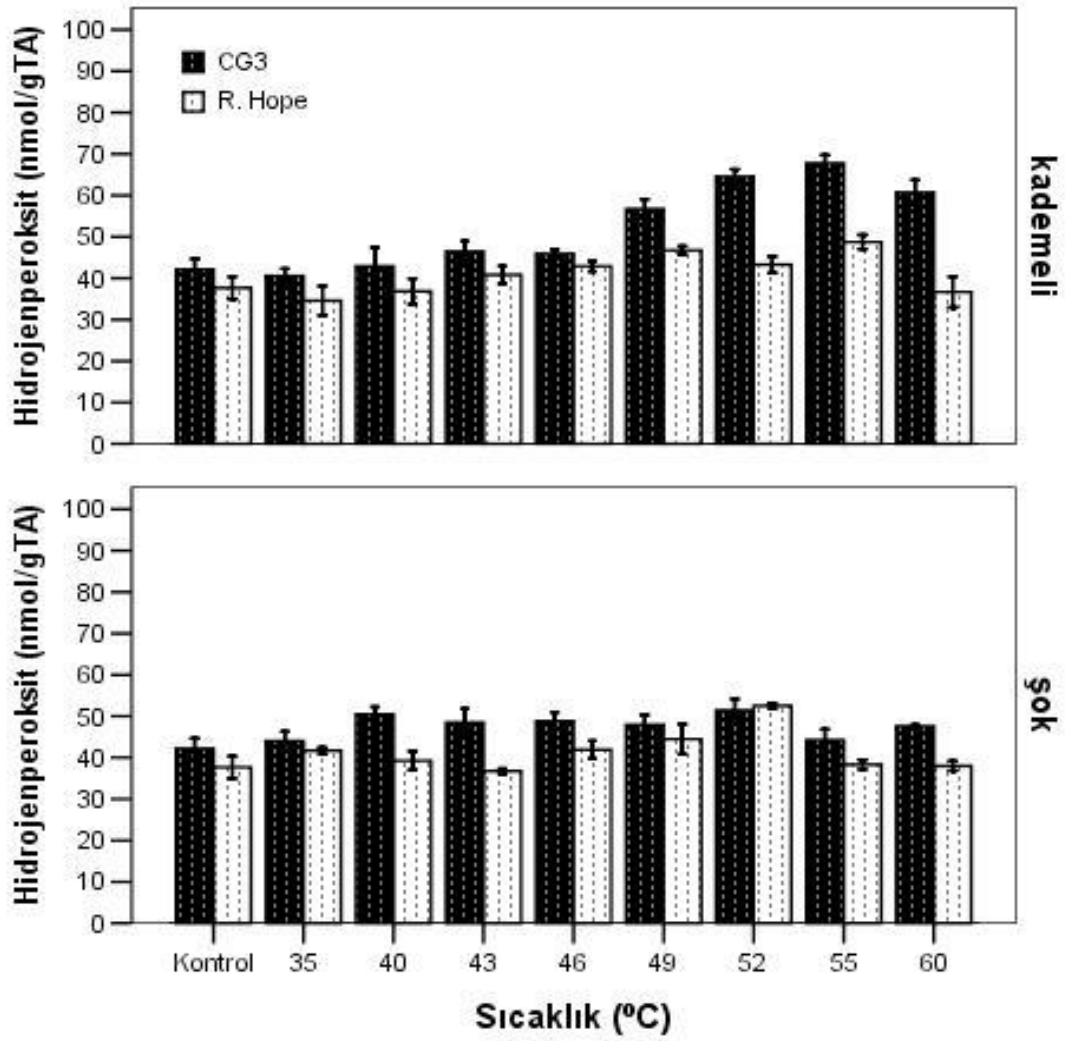
Şekil 4.1. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin hücre zarı zararlanmaları (%). Dikey barlar tekerrürlerin \pm standart sapmalarını göstermektedir.

Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında 43°C'ye kadar her iki çeşitte de zararlanmada belirgin bir artış görülmemiştir. 43°C'den itibaren zararlanma oranında her iki çeşitte de

ani bir artış gözlenmiş ve bu artışın 49 °C’de en yüksek düzeye (CG3’te % 76 ve R. Hope’da % 63) ulaşmıştır. Ancak, 55 ve 60°C’lerde zararlanmada bir duraklama olduğu gözlenmiştir. Şok yüksek sıcaklık uygulamasında ise, zararlanmadaki artış 46°C’den itibaren görülmüştür. Şok yüksek sıcaklık uygulamasında uygulanan yüksek sıcaklığın derecesine paralel olarak, zararlanmada da artış gözlenmiştir. 35°C’de CG3 çeşidinin zararlanması % 3, R. Hope çeşidinin % 2 iken 60 °C’de zararlanmaları sırasıyla % 84 ve % 72 olarak belirlenmiştir. Her iki sıcaklık uygulamasında ve tüm sıcaklık derecelerine CG3 çeşidinin zararlanması R. Hope çeşidinden daha yüksek bulunmuştur. Sıcaklık uygulamaları*çeşit interaksiyonu önemsiz, sıcaklık uygulamaları*sıcaklıklar, çeşit*sıcaklıklar, sıcaklık uygulamaları*çeşit*sıcaklıklar interaksiyonları istatistiki olarak önemli bulunmuştur (EK-1).

4.2. Aktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi

Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamaları sonucu çilek yaprak dokularında oluşan aktif oksijen türlerinden H₂O₂ birikimi saptanmıştır (Şekil 4.2.). Buna göre sıcaklık artışına paralel olarak her iki çeşidin de H₂O₂ içeriğinde bir artış belirlenmiştir. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında örneklerin yüksek sıcaklığa maruz kalma süreleri etkili olmuş dolayısıyla da H₂O₂ miktarları şok uygulamasına göre daha yüksek seviyelerde görülmüştür. Bu durum CG3 çeşidinde daha belirgin olarak saptanmıştır. Öte yandan çeşitler karşılaştırıldığında ise R. Hope çeşidinin H₂O₂ miktarının hemen hemen tüm sıcaklık uygulamalarında CG3 çeşidinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık uygulamaları*çeşit, sıcaklık uygulamaları*sıcaklıklar, çeşit*sıcaklıklar, sıcaklık uygulamaları*çeşit*sıcaklıklar interaksiyonları istatistiki olarak önemli bulunmuştur (EK-2).



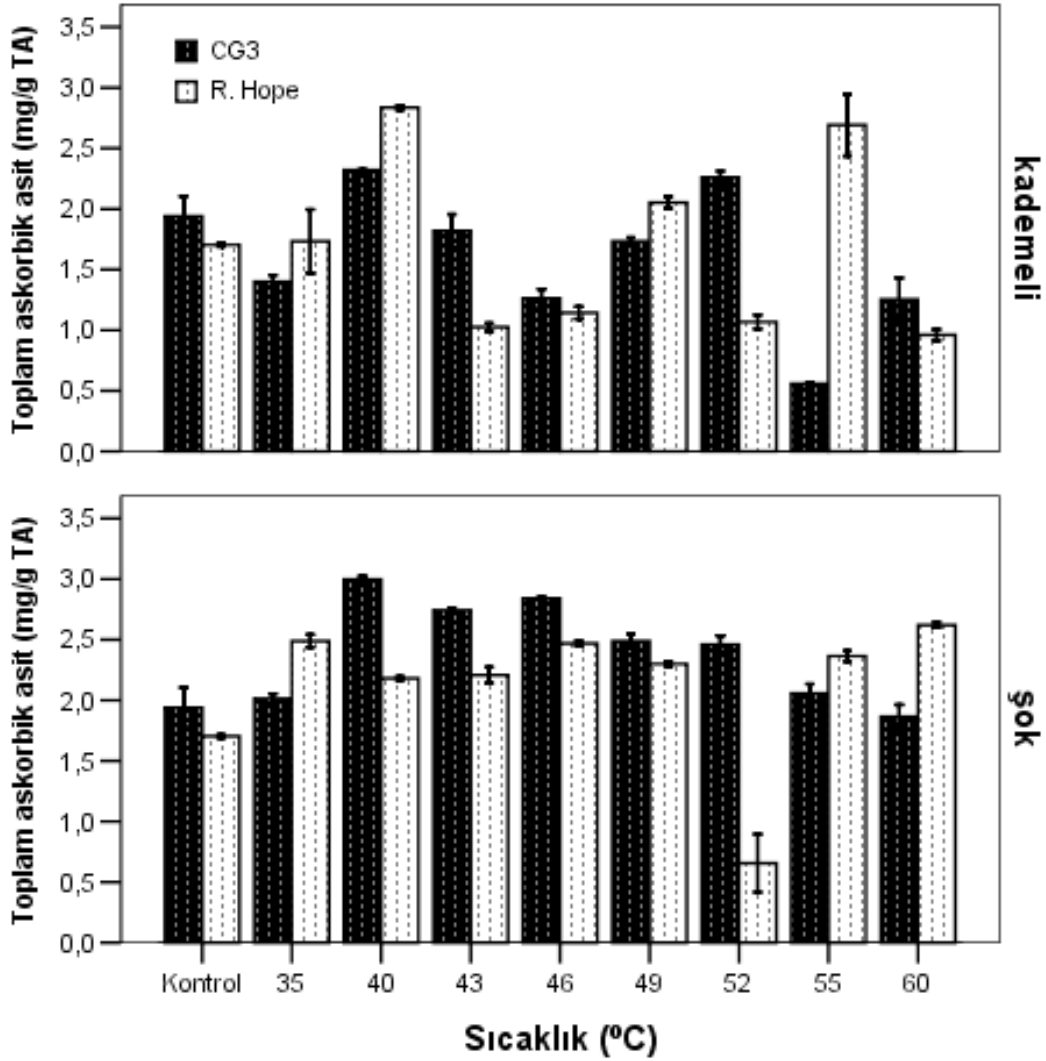
Şekil 4.2. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin hidrojenperoksit (H₂O₂) miktarları (nmol/gTA). Dikey barlar tekerrürlerin ± standart sapmalarını göstermektedir.

4.3. Enzimatik Olmayan Antioksidan Analizleri

4.3.1. Askorbik asit miktarının belirlenmesi

Şekil 4.3. genel olarak incelendiğinde uygulamalar, sıcaklık ve artışı ve çeşitler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli bulunmuş olsa da, çalışma açısından kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında çeşitler arasında ve uygulamalara göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bununla birlikte her iki çeşitte de 40, 49 ve 55°C’lerde bir artış olduğu ve bu sıcaklık uygulamalarında R. Hope çeşidinin toplam AsA miktarının CG3

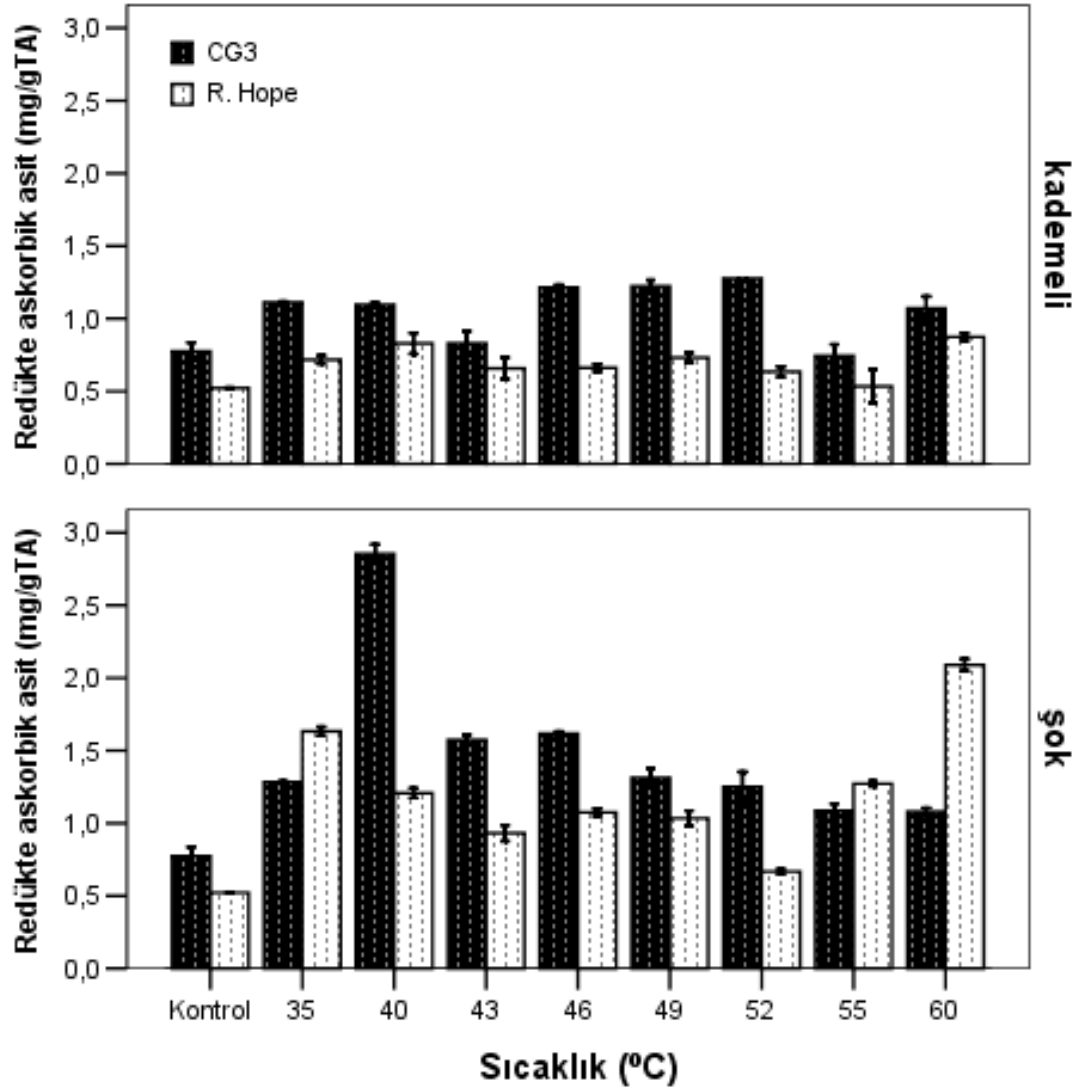
çeşidinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Sıcaklık uygulamaları*çeşit, sıcaklık uygulamaları*sıcaklıklar, çeşit*sıcaklıklar, sıcaklık uygulamaları*çeşit*sıcaklıklar interaksiyonları istatistiki olarak önemli bulunmuştur (EK-3).



Şekil 4.3. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin toplam askorbik asit (AsA) miktarı (mg/gTA). Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS'lerini göstermektedir.

Şekil 4.4.'de kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin redükte askorbik asit miktarları verilmiştir. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarında redükte askorbik asit miktarı sıcaklık uygulamalarından istatistiksel olarak etkilenmezken, CG3 çeşidinin redükte askorbik asit miktarının R. Hope çeşidine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Sıcaklık uygulamaları*çeşit, sıcaklık

uygulamaları*sıcaklıklar, çeşit*sıcaklıklar, sıcaklık uygulamaları*çeşit*sıcaklıklar interaksiyonları istatistiki olarak önemli bulunmuştur (EK-4).

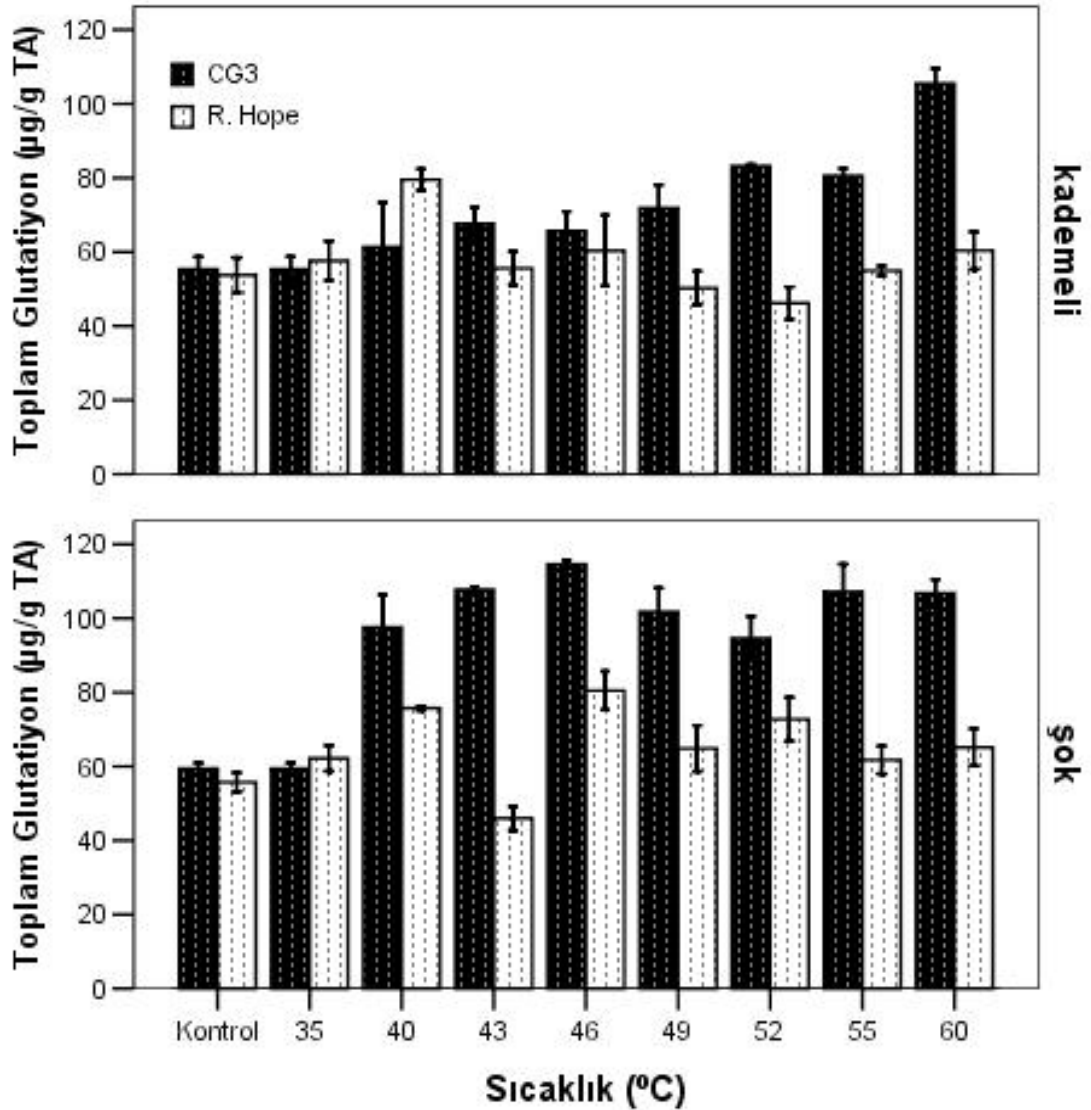


Şekil 4.4. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin redükte askorbik asit (AsA) miktarı (mg/gTA). Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS'lerini göstermektedir.

4.3.2. Glutatyon miktarının belirlenmesi

Şekil 4.5. genel olarak incelendiğinde, uygulanan kademeli ve şok yüksek sıcaklıkların, toplam glutatyon miktarı üzerine etkisinin farklı olduğu gözlenmiştir. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında kontrol ve 35°C'lik uygulamalar arasında çeşitlerin glutatyon

miktarları bakımından istatistiksel olarak bir fark görülmezken, 40°C'den itibaren CG3 çeşidinin toplam glutatyon miktarının arttığı saptanmıştır. Buna karşın; R. Hope çeşidinde ise 40°C'de toplam glutatyon miktarında ani bir artış gözlenmiş ancak 43°C'den itibaren azalmaya başladığı belirlenmiştir. Benzer durum şok sıcaklık uygulamasında da gözlemlenmiştir. Sıcaklık uygulamaları*çeşit, sıcaklık uygulamaları*sıcaklıklar, çeşit*sıcaklıklar, sıcaklık uygulamaları*çeşit*sıcaklıklar interaksiyonları istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (EK-5).

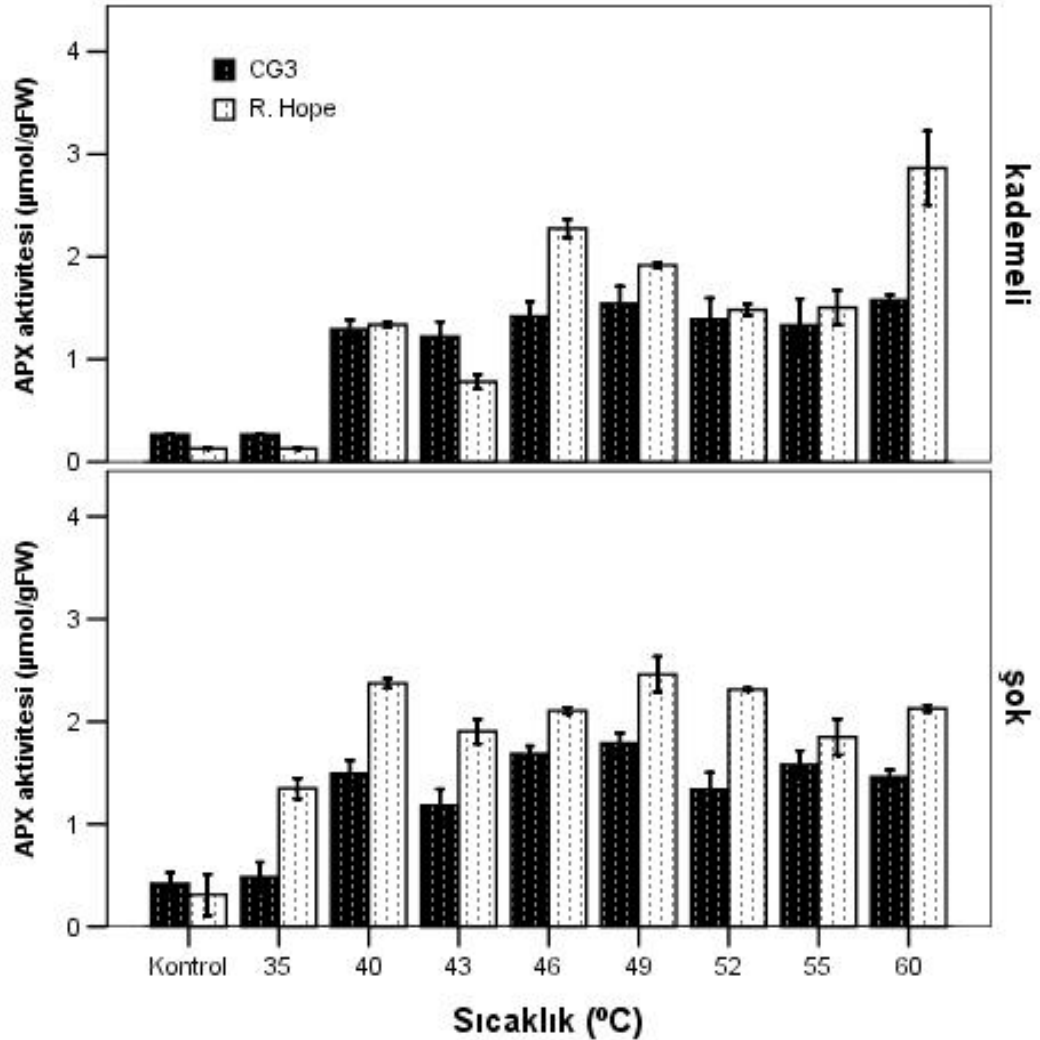


Şekil 4.5. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin toplam glutatyon (GSH) miktarı (µg/gta). Dikey barlar tekerrürlerin ±SS'lerini göstermektedir.

4.5. Enzimatik Antioksidan Analizleri

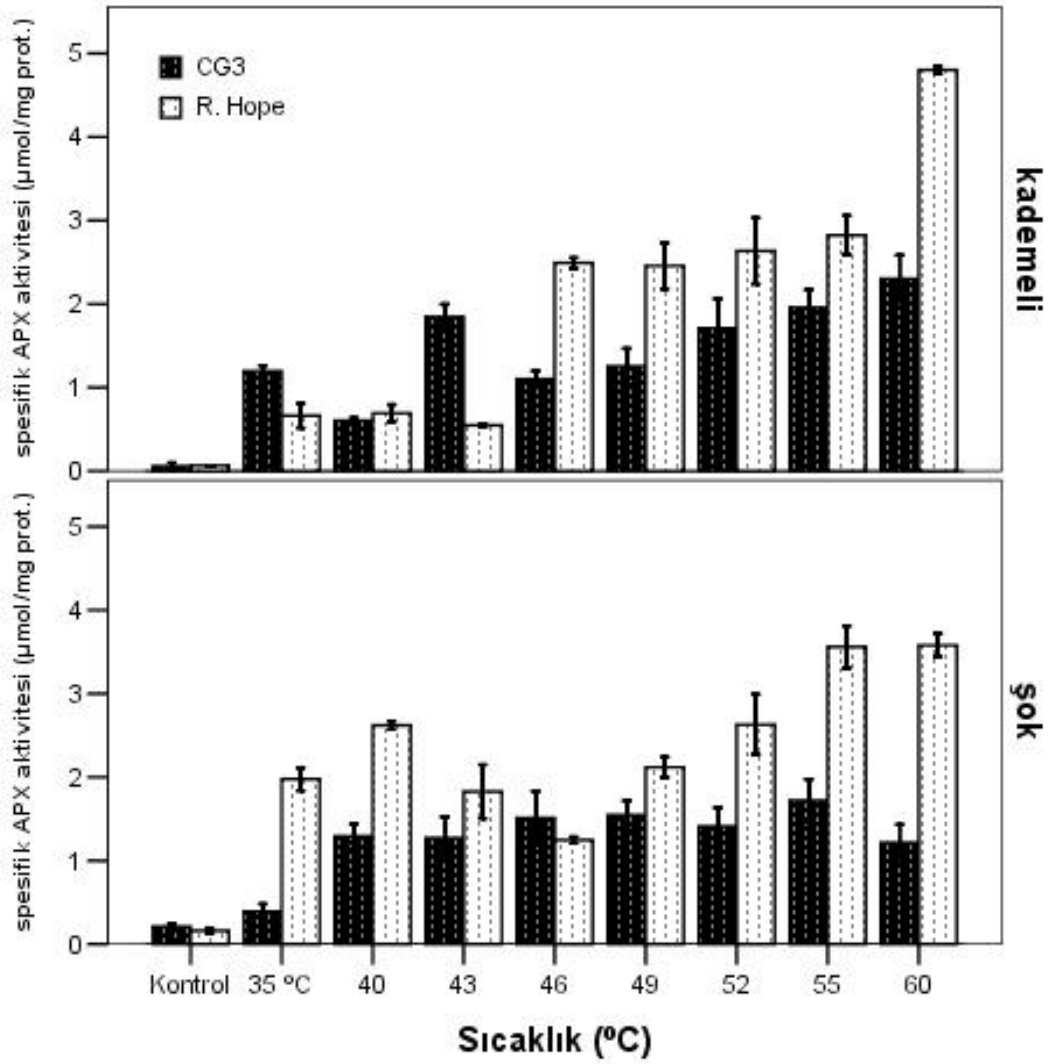
4.5.1. Askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Şekil 4.6. genel olarak incelendiğinde, uygulanan kademeli ve şok yüksek sıcaklıkların, askorbat peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin farklı olduğu gözlenmiştir. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında 40°C'ye kadar her iki çeşitte de aktivitede belirgin bir artış görülmezken, şok yüksek sıcaklık uygulamasında aktivite artışının 35°C'de başladığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.6. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi (µmol / gTA). Dikey barlar tekerrürlerin ± SS'lerini göstermektedir.

Şok yüksek sıcaklık uygulamasında enzim aktivitesinin kademeli yüksek sıcaklık uygulamasına göre daha fazla olduğu ve çeşitlere bakıldığında aktivitenin R. Hope çeşidinde CG3'e göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Sıcaklık uygulamaları*çeşit, sıcaklık uygulamaları*sıcaklıklar, çeşit*sıcaklıklar, sıcaklık uygulamaları*çeşit*sıcaklıklar interaksiyonları istatistiki olarak önemli bulunmuştur (EK-6).



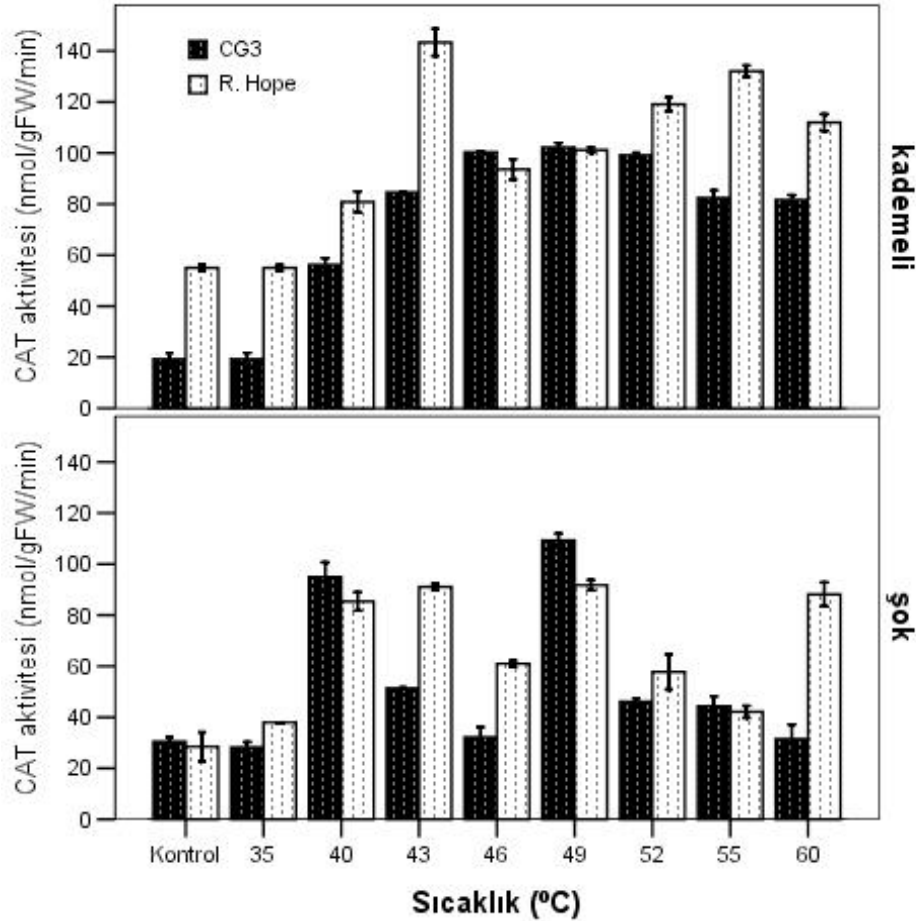
Şekil 4.7. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin spesifik askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi (µmol / mg prot.). Dikey barlar tekrürlerin ± SS'lerini göstermektedir.

Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında spesifik askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin 46°C'den itibaren sıcaklık artışına paralel olarak arttığı belirlenmiştir. Şok

yüksek sıcaklık uygulamasında ise enzim aktivitesi 35°C'den itibaren artmaya başlamıştır. Genel olarak tüm sıcaklık derecelerinde ve uygulamaların her ikisinde de spesifik askorbat peroksidaz aktivitesi R. Hope çeşidinde CG3'e daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.7.). Sıcaklık uygulamaları*çeşit, sıcaklık uygulamaları*sıcaklıklar, çeşit*sıcaklıklar, sıcaklık uygulamaları*çeşit*sıcaklıklar interaksiyonları istatistiki olarak önemli bulunmuştur (EK-7).

4.5.2. Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin belirlenmesi

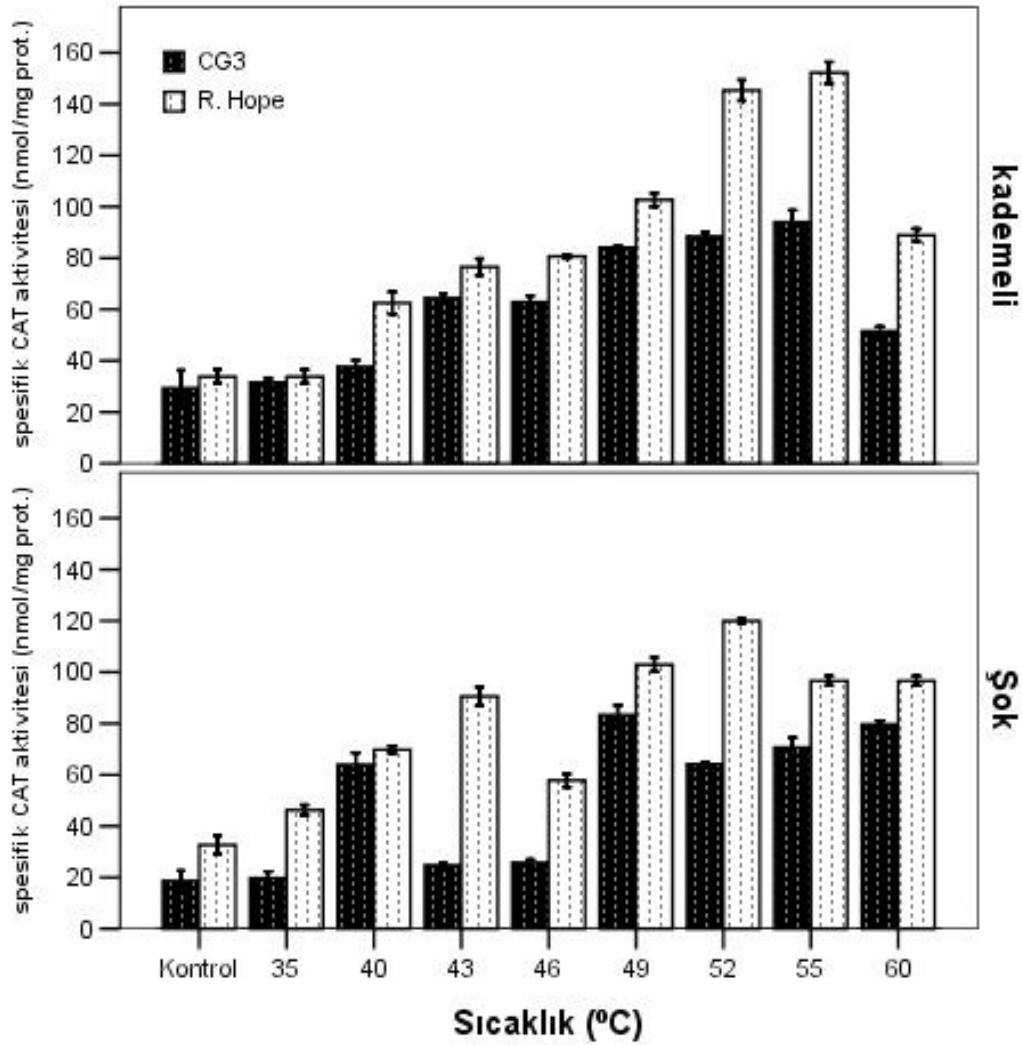
Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarında sıcaklıklara göre çilek çeşitlerinin CAT aktiviteleri Şekil 4.8.'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin katalaz (CAT) enzim aktivitesi (nmol/gTA/dak.). Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS'lerini göstermektedir.

Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında çeşitlerin katalaz enzim aktivitesinin çok yüksek sıcaklık uygulamasına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çeşitlerin enzim aktivitesine bakıldığında ise kademeli ve çok yüksek sıcaklık uygulamalarının her ikisinde de R. Hope çeşidinde CG3 çeşidine göre aktivitenin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sıcaklık uygulamaları*çeşit, sıcaklık uygulamaları*sıcaklıklar, çeşit*sıcaklıklar, sıcaklık uygulamaları*çeşit*sıcaklıklar interaksyonları istatistiki olarak önemli bulunmuştur (EK-8).

Şekil 4.9.'a bakıldığında, çeşitlerin spesifik katalaz enzim aktivitesi kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında çok yüksek sıcaklık uygulamasına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

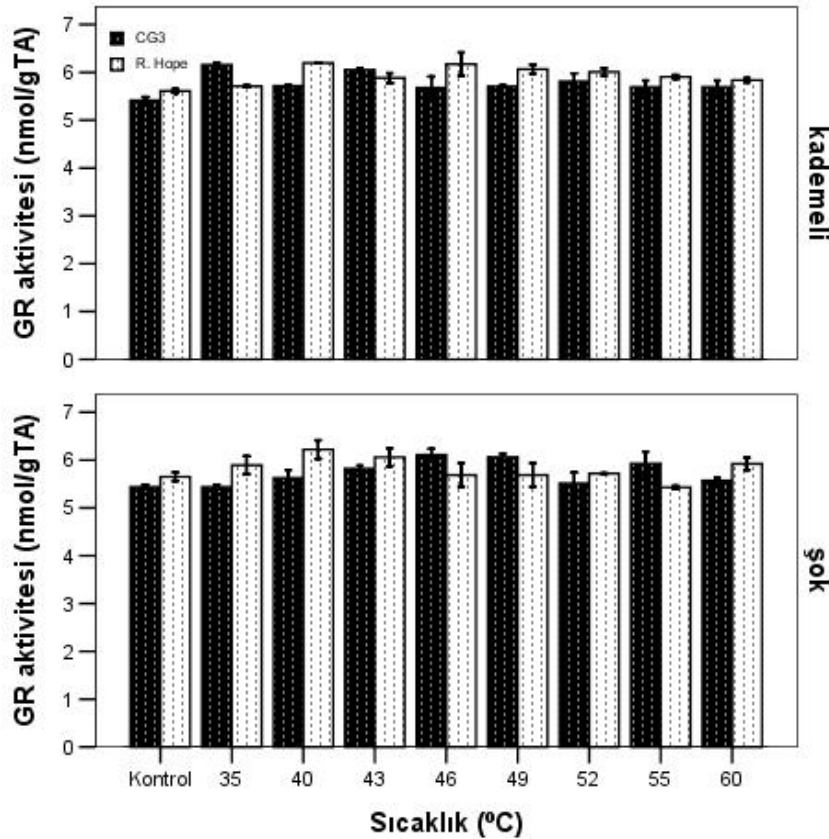


Şekil 4.9. Kademeli ve çok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin spesifik katalaz (CAT) enzim aktivitesi (nmol/mg prot.). Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS'lerini göstermektedir.

Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında spesifik katalaz enzim aktivitesi artışı doğrusal olarak gerçekleşmiş ancak 60 °C’de biraz düşüş göstermiştir. Şok yüksek sıcaklık uygulamalarında da aktivitenin sıcaklıklara bağlı olarak artış gösterdiği gözlenmiştir. R. Hope çeşidinin spesifik katalaz aktivitesinin, CG3 çeşidine göre kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarının her ikisinde de daha yüksek olduğu görülmüştür. Sıcaklık uygulamaları*çeşit, sıcaklık uygulamaları*sıcaklıklar, çeşit*sıcaklıklar, sıcaklık uygulamaları*çeşit*sıcaklıklar interaksiyonları istatistiki olarak önemli bulunmuştur (EK-9).

4.5.3. Glutasyon redüktaz (GR) enzim aktivitesinin belirlenmesi

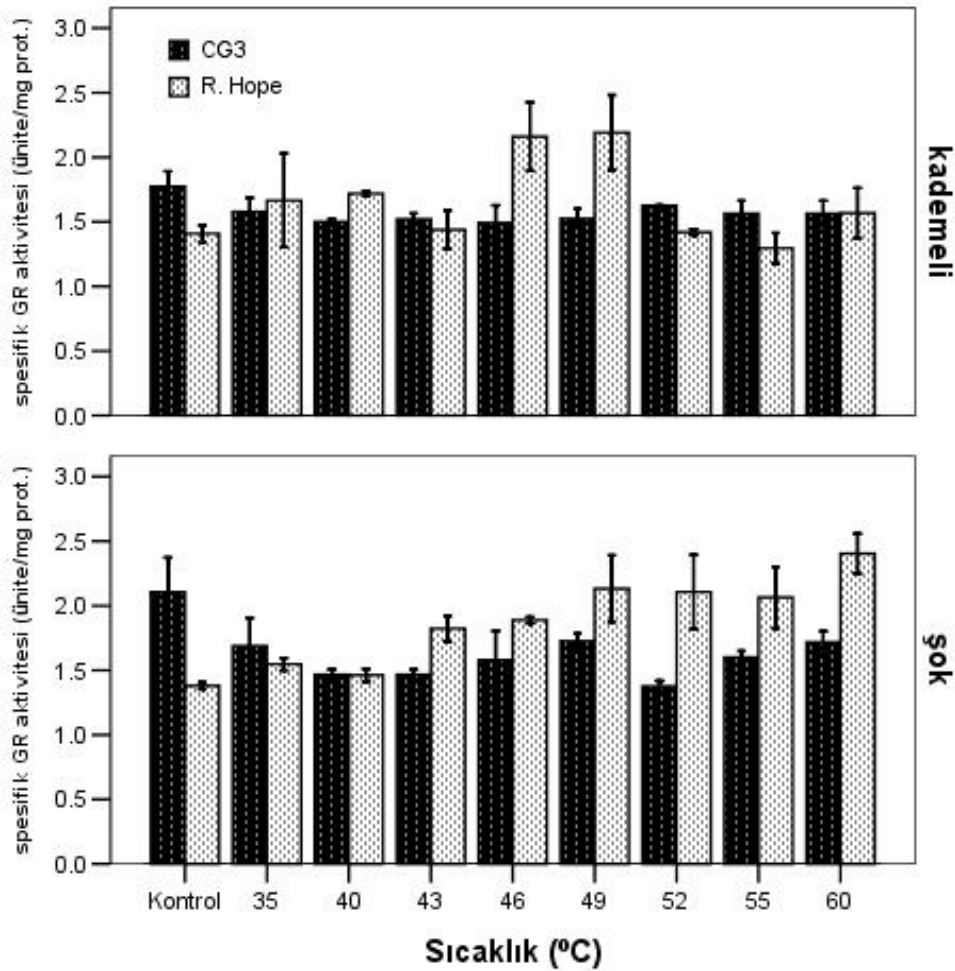
Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında, sıcaklık derecelerine bağlı olarak çeşitlerin GR enzim aktivitesinde önemli bir farklılık tespit edilememiştir.



Şekil 4.10. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin glutasyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi (nmol/g TA). Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS'lerini göstermektedir.

Benzer şekilde şok yüksek sıcaklık uygulamasında da sıcaklık değişimlerine karşı çeşitlerdeki GR aktivitesinde belirgin bir farklılık olmamıştır (Şekil 4.10.). Sıcaklık uygulamaları*çeşit interaksyonu önemsiz, sıcaklık uygulamaları*sıcaklıklar, çeşit*sıcaklıklar, sıcaklık uygulamaları*çeşit*sıcaklıklar interaksyonları istatistiki olarak önemli bulunmuştur (EK-10).

Şekil 4.11.'e bakıldığında, kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarının her ikisinde de çeşitlerin spesifik GR enzim aktivitesinin farklı olduğu tespit edilmiştir.



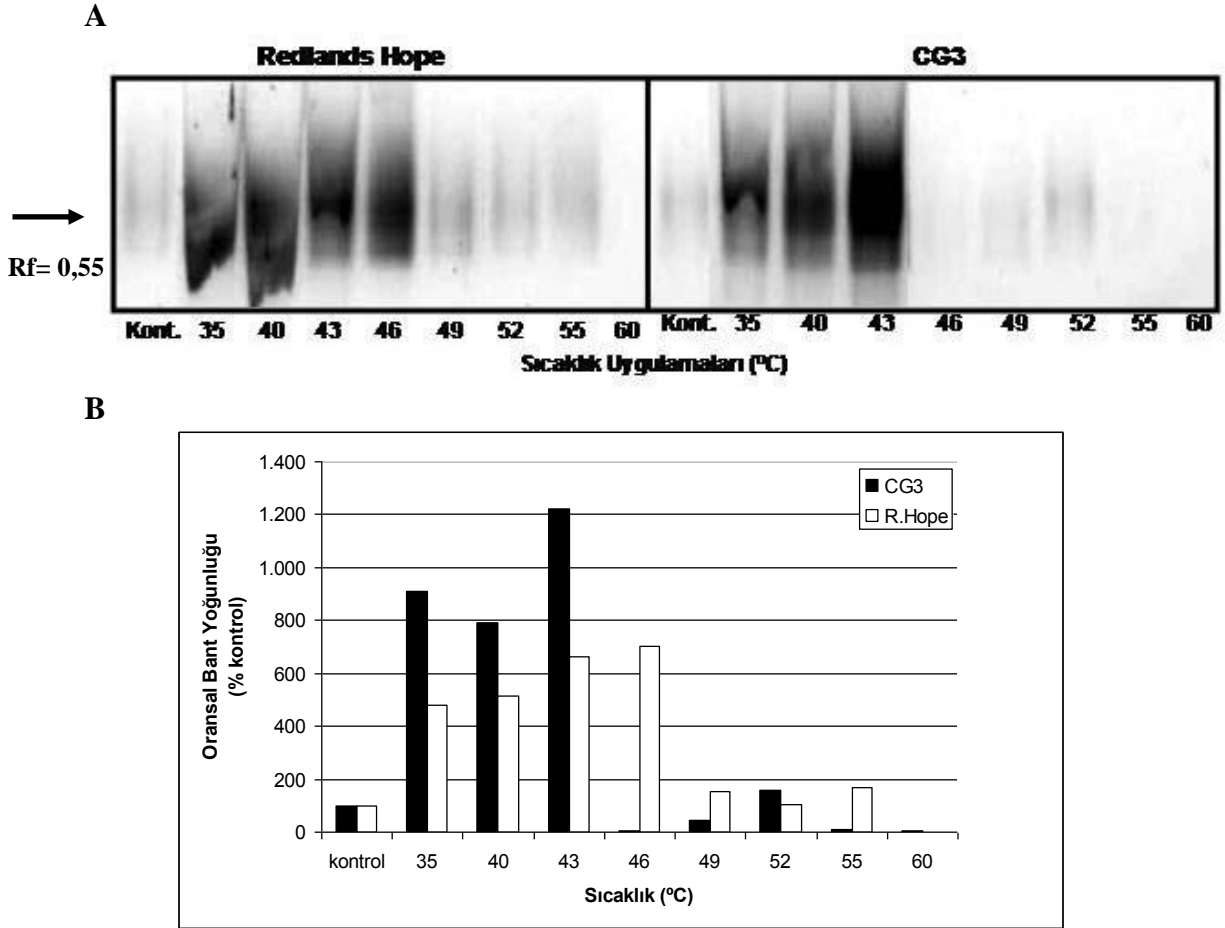
Şekil 4.11. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin spesifik glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi (nmol/ ünite/ mg prot.). Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS'lerini göstermektedir.

Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında R. Hope çeşidinin spesifik GR enzim aktivitesi 46 ve 49 °C'lerde yüksek bulunurken, şok yüksek sıcaklık uygulamasında ise

yine aynı çeşidin spesifik GR enzim aktivitesinin 43, 46, 49, 52, 55 ve 60 °C’lerde yüksek olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık uygulamaları*çeşit, sıcaklık uygulamaları*sıcaklıklar, çeşit*sıcaklıklar, sıcaklık uygulamaları*çeşit*sıcaklıklar interaksyonları istatistiki olarak önemli bulunmuştur (EK-11).

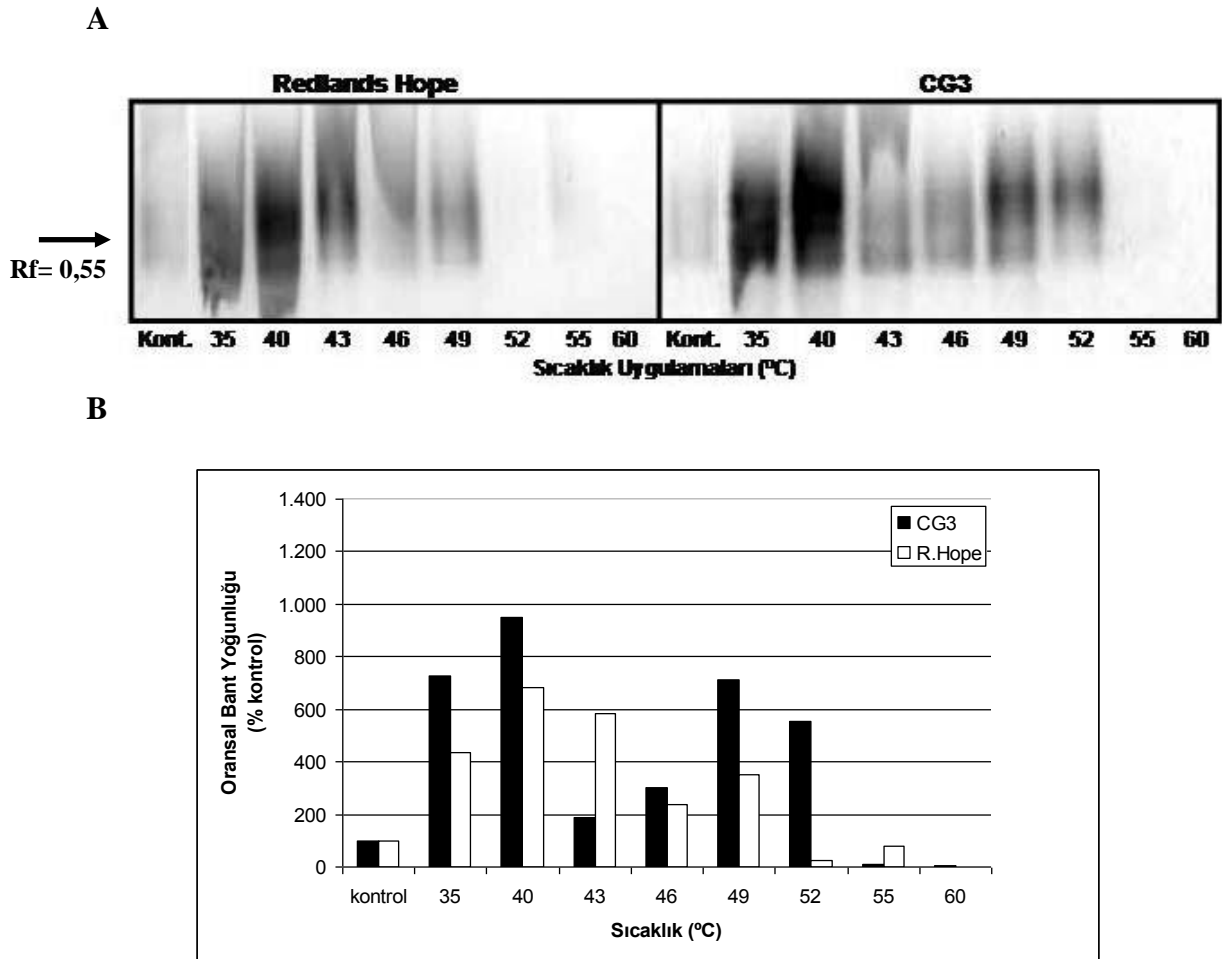
4.5.4. Peroksidaz (PRX) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarının iki çilek çeşidinin yaprak dokularındaki peroksidaz aktivitesinin belirlenmesinde asidik peroksidazlara rastlanmazken bazik peroksidazlar görüntülenmiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamalarının R. Hope ve CG3 çilek çeşitlerinin peroksidaz (PRX) enzim aktivitesine etkileri. A: Bazik PRX aktivitesi; B: Rf=0,55 olarak belirlenen bazik PRX bandının aktivite yoğunluğu.

Dolayısıyla bazik peroksidazlara ait sonuçlar burada sunulmuştur. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin bazik peroksidaz jel profilleri ve kontrol bitkileri baz alınarak hesaplanan bant yoğunluğu %'leri görülmektedir. Sonuçlara bakıldığında kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında bazik peroksidazlar ($R_f=0,55$) farklı yoğunlukta olmakla birlikte her iki çeşit ve yüksek sıcaklık derecelerinde görülmüştür (Şekil 4.12.). Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında, CG3 çeşidinin oransal bant yoğunluğunun 46°C'ye kadar arttığı bu sıcaklık derecesinden sonra ise azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, R. Hope çeşidinde 49°C'ye kadar arttığı ve 49°C'den itibaren azaldığı tespit edilmiştir. CG3 çeşidinin peroksidaz aktivitesinin 35, 40, ve 43°C'lerde R. Hope çeşidine göre fazla olduğu görülmüştür. CG3 çeşidinin peroksidaz aktivitesinin 55 °C'de, R. Hope çeşidinin peroksidaz aktivitesinin ise 60 °C'de hemen hemen yok olduğu gözlenmiştir.



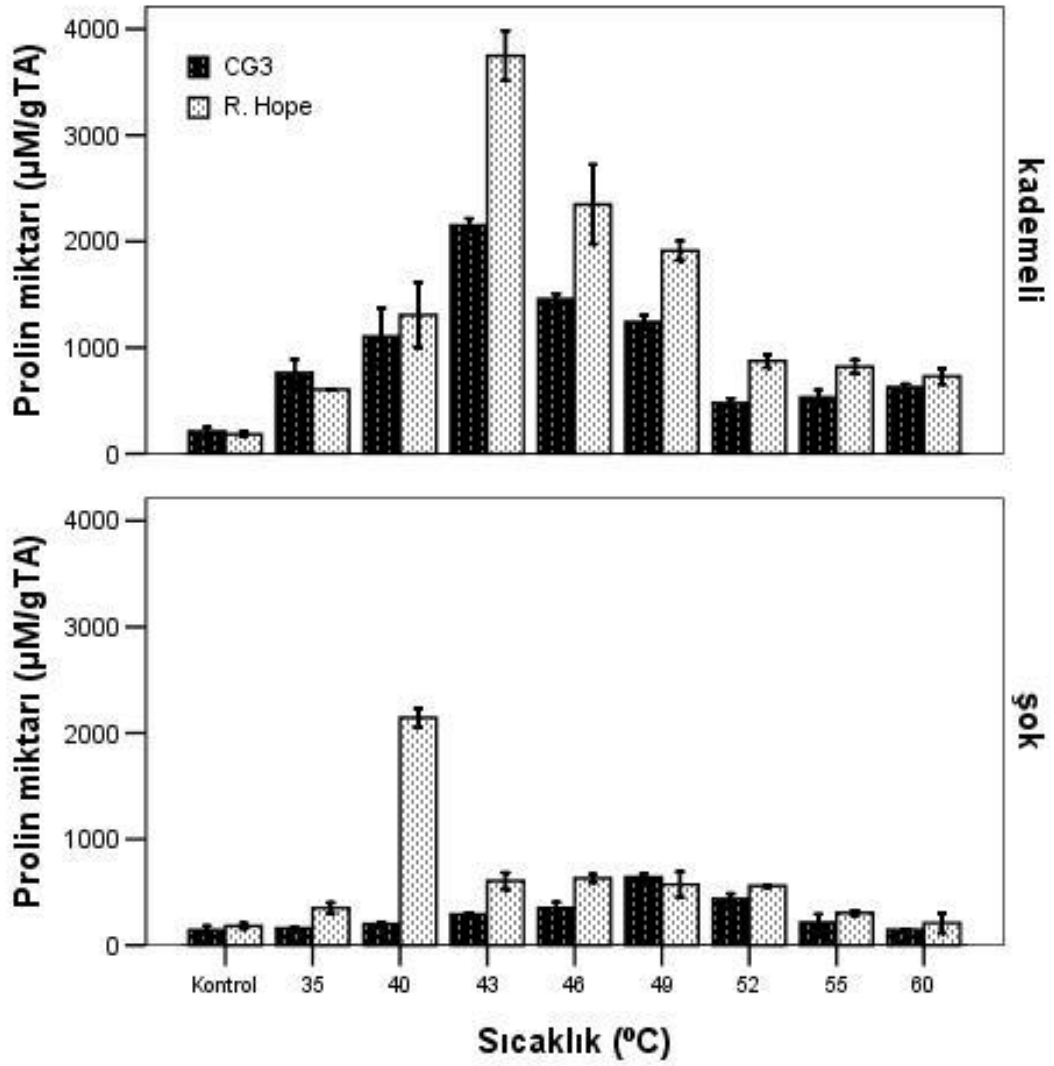
Şekil 4.13. Şok yüksek sıcaklık uygulamalarının R. Hope ve CG3 çilek çeşitlerinin peroksidaz (PRX) enzim aktivitesine etkileri. A: Bazik PRX aktivitesi; B: $R_f=0,55$ olarak belirlenen bazik PRX bandının aktivite yoğunluğu.

Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında görülen bazik peroksidazlar ($R_f=0,55$) farklı yoğunlukta olmakla birlikte şok yüksek sıcaklık uygulamasında da gözlenmiştir. CG3 çeşidinin oransal bant yoğunluğu 35 ve 40°C'lerde artmıştır. Bu yoğunluk 43°C ve 46°C'lerde azalma gösterdikten sonra, 49°C ve 52°C'lerde tekrar artmış ve bu sıcaklık derecesinden sonra ise belirgin bir şekilde düşmüştür (Şekil 4.13.). R. Hope çeşidinde ise, bazik peroksidazlara ait oransal bant yoğunluğunun 43°C'ye kadar arttığı ve bu sıcaklıktan itibaren azaldığı tespit edilmiştir. Her iki çeşitte de 60°C'lik uygulamada bazik peroksidaz aktivitesinin neredeyse kaybolduğu gözlenmiştir.

4.6. Protein Analizleri

4.6.1. Prolin miktarı

Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamaları karşılaştırıldığında, kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında prolin miktarının şok yüksek sıcaklık uygulamasına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14.). Çeşitlerin prolin miktarına bakıldığında, her iki uygulamada da R. Hope çeşidinin prolin miktarının CG 3 çeşidine göre yüksek bulunduğu gözlenmiştir. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında çeşitlerin prolin miktarı 43°C'ye kadar artış göstermiş, 43°C'den sonra düşmüştür. Şok sıcaklık uygulamasında ise, R. Hope çeşidinin prolin miktarı 43°C'de belirgin bir artış gösterdikten sonra sıcaklık artışına bağlı olarak azalmıştır. CG3 çeşidinin prolin miktarı 49°C'ye kadar artmış, 49°C'den sonra azalmaya başlamıştır. Sıcaklık uygulamaları*çeşit, sıcaklık uygulamaları*sıcaklıklar, çeşit*sıcaklıklar, sıcaklık uygulamaları*çeşit*sıcaklıklar interaksiyonları istatistiki olarak önemli bulunmuştur (EK-12).

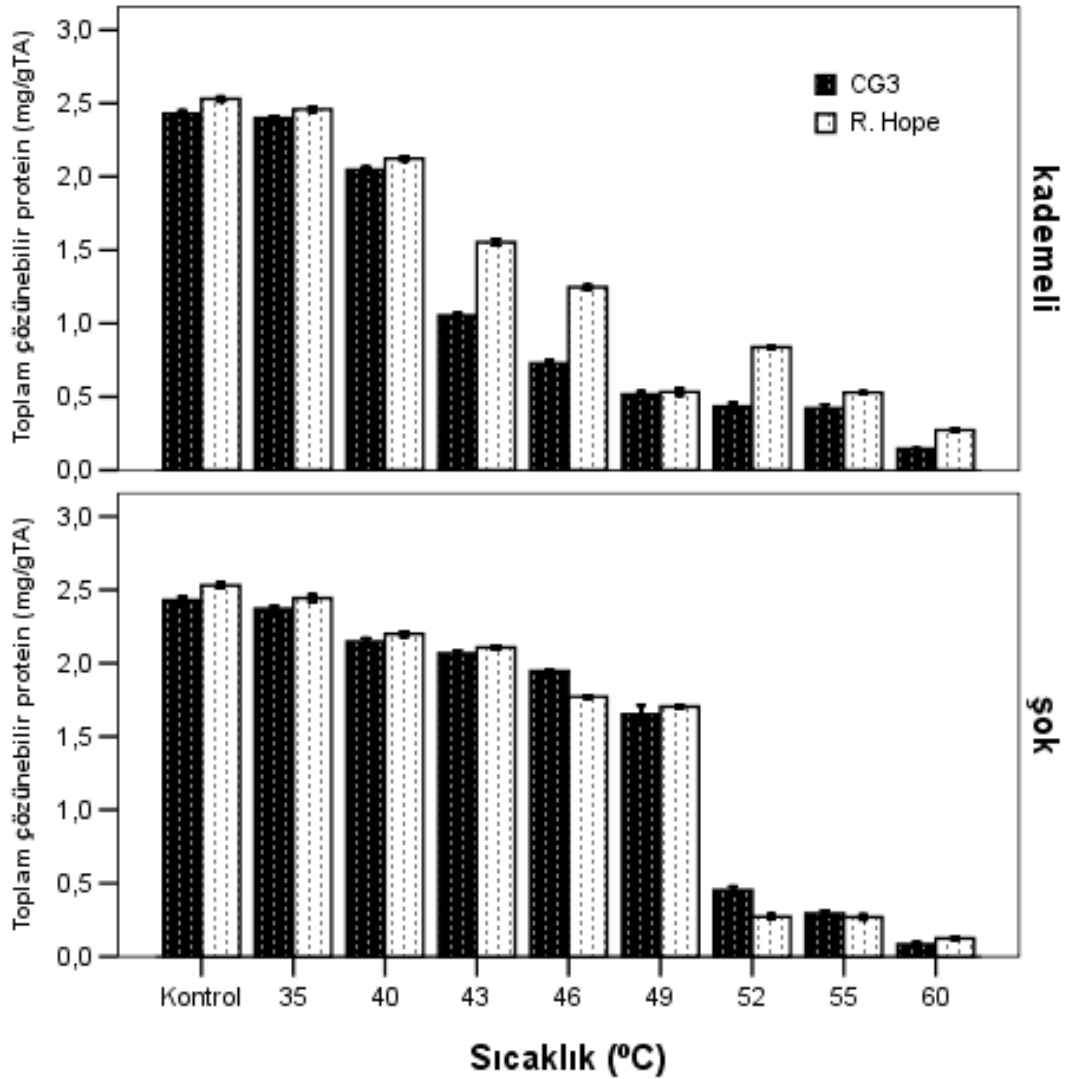


Şekil 4.14. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin prolin miktarı ($\mu\text{M/g TA}$). Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS'lerini göstermektedir.

4.6.2. Toplam çözünebilir protein miktarı

Şekil 4.15. genel olarak incelendiğinde; uygulanan kademeli ve şok yüksek sıcaklıkların, toplam protein miktarı üzerine etkisinin farklı olduğu gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmada kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında kontrol ve 35°C'ler arasında çeşitlerin protein miktarları arasında istatistiksel olarak bir fark görülmezken, 35°C'den sonra protein miktarının azalmaya başladığı ve CG3 çeşidinin toplam protein miktarının bütün sıcaklık uygulamalarında R. Hope çeşidine göre daha az olduğu belirlenmiştir. Şok yüksek sıcaklık uygulamasında çeşitlerin toplam protein miktarı,

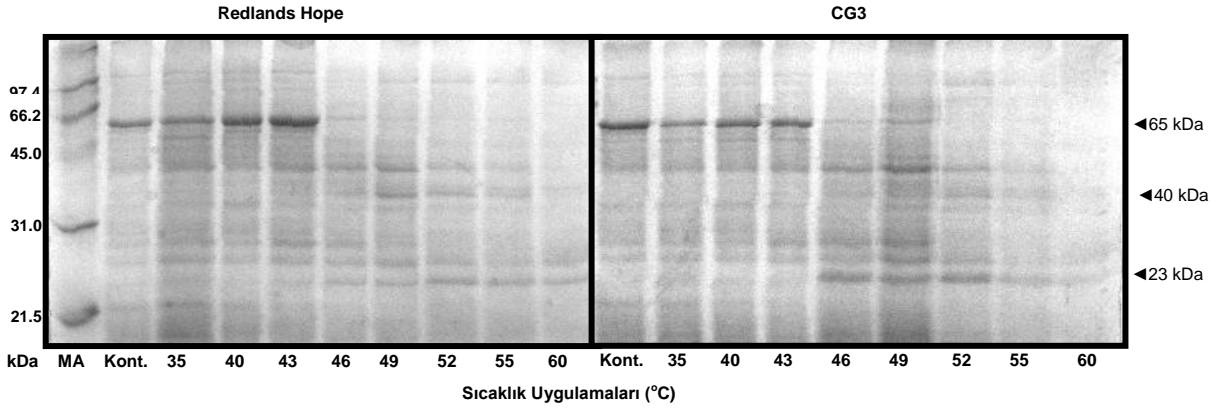
49°C'ye kadar çok belirgin olmamakla beraber azalma göstermiştir. Ancak, 49°C'den sonra protein miktarında ani bir şekilde düşüş gözlenmiştir. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında olduğu gibi çeşitlerin protein miktarı karşılaştırıldığında, genel olarak R. Hope çeşidinin protein miktarının CG3'e göre daha fazla olduğu görülmüştür. Sıcaklık uygulamaları*çeşit, sıcaklık uygulamaları*sıcaklıklar, çeşit*sıcaklıklar, sıcaklık uygulamaları*çeşit*sıcaklıklar interaksiyonları istatistiki olarak önemli bulunmuştur (EK-13).



Şekil 4.15. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin toplam çözünebilir protein miktarı (mg/gTA). Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS'lerini göstermektedir.

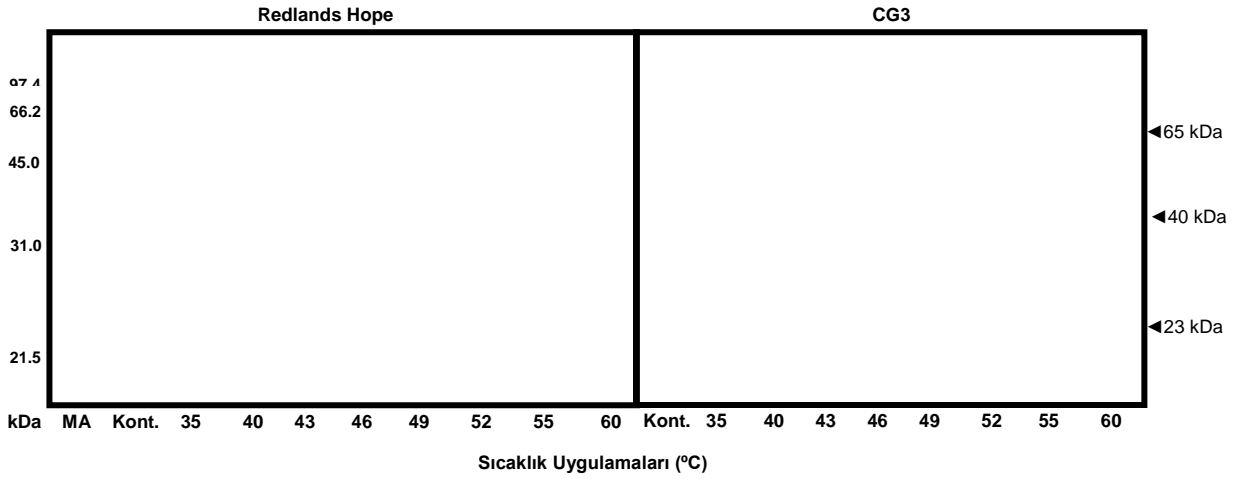
4.6.3. SDS-PAGE

Şekil 4.16'da kademeli yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak R. Hope ve CG3 çeşidinin toplam protein profilleri gösterilmiştir. Çeşitlerin profili incelendiğinde; kontrol, 35, 40 ve 43°C'lerde yaklaşık 65 kDa büyüklüğünde, muhtemelen yapısal proteinlerden oluşan bir protein bandı gözlenirken, aynı bant 46, 49, 52, 55 ve 60°C'lerde gözlenememiştir. Bunun yanında; yaklaşık 40 kDa büyüklüğünde bir protein bandı R. Hope'da 49, 52 ve 55°C'lerde, CG3'te ise 49 ve 52°C'de belirlenmiştir. Ayrıca, R. Hope'da 43°C'den, CG3'te ise 46°C'den itibaren yaklaşık 23 kDa büyüklüğünde bir diğer protein bandı saptanmıştır.



Şekil 4.16. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin SDS-PAGE protein profilleri. MA: Moleküler ağırlık standardı (kDa).

Şekil 4.17. incelendiğinde şok sıcaklık uygulamasının kademeli sıcaklık uygulamasına göre çeşitlerin toplam protein profillerine etkisinin farklı olduğu belirlenmiştir. R. Hope ve CG3 çeşidinde, kontrol, 35, 40, 43, 46 ve 49°C'lerde, kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında da gözlenen yaklaşık 65 kDa büyüklüğünde protein bandı belirlenmiştir. Bu bant daha yüksek sıcaklıklarda gözlenememiştir. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında gözlenen 40 kDa'luk protein bandı R. Hope'da 49, 52 ve 55°C'lerde görülürken CG3'te ise 49 ve 52°C'de görülmüştür. Varlığı kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında da tespit edilen 23 kDa'luk protein bandı, yoğunluğu daha düşük olmakla birlikte şok yüksek sıcaklık uygulamasında da saptanmıştır.

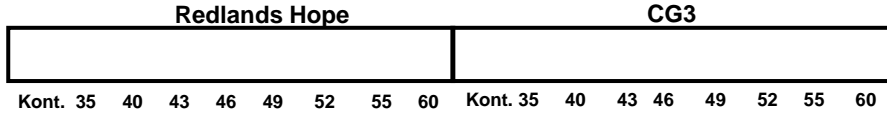


Şekil 4.17. Şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinin SDS-PAGE protein profilleri. MA: Moleküler ağırlık standardı (kDa).

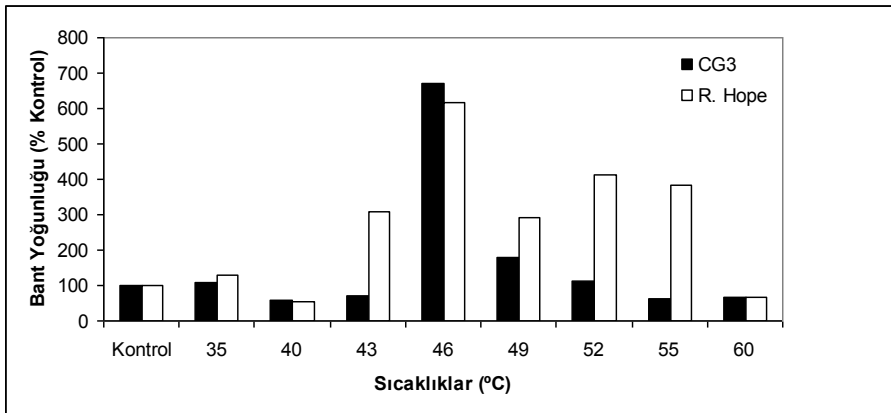
4.6.4. İmmunoblot (Western blot) analizi

İmmunoblot analizleri sonucunda, kullanılan HSP 70 antikoruna ile çilek yaprak dokularında yüksek sıcaklık stresine bağlı olarak herhangi bir proteinin varlığı saptanamamıştır. Dolayısıyla burada HSP 60 antikoruna uygulamalarının sonuçlarına yer verilmiştir.

a)



b)

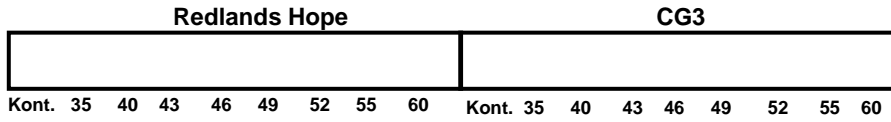


Şekil 4.18. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinde 23 kDa HSP 60 proteininin görünümü (a) ve 23 kDa ısı şoku proteininin bant yoğunluğu (b).

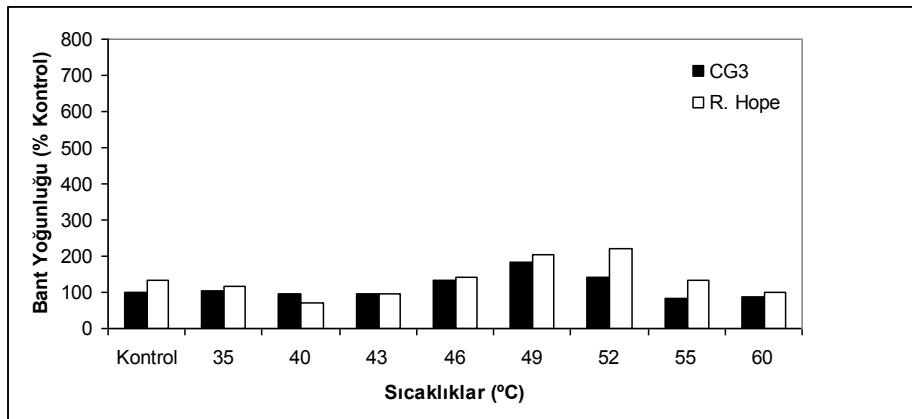
Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasına bağlı olarak belirlenen ısı şoku proteininin durumu Şekil 4.18’de gösterilmiştir. Buna göre, yoğunluğu çeşitlere ve yüksek sıcaklık derecesine göre değişen yaklaşık 23 kDa’luk bir HSP 60 proteini tespit edilmiştir. Şekil 4.18.’de görüldüğü gibi, 23 kDa HSP 60 proteinin R. Hope’da kontrol, 35 ve 40°C’lerde düşük yoğunluklarda olduğu, 43°C’den itibaren yoğunluğun artmaya başladığı, 46°C’de en yüksek düzeye ulaştığı 49, 52 ve 55°C’lerde azalmaya başladığı ve 60°C’de ise minimum seviyeye düştüğü belirlenmiştir. CG3’te ise yoğunluğun 46°C’de arttığı 49 ve 52°C’lerde yavaş yavaş azalmaya başladığı, 55 ve 60°C’lerde ise protein sentezinin oldukça gerilediği gözlenmiştir. Genel olarak tüm sıcaklık derecelerinde R. Hope çeşidindeki HSP 60 sentezinin CG3’e göre daha yoğun olduğu gözlenmiştir.

Şekil 4.19’da şok yüksek sıcaklık uygulamasına bağlı olarak Western blot analizleri sonucu saptanan ısı şoku proteininin durumu gösterilmiştir. Buna göre, yoğunluğu çeşitlere ve yüksek sıcaklık derecesine göre değişen yaklaşık 23 kDa’luk HSP 60 proteininin varlığı tespit edilmiştir.

a)



b)



Şekil 4.19. Şok yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak çilek çeşitlerinde 23 kDa HSP 60 proteininin görünümü (a) ve 23 kDa ısı şoku proteinin bant yoğunluğu (b).

Şekil 4.19. incelendiğinde, 23 kDa HSP 60 proteinin her iki çeşitte de kontrol, 35, 40 ve 43°C'lerde düşük yoğunluklarda olduğu, 46°C'den itibaren yoğunluğun artmaya başladığı belirlenmiştir. Protein sentezinin, R. Hope'da 52°C'ye kadar artış gösterdiği ve 55 ve 60°C'lerde azaldığı belirlenmiştir. CG3'te ise, sentezin 49°C'de en yüksek düzeye ulaştığı ve sonraki sıcaklıklarda giderek azaldığı tespit edilmiştir. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında olduğu gibi şok yüksek sıcaklık uygulamasında da tüm sıcaklık derecelerinde R. Hope çeşidindeki HSP 60 sentezinin CG3'e göre daha yoğun olduğu gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bahçe bitkileri yetiştiriciliğinde, bitki tür veya çeşitlerinin yetiştirilmesini sınırlayan en önemli çevresel faktörlerin başında sıcaklık gelmektedir. Son yıllarda artan küresel ısınma ile birlikte sıcaklık stresi, özellikle ılıman iklim bölgelerinde verim ve kuru madde oranı kayıplarının en önemli nedenleri arasında yer almaktadır (Levitt 1980, Giaveno ve Ferrero 2003, Wahid ve ark. 2007). Bu yüzden, bitkilerde türler hatta çeşitlerin yüksek sıcaklığa toleranslarının belirlenmesi gelecekte yüksek sıcaklığa tolerant tür ve çeşitlerin geliştirilmesi ve verimli bir yetiştiricilik yapılabilmesi açısından önem arz etmektedir. İliman iklim bitkisi olarak 10-26°C'ler arasında optimum gelişme gösteren, açık alanlarda ve örtü altında yetiştirilen çilek bitkisi de sık sık yüksek sıcaklığa maruz kalmaktadır. Pek çok bitki türünde olduğu gibi çilek bitkisinin yüksek sıcaklığa toleransı konusunda da mevcut bilgiler yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, mevcut tez çalışmasında çilek bitkisinde yüksek sıcaklığa tolerans bakımından genotipsel farklılıkların fizyolojik ve moleküler biyolojik düzeyde ortaya konmasının yanısıra bitkilerin yüksek sıcaklığa alışma durumları incelenmiştir.

Bitkilerde stresten sonra hücrelerde meydana gelen geri dönüşümsüz zararlanmaların ilk belirtisi hücre zarında oluşmaktadır. Bu zararın iyon sızıntısı yöntemiyle ölçülmesi bitkinin strese toleransının belirlenmesinde çok önemlidir ve sıcaklık stresi başta olmak üzere birçok stres faktörüne karşı toleransın tespitinde kullanılmaktadır (Arora ve ark. 1992, Liu ve Huang 2000, Anderson 2002, Gülen ve Eriş 2003, 2004). Stres sırasında hücrede biriken H₂O₂ miktarı hücresel zararlanmanın bir diğer göstergesidir. Bu çalışmada da iyon sızıntısına bağlı olarak hücresel zararlanmanın sıcaklık artışına paralel olarak arttığı, kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında her iki çeşidin zararlanma oranı 43°C'den şok sıcaklık uygulamasında ise 49°C'den itibaren artmaya başladığı belirlenmiştir. Bu durum kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında örneklerin yüksek sıcaklığa daha uzun süre maruz kalmalarından kaynaklanabilmektedir. Aynı şekilde sıcaklık artışına paralel olarak H₂O₂ birikiminin arttığı, ancak zararlanma oranında olduğu gibi kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında örneklerin yüksek sıcaklığa maruz kalma sürelerine bağlı olarak H₂O₂ miktarlarının şok sıcaklık uygulamasına göre daha yüksek seviyelerde olduğu görülmüştür. Hücresel

zararlanmanın kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarının her ikisinde de iyon sızıntısı ve H₂O₂ birikiminin yüksek sıcaklığa hassas olan CG3 çeşidinde tolerant olan R. Hope çeşidine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Gülen ve Eriş (2003) ‘Camarosa’ çilek çeşidinde yaptıkları araştırmada kademeli yüksek sıcaklık uygulaması yapılan bitkilerdeki zararlanma oranının şok yüksek sıcaklık uygulamasına göre daha düşük olduğunu, bunun nedeninin de bitkilerin kademeli sıcaklıkta termotolerans kazanmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Daha önce yapılan çalışmalarda olduğu gibi (Gülen ve ark., 2007; Kesici, 2009), her iki sıcaklık uygulamasında da CG3 çeşidindeki hücresel zararlanmanın R. Hope çeşidine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Enzimatik olmayan antioksidanlardan AsA elektron verebilme kabiliyeti nedeniyle pek çok ROS’un temizleyicisidir. GSH, stres durumunda oluşan serbest radikallerle reaksiyona girerek enzimlerin SH gruplarının okside olmasını önler. Bu antioksidanlar stresin oluşturabileceği hasarı gidermede rol oynamaktadırlar (Foyer, 1993, Lamb ve Dixon 1997). AsA miktarı kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarına göre değişim göstermekle birlikte herhangi bir artış veya azalış eğilimi göstermemiştir. Bunun nedeni, hücrede ROS’ların birikimiyle ve bunların ortamdan uzaklaştırılmalarında başka savunma mekanizmalarının da devreye girmesi ile ilgili olabilmektedir. Yine GSH miktarının yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak artmasının nedeni de ortamdaki ROS’ların seviyesinin artmasından ve hücrenin buna tepki olarak koruyucu antioksidanlardan GSH üretimini arttırmasından kaynaklanabilmektedir. GSH miktarının genelde CG3 çeşidinde daha yüksek miktarlarda bulunması bu olasılığı güçlendirmektedir. Benzer şekilde fasulyede yüksek sıcaklık stresi, bürülcede ise kuraklık stresi sonucu bitkilerde AsA seviyelerinin arttığı ve artışın tolerant genotiplerde belirgin bir biçimde ortaya çıktığı belirtilmiştir (Nagesh Babu ve Devaraj 2008, Nair ve ark. 2008). Bezelye ve mısırdaki ise yüksek sıcaklık uygulamalarının GSH miktarını arttırdığı belirlenmiştir (Nieto-Sotelo ve Ho, 1986).

Enzimatik antioksidanlardan APX, yüksek bitkilerin kloroplastlarında SOD tarafından üretilen H₂O₂’nin temizlenmesinden; yine aynı şekilde CAT’lar da hücrelerde yüksek sıcaklık stresi sırasında önemli miktarlarda biriken ve hücre için toksik etkileri bulunan

H₂O₂'yi oksijen ve suya dönüştürerek, zararlı etkilerinin ortadan kaldırılmasından sorumludurlar (Asada 1992). Enzimlerin tiyol gruplarını koruyan GSH, NADPH'a bağlı reaksiyon olarak GR tarafından yenilenmektedir (Arora ve ark. 2002). PRX'ler, H₂O₂'yi kullanarak çok sayıda aromatik bileşenlerin dehidrojenasyonunu katalizlerler ve SOD ve CAT'larla birlikte bitki hücrelerinde koruyucu enzim kompleksinin parçasını oluştururlar (Bergmeyer ve Grabl 1983, Bakardjieva ve Christov 1996). Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında iki çeşidin de APX aktivitesi 46 ve 49°C'de artış göstermiş daha sonra azalmaya başlamıştır. Benzer şekilde CAT aktivitesi de R. Hope çeşidinde 43°C'de en yüksek düzeye ulaştıktan sonra 46 ve 49°C'lerde bitkilerin yüksek sıcaklıklara alışmasıyla aktivitede bir miktar azalma görülmüştür. Ancak, daha yüksek sıcaklıklarda ise zararlanma oranının ve ROS'ların yoğun olarak artmasıyla birlikte aktivite tekrar artmıştır. CG3'te ise 49°C'de en yüksek düzeye ulaşan CAT aktivitesi daha yüksek sıcaklıklarda giderek azalmıştır. Bu durum CG3 çeşidinin artan sıcaklıklara alışmamasından kaynaklanmaktadır. Şok sıcaklık uygulamasında ise enzim aktiviteleri belirgin bir artma veya azalma eğilimi göstermemişlerdir. GR enzim aktivitesinde uygulama şekline ve sıcaklıklara göre bir değişiklik saptanamaması, bu enzimin çilek bitkisinde antioksidatif savunma mekanizmasında etkin bir rolünün bulunmadığını göstermektedir. PRX aktivitesinin özellikle kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında 35, 40 ve 43°C'lerde yoğun olması ve daha sonra aktivitenin giderek azalması çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklığa tepkilerin ilk olarak bu enzimle başladığını devamında ise diğer enzimlerle (APX ve CAT) devam ettiğini düşündürmektedir. Yine aktivitenin CG3 çeşidinde daha yoğun olması bu çeşitteki ROS birikiminin daha fazla olmasından kaynaklanabileceğini göstermektedir. Bu çalışmadakine benzer şekilde birçok bitki türünde yüksek sıcaklık stresi koşullarında, uygulama sıcaklığı ve süresi ile birlikte APX aktivitesinin artış gösterdiği belirlenmiştir (Chaitanya ve ark. 2001, Anderson 2002, Almeselmani ve ark. 2006, Yin ve ark. 2008). Dutta ve zambaklarda yapılan çalışmada artan sıcaklık ve sıcaklık süresi ile birlikte CAT aktivitesinin de arttığı (Chaitanya ve ark. 2001, Yin ve ark. 2008), ancak bunun aksine uzun çayırotu, mavi çim ve biberde yüksek sıcaklık koşullarında CAT aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (Jiang ve Huang 2001, Anderson 2002). Yüksek sıcaklık stresi sırasında pek çok bitki türünde GR aktivitesinin arttığı bildirilmesine rağmen (Kurganova ve ark. 1999, Chaitanya ve ark. 2001, Kocsy ve ark. 2004), bazı türlerde kontrole göre değişmediği

(Yin ve ark. 2008) ya da azaldığı (Jiang ve Huang 2001) bildirilmiştir. ‘Camarosa’ çilek çeşidinde yapılan çalışmada ise, 45°C’ye kadar PRX aktivitesinin sıcaklık artışına bağlı olarak arttığı rapor edilmiştir (Gülen ve Eriş 2004).

Yüksek sıcaklığa adaptasyon konusunda ileri sürülen hipotezlerden biri de, protein teşviki ve farklılaşmış protein fonksiyonunu kapsayan bazı mekanizmaların varlığıdır (Teeri 1980). Bitkilerde, strese karşı savunmada rol oynayan protein metabolizmasında bazı aminoasitlerin rolü büyüktür. Bir aminoasit olan prolinin hücrede koruyucu görevleri olup, strese toleransta etkili olduğu bildirilmektedir (Srinavas ve Balasubramanian 1995, Mani ve ark. 2002, Ashraf ve Foolad 2007). Stres koşullarında prolin birikimi pek çok bitki türünde stres toleransıya alakalıdır ve genellikle birikimin strese tolerant olan bitkilerde hassas olanlara göre daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Ahmad ve ark. 1981, Madan ve ark. 1995, Chaitanya ve ark. 2001, Hsu ve ark. 2003). Bazı çalışmalar ise, stres koşullarındaki konsantrasyon artışının bir ürün olduğunu ve strese adaptasyonla ilgisi olmadığını bildirmektedir (Ashraf ve Foolad 2007). Bu çalışmada da kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında prolin miktarının özellikle 43 ve 46°C’lerde her iki çeşitte de yoğun olarak artması ve birikimin tolerant olan R. Hope çeşidinde daha yüksek olması çilekte prolinin yüksek sıcaklığa adaptasyonla ilgisi olabileceğini göstermektedir. Kesici (2009) yaptığı çalışmada yüksek sıcaklık koşullarında çilek çeşitlerinin 45°C’den itibaren turgor kayıplarında artışlar olduğunu, belirlemiştir. Bu çalışmada da prolin miktarının 43°C’de her iki çeşitte de maksimuma ulaşması, bu sıcaklık derecesinde yüksek sıcaklığa bağlı su kayıplarının artmasından ve bitkilerin su kaybını azaltma amacıyla osmotik bir düzenleyici olan prolin sentezini arttırmalarından kaynaklanabilmektedir. Ayrıca HSP 60 sentezinin de bu sıcaklık derecesinden itibaren özellikle R. Hope çeşidinde artması, prolinin yüksek sıcaklığa adaptasyonda etkili olabileceğini göstermektedir.

Çilek bitkisinde yapılan araştırmalarda çeşitli stres koşullarında toplam protein içeriğinin azaldığı bildirilmiştir. Örneğin; ‘Chandler’, ‘Camarosa’ ve ‘Tioga’ çilek çeşitlerinde tuz stresi koşullarında toplam protein içeriğinin kontrole göre azaldığı rapor edilmiştir (Gülen ve ark. 2006). Gülen ve Eriş (2003, 2004) ‘Camarosa’, Ledesma ve ark. (2004) ise ‘Nyoho’ ve ‘Toyonaka’ çilek çeşitlerinde sıcaklık artışına bağlı olarak

toplam protein miktarının azaldığını, buna karşılık artan sıcaklıklara tepki olarak yeni proteinlerin sentezlendiğini bildirmiştir. Ayrıca, kademeli yüksek sıcaklık uygulanan çilek bitkilerinin şok yüksek sıcaklık uygulamasına göre sıcaklık stres toleransında artış olduğu, bunun da muhtemelen kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında bazı proteinlerin sentezlenmesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Gülen ve Eriş 2003). Bu çalışmada yüksek sıcaklığa hassas olan CG3 ve tolerant olan R. Hope çeşidi arasındaki genotipsel farklılıklar toplam çözünebilir protein içeriği açısından da irdelenmiştir. Kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarının her ikisinde de önceki çalışmalara benzer şekilde sıcaklık artışına bağlı olarak toplam çözünebilir protein içeriğinin azaldığı belirlenmiştir. Buradaki azalmanın kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında 43°C'den, şok yüksek sıcaklık uygulamasında 49°C'den itibaren başladığı gözlenmiştir. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasındaki azalmanın şok yüksek sıcaklık uygulamasına göre daha keskin bir şekilde olması, kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında, sıcaklık uygulama süresinin kesintisiz bir şekilde devam etmesinden kaynaklanabilmektedir. Bu durum bazı araştırmacıların da belirttiği gibi uzun süreli daha düşük sıcaklıkların, kısa süreli yüksek sıcaklık kadar çok zarara yol açabileceğinden kaynaklanabilmektedir (Larcher 1995, Peet ve Willits 1998). Genel olarak her iki uygulamada da hassas olan CG3 çeşidinin toplam çözünebilir protein içeriği tolerant olan R. Hope çeşidine göre daha düşük seviyelerde bulunmuştur.

Toplam çözünebilir protein sonuçlarındaki benzerlik SDS-PAGE analizlerinde de görülmüştür. SDS-PAGE'e göre 65 kDa'luk muhtemelen yapısal proteinlerden oluşan baskın bir protein bandının kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında 43°C'den, şok yüksek sıcaklık uygulamasında ise 49°C'den itibaren giderek azalmaya başladığı ve 55 ve 60°C sıcaklıklarda neredeyse tamamen kaybolduğu saptanmıştır. Protein bantlarında yüksek sıcaklığa bağlı meydana gelen bu azalma, artan sıcaklıklarda protein yapısının bozulmasından kaynaklanabilmektedir. Öte yandan yaklaşık 40 kDa ve 23 kDa olduğu tahmin edilen iki proteinin ise yüksek sıcaklık derecelerinde (46°C'den itibaren) biriktiği belirlenmiştir. Aynı protein bantlarındaki benzer farklılıklar yoğunlukları daha düşük olmakla birlikte şok yüksek sıcaklık uygulamalarında da saptanmıştır.

Bitkiler optimumun dışında kalan sıcaklıklara maruz kaldıklarında, normal hücrel proteinler azalmakta ve HSP'lerin sentezi artmaktadır (Vierling 1991, Parsell ve Lindquist 1993, Gülen ve Eriş 2004). Benzer şekilde düşük sıcaklıklarda dehidrasyon stresinde dehidrin grubu proteinlerin de etkili olduğu, bunların hücrel yapının zararlanmasını önlediği ve enzimlerin aktivitelerini muhafaza ettiği belirtilmiştir (Svensson ve ark. 2002). Örneğin; zeytinde (*Olea europea* L.) düşük sıcaklık stresi koşullarında 23 ve 43 kDa'luk dehidrin proteinlerinin sentezlendiği, bunlardan 43 kDa dehidrinin düşük sıcaklıklara dayanımda önemli rolü bulunduğu tespit edilmiştir (Cansev ve ark. 2009). Yapılan çalışmada immunoblot analizleri sonucu HSP 70 proteiniyle ilgili bir bulguya rastlanmazken; 23 kDa'luk HSP 60 proteininin kademeli sıcaklık uygulamasında her iki çeşitte de 46 °C'de en yüksek düzeye ulaştığı belirlenmiştir. Ledesma ve ark. (2004) peaHSP 17.7 antikorunu kullanarak, çilek bitkisinin yaprak dokularında 26 kDa'luk bir sHSP proteininin varlığını tespit etmişlerdir. Stres konusunda önceden yapılan çalışmalarda çilek bitkisinde HSP 60 proteini ile ilgili herhangi bir bulguya rastlanmazken, ıspanakta (*Spinacia oleraceae* L.) ağır metal stresi koşullarında HSP 60 ve HSP 70 proteininin birikiminin olduğu ve bunların kurşun kontaminasyonunda erken uyarı için kullanılabilir olacak oldukça hassas ve önemli markırlar olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark. 2011). Moleküler ağırlıkları 10–200 kDa arasında değişen HSP'ler, optimum veya kötü gelişme koşullarında hücrel dengenin korunmasını sağlar. Bunlar proteinlerin katlanmasından, hücre içi dağılımlarından; ayrıca, stres koşulları altında protein ve zarların dengelenmesinden ve yanlış katlanan proteinlerin tekrar katlanmasından sorumludurlar (Lindquist 1986, Lindquist ve Craig 1988, Forreiter ve Nover 1998, Schöffl ve ark. 1999, Ellis 2000). Bu çalışmada da R. Hope çeşidinin HSP içeriğinin her iki sıcaklık uygulamasında ve hemen hemen her sıcaklık kademesinde daha yoğun olması, bu çeşidin yüksek sıcaklıklara karşı protein metabolizmasını daha iyi kullanabildiğini ve savunma mekanizmasının daha güçlü olduğunu ortaya koymaktadır.

Tüm sonuçlar birbiriyle bağlantılı olarak değerlendirildiğinde; HSP 60 sentezinin 46°C'de maksimuma ulaşması yine aynı şekilde PRX aktivitesinin de 46°C'ye kadar artış göstermesi daha sonra azalmaya başlaması prolin birikimi ile de örtüşmektedir. Bu durum, çeşitlerin kademeli yüksek sıcaklık uygulamasında bu sıcaklık derecesine kadar

çok fazla zararlanmadan yüksek sıcaklık stresine karşı kendilerini koruyabildiklerini göstermektedir. Ancak, bu sıcaklık derecesinden sonra çeşitlerin yüksek sıcaklığa verdiği tepkiler arasındaki farklılıklar toleranslarını ortaya koymuştur. PRX aktivitesinin 43°C'ye kadar CG3 çeşidinde yüksek bulunmasına karşın artan sıcaklıklarda bu durumu devam ettirememesi; ancak R. Hope çeşidinde artan sıcaklıklarda bile aktivitenin devam etmesi bu çeşidi daha tolerant hale getirmiştir. Ayrıca, R. Hope çeşidinin prolin miktarının tüm sıcaklık derecelerinde ve her iki uygulamada da daha yüksek olması da yine bu çeşidin yüksek sıcaklıklara daha tolerant olmasını sağlamıştır. R. Hope çeşidinde APX ve CAT aktivitesi için de benzer durum söz konusu olmuştur. Zararlanmanın her iki çeşitte de 46 °C'den itibaren giderek artması, bu sıcaklık derecesinden itibaren önemli oranda artan APX ve CAT aktivitesine rağmen, bu antioksidan enzimlerin hücreleri korumada tek başlarına yetersiz kalmalarının sonucudur. Sonuç olarak, çilek bitkisinde yüksek sıcaklık uygulamalarının, incelenen parametreler bazında ciddi değişimlere neden olduğu, bu değişimlerin uygulama şekline (kademeli ve şok), uygulama sıcaklıklarına ve çeşitler arasındaki genotipsel farklılıklara bağlı olarak farklı seviyelerde meydana geldiği belirlenmiştir.

Çilek bitkisinin yaprak dokularında, yüksek sıcaklığa toleransta genotipsel farklılığa neden olan bulgular özet olarak aşağıda vurgulanmıştır. Buna göre;

- **Kademeli yüksek sıcaklık uygulamalarının, bitkilerin yüksek sıcaklığa alışmasını sağlayarak tolerans geliştirmelerinde etkili olduğu,**
 - **Enzimatik olmayan antioksidanlardan AsA'in etkisinin bulunmadığı, buna karşılık glutatyonun etkili olduğu,**
 - **Enzimatik antioksidanlardan APX ve CAT enzim aktivitelerinin sıcaklık artışıyla birlikte arttığı ve bu enzimlerin sıcaklık toleransında önemli etkilerinin bulunduğu, ancak GR'nin etkisiz olduğu,**
 - **Yüksek sıcaklık stresinde prolinin koruyucu rolü olduğu,**
 - **Toplam çözünebilir proteinlerin sıcaklık artışına paralel olarak azaldığı, buna karşılık başka bazı proteinlerinin sentezinin arttığı,**
 - **23 kDa'luk HSP 60 proteininin, yüksek sıcaklık stresine toleransın sağlanmasında etkili olduğu,**
- belirlenmiştir.**

SDS-PAGE ve immunoblot tekniği kullanılarak belirlenen 23 kDa HSP 60'ın, mevcut bilgilerimize göre çilekte ilk HSP 60 olması ve yüksek sıcaklığa toleransın sağlanması konusunda markır özelliği taşması bakımından zgn değeri bulunmaktadır.

Çalışmanın sonucunda yukarıda özetlendiği üzere elde edilen orijinal veriler, ilek bitkisinde yüksek sıcaklık stresinin metabolik etkilerini ortaya koymasının yanı sıra, bitkilerde yüksek sıcaklığın fizyolojik mekanizmasının anlaşılmasına da katkıda bulunmuştur. Böylece bu konuda ileriki aşamada yapılması planlanan çilekte yüksek sıcaklık stresi sırasında farklı ifade edilen genlerin tespiti çalışmasına temel oluşturarak, yüksek sıcaklık stresine tolerant çeşitlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalara yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Ağaoğlu, S. 1986.** Üzümsü meyveler. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. Ankara, 377 s.
- Ahmad, I., Wainwright, S.J., Stewart, G.R. 1981.** The solute and water relations of *Agrostis stolonifera* ecotypes differing in their salt tolerance. *New Phytol.*, 87: 615-629.
- Almeselmani, M., Deshmukh, P.S., Sairam, R.K., Kushwaha, S.R., Singh, T.P. 2006.** Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Sci.*, 171: 382-388.
- Alscher, G.R., Donahue, L.J., Cramer, L.C. 1997.** Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells. *Physiologia Plantarum.*, 100: 222-223.
- Anderson, J.A. 2002.** Catalase activity, hydrogen peroxide content and thermotolerance of pepper leaves. *Scientia Hort.*, 95: 277-284.
- Anderson, J.A., Padhye, S.R. 2004.** Protein aggregation, radical scavenging capacity, and stability of hydrogen peroxide defense systems in heat-stressed vinca and sweet pea leaves *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 129: 54-59.
- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C. 2002.** Oxidative Stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82(10): 1227-1238.
- Arora, R., Pitchay, D.S., Bearce, B.C. 1998.** Water-stress-induced heat tolerance in geranium leaf tissues: a possible linkage through stress proteins. *Physiologia Plantarum.*, 103: 24-34.
- Arora, R., Rowland, L.J., Panta, G.R. 1997.** Chill-responsive dehydrins in blueberry: Are they associated with cold hardiness or dormancy transitions? *Physiologia Plantarum*, 101: 8-16.
- Arora, R., Wisniewski, M. E. 1994.** Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* [L.] Batsch) (II. A 60-kilodalton bark protein in cold-acclimated tissues of peach is heat stable and related to the dehydrin family of proteins). *Plant Physiology.*, 105: 95-101.
- Arora, R., Wisniewski, M.E., Scorza, R. 1992.** Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* L. Batsch). 1. Seasonal changes in cold hardiness and polypeptides of bark and xylem tissues. *Plant Physiology*, 99(4): 1562-1568.
- Asada, K. 1992.** Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts, in molecular biology of free radical scavenging systems. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 173-192.
- Asada, K., Takahashi, M. 1987.** Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, eds, Photoinhibition. Elsevier, Amsterdam, pp 227-287.
- Ashraf, M., Foolad, M.R. 2007.** Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany.*, 59(2): 206-216.

- Bakardjieva, N., Christov, K., 1996.** Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from mosses (*Mnium sp.*) and ferns (*Polydium vulgare*) to high temperature. *Can. J. Bot.*, (74): 1665-1670.
- Baniwal, S.K., Bharti, K., Chan, K.Y., Fauth, M., Ganguli, A., Kotak, S., Mishra, S.K., Nover, L., Port, M., Scharf, K.D., Tripp, J., Weber, C., Zielinski, D., Döringheat, P.V.K. 2004.** Stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.* 29(4): 471-487.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. 1973.** Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39:205-207.
- Bergmeyer, J., Grabl, M., 1983.** Methods of enzymatic analysis (Third Edition). Germany, pp. 190-302,
- Berry, J.A. Bjorkman, O. 1980.** Photosynthetic response and adaptation to temperatures in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31: 491-543.
- Boston, R.S., Viitanen, P.V., Vierling, E. 1996.** Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.*, 32: 191-222.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Burke, J.J. 2001.** Identification of genetic diversity and mutations in higher plant acquired thermotolerance. *Physiol. Plant.* 112: 167-170.
- Burke, J.J., O'Mahony, P.J., Oliver, M.J. 2000.** Isolation of Arabidopsis mutants lacking components of acquired thermotolerance. *Plant Physiol.*, 123: 575-587.
- Cansev, A., Gülen, H., Eriş, A. 2009.** Cold-hardiness of olive (*Olea europea L.*) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages: seasonal alteration of antioxidative enzymes and dehydrin-like proteins. *J. Agri. Sci.* 147: 51-61.
- Cansev, A., Köksal, N., Gülen, H., İpek A., Eriş, A. 2005.** Düşük sıcaklık stresi altındaki bazı zeytin çeşitlerinin peroksidaz aktivitesine göre gruplanması. XIV. Biyoteknoloji Kongresi, Bildiriler Kitabı, Eskişehir, 313-317.
- Chaitanya, K.V., Sundar, D., Masilamani, S., Ramachandra Reddy, A. 2001.** Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars. *Plant Growth Regulation*, 00: 1-6.
- Chen, Q., Lauzon, L.M., DeRocher, A.E., Vierling, E. 1990.** Accumulation, stability and localization of a major chloroplast heat shock protein. *The Journal of Cell Biology.*, 110: 1873-1883.
- Çakırlar, H., Topçuoğlu Ş.F. 1985.** Stres terminolojisi. Çölleşen Dünya ve Türkiye Örneği. Simpozyum 7, 13-17 Mayıs, Atatürk Üniversitesi Çevre Sorunları Araştırma Merkezi Erzurum, 108-129.
- Çakmak I., Marschner H. 1992.** Magnesium deficiency and high-light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.*, 98: 1222-1227.
- Çaylak, E. 2011.** Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9(1): 73-83.

- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze D., Van Breusegem, F. 2000.** Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 779-795.
- Davis, B.J. 1964.** Disc electrophoresis, method and application to human serum proteins. *Ann. NY. Acad. Sci.* 121: 404-427.
- Demming-Adams, B., Adams, W.W. 1996.** Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta*, 198: 460-467.
- Ellis, R. J. 2000.** Chaperone substrates inside the cell. *Trends Biochem.Sci.*, 25: 210–212.
- Elman, G.L. 1959.** Tissue suphydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77.
- Eugenia M., Nunes, S. Ray, Smith, G. 2003.** Electrolyte leakage assay capable of quantifying freezing resistance in rose clover. *Crop Sci.*, 43: 1349–1357.
- Forreiter, C., Nover, L. 1998.** Heat stress-induced proteins and the concept of molecular chaperones. *J. Biosci.*, 23: 287–302.
- Foyer, C.H., 1993.** Ascorbic acid: Antioxidants in higher plants, Eds: Alscher, R.G., Hess, J.L., CRC Pres, Boca Raton, 31-58.
- Foyer, C.H., Descourvieres. P., Kunert, K. 1994.** Protection against oxygen radicals: important defence mechanisms studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.*, 17: 507-523.
- Foyer, C.H., Halliwell, B. 1976.** The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1): 21-25.
- Gaspar, T., Penel, C., Castillo, F.J., Greppin, H. 1985.** A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development *Physiologia Plantarum*, 64 (3): 418–423.
- Giaveno C., Ferrero, J. 2003.** Introduction of tropical maize genotypes to increase silage production in the central area of Santa Fe. *Argentina Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 3(2): 89-94.
- Gong, M., Chen, S.N., Song, Y.Q., Li. Z.G. 1997.** Effect of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant systems in maize seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology*, 24: 371–379.
- Guo, Y.P., Zhou, H.F., Zhang, L.C. 2006.** Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperature stress in two citrus species. *Scientia Hort.*, 108: 260-267.
- Gusta, L.V., Wisniewski, M., Nesbitt, N.T., Tanino, K.T. 2003.** Factors to consider in artificial freeze tests. *Acta Hort.*, 618: 493-507.
- Gülen, H. 2000.** Ayva ve armutlarda anaç/kalem ilişkilerinin izoenzim analizleriyle araştırılması. *Doktora tezi. Çukurova Üniv. Fen Bil. Ens.*, Adana, 136 s.
- Gülen, H., Arora, R., Küden, A., Krebs, S.L., Postman, J. 2002.** Peroxidase isozyme profiles in compatible and incompatible pear/quince graft combinations. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 127(2): 152-157.

- Gülen, H., Eriş, A. 2003.** Some physiological changes in strawberry (*Fragaria ananassa* ‘Camarosa’) plants under heat stress. *Journal of Hort. Science and Biotech*, 78(6): 894-898.
- Gülen, H., Eriş, A. 2004.** Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science*, 166: 739-744.
- Gülen, H., Turhan, E., Eriş, A. 2006.** Changes in peroxidase activities and soluble proteins in strawberry varieties under salt-stress. *Acta Physiol. Plant.*, 28(2): 109- 116.
- Gülen, H., Turhan, E., İpek, A., Köksal, N., Cansev, A., Kesici, M., Eriş, A. 2007.** Bazı Çilek Çeşitlerinde Yüksek Sıcaklığa Toleransın Belirlenmesi. V. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 4-7 Eylül 2007, Erzurum, Bildiriler Kitabı, Cilt 1, 32-36.
- Gür, A., Demirel, U., Özden, M., Kahraman, A., Çopur, O. 2010.** Diurnal gradual heat stress affects antioxidant enzymes, proline accumulation and some physiological components in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 9(7): 1008-1015.
- Gürel, A., Avcioğlu R. 2004.** Bitkilerde Strese Dayanıklılık Fiziyojisi: Bitki Biyoteknolojisi II. 2. Baskı, Editörler: Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M. *Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları*, Konya, 288-326.
- Hartl, F.U. 1996.** Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381: 571-580.
- Hartl, F.U., Martin, J., Neupert, W. 1992.** Protein folding in the cell: the role of molecular chaperones HSP70 and HSP60. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 21: 293-322.
- Havaux, M. 1993.** Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. *Plant Cell Environ.*, 16: 461-467.
- He, Y., Huang, B. 2010.** Differential responses to heat stress in activities and isozymes of four antioxidant enzymes for two cultivars of kentucky bluegrass contrasting in heat tolerance. *Journal of the American Society for Hort. Sci.*, 135(2): 116-124.
- Heckathorn, S.A., Downs, C.A., Sharkey, T.D., Coleman, J.S. 1998.** The small, methionine-rich chloroplast heat shock protein protects photosystem II Electron transport during heat stress. *Plant Physiol.*, 116: 439-444.
- Hodges, D.M., Andrews, C.J., Johnson, D.A., Hamilton, R.I. 1996.** Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Physiol. Plant.*, 98: 685-692.
- Holmstorm, K.O., Mantyla, E., Welin, B., Mandal, A., Palva, E.T., Tunnela, O.F., Londesborough, J. 1996.** Drought tolerance in tobacco. *Nature*, 379: 683-684.
- Hong B., Ma, C., Yang, Y., Wang, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Gao, J. 2009.** Over-expression of *AtDREB1A* in chrysanthemum enhances tolerance to heat stress. *Plant Mol. Biol.*, 70: 231-240.
- Hong, S.W., Lee, U., Vierling, E. 2003.** Arabidopsis hot mutants define multiple functions required for acclimation to high temperatures. *Plant Physiol.*, 132: 757-767.
- Hong, S.W., Vierling, E. 2000.** Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 4392-4397.

- Hong, S.W., Vierling, E. 2001.** Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant J.*, 27: 25–35.
- Howarth, C.J. 2005.** Genetic improvement of tolerance to high temperature: Abiotic stress: Plant resistance through breeding and molecular approaches, Eds: Ashraf, M., Harris, P.J.C., Howarth pres Inc., New York, 277-300.
- Hsu, S.Y., Hsu, Y.T., Kao, C.H., 2003.** The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biol. Plant.*, 46: 73-78.
- Huystee, R.B.V. 1987.** Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annual Review of Plant Physiology.*, 38: 205-219.
- Iba, K. 2002.** Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53: 225-245.
- Imlay, J.A., Linn, S. 1988.** DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240(4857): 1302–1309.
- Jain, M., Marthur, G., Konl, S., Sarin, N.B. 2001.** Ameliorative effects of praline on salt stress lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Plant Cell Rep.*, 20: 463-468.
- Jeffrey, A.A. 2002.** Catalase activity, hydrogen peroxide content and thermotolerance of pepper leaves. *Sci. Hort.*, 95: 277-284.
- Jiang, Y., Huang, B. 2001.** Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool season grasses. *J. Exp. Bot.*, 52: 341-349.
- Kadir, S., Sidhu, G., Al-Khatib, K. 2006.** Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) growth and productivity as affected by temperature. *Hort. Science*, 41(6): 1423-1430.
- Keeler, S.J., Boettger, C.M., Haynes, J.G., Kuches, K.A., Johnson, M.M., Thureen, D.L., Keeler, C.L., Kitto, S.L. 2000.** Acquired thermotolerance and expression of the HSP100/ClpB genes of lima bean. *Plant Physiol.*, 123: 1121-1132.
- Kesici, M. 2009.** Bazı çilek (*Fragaria x ananassa*) çeşitlerinin yüksek sıcaklığa toleransları. *Yüksek Lisans Tezi*, Uludağ Üniv. Fen Bil. Ens. Bursa, 49 s.
- Kim, K.Y., Kwon, S.Y., Lee, H.S., Hur, Y., Bang, C.W., Choi, K.S., Kwak, S.S. 2000.** Differential expression of four sweet potato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethaphon. *Phytochemistry*, 54: 19-22.
- Kocsy, G., Szalai, G., Sutka, J., Paldi, E., Galiba, G. 2003.** Heat tolerance together with heat stress-induced changes in glutathione and hydroxylglutathione levels is affected by chromosome 5A of wheat. *Plant Science*, 166 (2): 451-458.
- Kocsy, G., Szalai, G., Sutka, J., Paldi, E., Galiba, G. 2004.** Heat tolerance together with heat stress-induced changes in glutathione and hydroxymethylglutathione levels is affected by chromosome 5A of wheat. *Plant Science*, 166 (2): 451-458.
- Kumar, M. S., Kumar, G., Srikanthbabu, V., Udayakumar, M. 2007.** Assessment of variability in acquired thermotolerance: Potential option to study genotypic response and the relevance of stress genes. *Journal of Plant Physiology*, 164(2): 111–125.
- Kumar, M.S., Srikanthbabu, V., Raju, B.M., Ganeshkumar, Shivaprakash, N., Udayakumar, M. 2003.** Screening of inbred lines to develop a thermotolerant

sunflower hybrid using the temperature induction response (TIR) technique: a novel approach by exploiting residual variability. *Journal of Exp. Botany.*, 54 (392): 2569-2578.

Kumar, R. R., Goswami, S., Kumar, N., Pandey, S. K., Pandey, V. C., Sharma, S. K., Pathak, H., Rai, R. D. 2011. Expression of novel ascorbate peroxidase isoenzymes of wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to heat stress. *Int. Journal of Plant Physiol. and Biochemistry*, 3(11), 188-194.

Kumar, R. R., Goswami, S., Sharma, S. K., Singh, K., Gadpayle, K. A., Kumar, N., Rai, G. K., Singh, M., Rai, R. D. 2012. Protection against heat stress in wheat involves change in cell membrane stability, antioxidant enzymes, osmolyte, H₂O₂ and transcript of heat shock protein. *International J. of Plant Physiol. and Biochemistry*, 4(4): 83-91.

Kurganova, L.N., Veselov, A.P., Sinitsina, Y.V., Elikova, E.A., Kulaeva, O.N. 1999. Lipid peroxidation products as possible mediators of heat stress response in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 46: 181-185.

Laemml, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 658-685.

Lamb C, Dixon RA. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 48: 251-275.

Larcher, W. 1995. Physiological plant ecology: Ecophysiology and stress physiology of functional groups, Springer-Verlag, Berlin.

Larkindale, J, Huang, B. 2005. Effects of abscisic acid, salicylic acid, ethylene and hydrogen peroxide in thermotolerance and recovery for creeping bentgrass. *Plant Growth Reg.*, 47: 17-28.

Law, M.Y., Charles, S.A., Halliwell, B. 1983. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts: The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. *Biochem J.*, 210(3): 899-903.

Ledesma, N.A., Kawabata, S., Sugiyama, N. 2004. Effect of high temperature on protein expression in strawberry plants. *Biologia Plantarum*, 48(1): 73-79.

Lee, B.H., Won, S.H., Lee, H.S., Miyao, M., Chung, W.I., Kim, I.J., Jo, J. 2000. Expression of the chloroplast-localized small heat shock protein by oxidative stress in rice. *Gene*, 245: 283-290.

Lee, G.J., Vierling, E. 2000. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactive a heat-denatured protein. *Plant Physiol.*, 122: 189-197.

Lester, G.E. 1985. Leaf cell membrane thermostabilities of *Cucumis melo*. *J. Am. Soc. Hort.Sci.*, 110:506-509.

Levitt, J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses, Vol. I, Academic Pres, New York, pp: 347-370.

Lichtenthaler, H.K. 1996. Vegetation Stress: An introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.*, 148: 4-14.

Lim, C.C., Krebs, S.L., Arora, R.A. 1999. 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.

- Lin, C.Y., Roberts, J.K., Key, J.L. 1984.** Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings: synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. *Plant Physiol.*, 74(1): 152-160.
- Lindquist, S. 1986.** The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.*, 55: 1151–1191.
- Lindquist, S., Craig, E.A. 1988.** The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 22: 631-677.
- Liu, J., Shono, M. 1999.** Characterization of mitochondria-located small heat shock protein from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Physiol.*, 40: 1297-1304.
- Liu, X., Huang, B. 2000.** Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Sci.*, 40: 503-513.
- Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Foyer C.H., Scott, I.A. 1998.** Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *J. Exp. Bot.*, 49: 713-720.
- Lund, A.A., Blum, P.H., Bhatramakki, D., Elthon, T.E. 1998.** Heat-stress response of maize mitochondria. *Plant Physiol.*, 116: 1097–1110.
- Madan, S., Nainawatee, H.S., Jain, R.K., Chowdhury, J.B. 1995.** Proline and proline metabolizing enzymes in in-vitro selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. *Annual Bot.*, 76: 51-57.
- Mani, S., Van de Cotte, B., Van Montagu, M. Verbruggen, N. 2002.** Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 128: 73-83.
- McKersie B.D., Leshem, Y.Y. 1994.** Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishers, 256 pp.
- Mitler, R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 9: 405- 410.
- Nagesh Babu, R., Devaraj, V.R. 2008.** High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Australian Journal of Crop Science*, 2(2): 40-48.
- Nair, A.S, Abraham, T.K, Jaya, D.S. 2008.** Studies on the changes in lipid peroxidation and antioxidants in drought stress induced cowpea (*Vigna unguiculata* L.) varieties. *J. Environ Biol.*, 29(5): 689-691.
- Nakamoto, H., Hiyama, T. 1999.** Heat- shock proteins and temperature stress: Handbook of plant and crop stress. Eds.: Pessarakli, M., Dekker, M., New York, pp. 339-416.
- Nakano, Y., Asada, K. 1980.** Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol.*, 21: 1295-1307.
- Necchi, A., Pogna, N.E., Mapelli, S. 1987.** Early and late heat shock proteins in wheat and other cereal species. *Plant Physiol.*, 84: 1378-1384.
- Ngo, T.T., Lenhoff, H.M., A. 1980.** Sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. *Anal. Biochem.*, 105: 389-397.
- Nieto-Sotelo, J., Ho, T.H.D, 1986.** Effect of heat shock on the metabolism of glutathione in maize roots. *Plant Physiology*, 82: 1031-1035.

- Noctor, G., Foyer, C. 1998.** Ascorbate and Glutathione : Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Rev. of Plant Physiol. and Mol. Bio.*, 49: 249-279.
- Nover, L., Neumann, D., Scharf, K.D. 1989.** Heat shock and other stress response systems of plants. Springer, Newyork, 155 p.
- Odabaşoğlu, F. 1998.** Ispanak bitkisinde pestisitler ve bitkisel hormonlar ile muamelenin bazı enzim aktiviteleri üzerine etkileri. *Doktora Tezi*, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Okie, W.R. 2004.** Register of new fruit and nut varieties list 42. *Hort Science* 39(6): 1509-1523.
- Öztürk, L., Demir, Y. 2002.** In vivo and in vitro protective role of proline. *Plant Growth Regul.*, 38: 259-264.
- Özdemir, E., Gündüz, K., Serçe, S. 2007.** Yeni bazı çilek çeşitlerinin Amik Ovası koşullarına uyumu. Türkiye V. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Kongresi Cilt 1. Sayfa, 20-22. 04-07 Eylül, Erzurum.
- Parsell, D.A., Lidquist, S. 1993.** The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 27: 437-496.
- Peet, M.M., Willits, D.H. 1998.** The effect of night temperature on greenhouse grown tomato yields in warm climate. *Agric. Forest Meteorol.*, 92: 191-202.
- Raven, E.L. 2003.** Understanding functional diversity and substrate specificity in haem peroxidases: what can we learn from ascorbate peroxidase? *Nat. Prod. Rep.*, 20: 367-381.
- Reisfeld, R.A., Lewis, U.J., Williams, D.E. 1962.** Disc electrophoresis of basic proteins and polyacrylamide gels. *Nature*, 195: 281-283.
- Rennenberg, H. 1982.** Glutathione mechanism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry*, 21(12): 2771-2781.
- Rivero, R.M., Sanchez, E., Ruiz, J.M. Romero, L. 2003.** Influence of temperature on biomass, iron metabolism and some related bioindicators in tomato and watermelon plants. *J. Plant Physiol.*, 160: 1065-1071.
- Saelim, S., Zwiazek, J.J. 2000.** Preservation of thermal stability of cell membranes and gas exchange in high temperature-acclimated *Xylia xylocarpa* seedlings. *J.Plant Phsiol.*, 156:380-385.
- Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Saxena, D.C. 2000.** Increased antioxidant activity under elevated temperatures: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 43: 245-251.
- Sairam, R.K., Tyagi, A. 2004.** Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Sci.*, 86: 407-421.
- Schöffl, F., Prandl, R., Reindl, A. 1999.** Molecular responses to heat stress: Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants, Eds: Shinozaki, K., Yamaguchi- Shinozaki, K., R.G. Langes Co., Texas, 81-98.
- Smirnoff, N. 2005.** Antioxidant and Raective Oxygen Species in Plants. Blackwell Publishing Ltd., U.K. p. 302.

- Song, L., Ding, W., Zhao, M., Sun, B., Zhang, L. 2006.** Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Science*, 171: 449-458.
- Srinavas, V., Balasubramanian, D. 1995.** Proline is a protein-compatible hydrotrope. *Langmuir*, 11: 2830-2833.
- Stadtman, E.R. 1992.** Protein oxidation and aging. *Science*, 257(5074): 1220-1224.
- Staudt, G. 1989.** The species of *Fragaria*, their taxonomy and geographical distribution. *Acta Horticulturae*, 265:23-33.
- Sumesh, K.V., Sharma-Natu, P., Ghildyal, M.C. 2008.** Starch synthase activity and heat shock protein in relation to thermal tolerance of developing wheat grains. *Biologia Plant.*, 52(4): 749-753.
- Svensson, J., Ismail, A.M., Palva, E.T., Close, T.J. 2002.** Dehydrins: Sensing, signalling and cell adaptation, Eds: Storey, K.B., Storey, J.M., Elsevier Science B.V., 155-171.
- Swan, T.M. 1997.** Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Can. J. Microbiol.*, 43(1): 70-77.
- Taiz, L., Zeiger E. 1998.** Plant Physiology. Sinauer Associates Inc., Sunderland Massachusetts.
- Teeri, J.A. 1980.** Adaptation of kinetic properties of enzymes to temperatures variability: Adaptation of plants to water and high temperature stress, Eds: Turner, N.C., Kramer, P.J., Wiley-Interscience, New York, 251-260.
- Uchida, A., Jagendorf, A.T., Hibino, T., Takabe, T., Takabe, T. 2002.** Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci.*, 163: 515-523.
- Vierling, E. 1991.** The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*, 42: 579-620.
- Vierling, E. 1997.** The small heat shock proteins in plants are members of an ancient family of heat induced proteins. *Acta Physiol. Plant.*, 19(4): 539-547.
- Vierling, R.A., Nguyen, H.T. 1992.** Heat shock gene expression in diploid wheat genotypes differing in thermal tolerance. *Crop Science*, 32: 370-377.
- Wahid, A. 2007.** Physiological implications of metabolites biosynthesis in net assimilation and heat stress tolerance of sugarcane sprouts. *J. Plant Res.*, 120: 219-228.
- Wahid, A., Close, T.J. 2007.** Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biol. Plant.*, 51: 104-109.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R. 2007.** Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61: 199-223.
- Wahid, A., Ghazanfar, A. 2006.** Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *J. Plant Physiol.*, 163: 723-730.
- Walter, M.H. 1992.** Regulation of lignification in defense: Plant Gene Research: Genes Involved in Plant Defense, Eds: Boller, T., Meins, F., Springer, Vienna, 327-352.

- Wang, C., Gu, X., Wang, X., Guo, H., Geng, J., Yu, H., Sun, J. 2011.** Stress response and potential biomarkers (*Spinacia oleracea* L.) seedlings exposed to soil lead. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 41-47.
- Wang, S.Y., Lin, H.S. 2006.** Effect of plant growth temperature on membrane lipids in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Scientia Hort.*, 108: 35-42.
- Wang, S.Y., Zheng, W. 2001.** Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 4977–4982.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. 2003.** Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218: 1-14.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. 2004.** Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in abiotic stress response. *Trends in Plant Sci.*, 9(5): 244-253.
- Waters, E.R., Lee, G.J., Vierling, E. 1996.** Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Exp. Bot.*, 47(296): 325-338.
- Wendel, J.F., Weeden, N.F. 1989.** Visualization and interpretation of plant isozymes. *Isozymes: Plant Biology*, Ed.: Soltis, D.E. Dioscorides Pres, Portland, Oregon, pp.5-44.
- Wery, J., Turc, O., Lecoeur, J. 1993.** Mechanisms of resistance to cold, heat and drought in cool season legumes, with special reference to chickpea and pea: Breeding for stress tolerance in cool season food legumes, Eds: Singh, K.B., Saxena, M.C., Chichester, U.K., John Wiley and Sons. 271-291.
- Xu, S., Li, J., Zhang, X., Wei, H., Cui, L. 2006.** Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environ. Exper. Botany*, 56: 274-285.
- Yıldız, M., Terzi, H. 2007.** Bitkilerin Yüksek Sıcaklık Stresine Toleransının Hücre Canlılığı Ve Fotosentetik Pigmentasyon Testleri İle Belirlenmesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 23 (1-2): 47 – 60.
- Yin, H., Chen, Q., Yi, M. 2008.** Effects of short-term heat stress on oxidative damage and responses of antioksidant system in *Lilium longiflorum*. *Plant Growth Regul.*, 54: 45-54.
- Yuan, Y., Liu, Y., Luo, Y., Huang, L., Chen, S., Yang, Z., Qin, S. 2011.** High temperature effects on flavones accumulation and antioxidant system in *Scutellaria baicalensis* Georgi cells. *African Journal of Biotechnology*, 10(26): 5182-5192.

EKLER

EK-1 Zararlanma Oranları (%) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	ÖD
Düzeltilmiş Model	90951,989(a)	31	2933,935	1494,396	,000
Kesişme	182827,943	1	182827,943	93123,145	,000
Sıc. Uyg.	1386,442	1	1386,442	706,182	,000
Çeşit	965,587	1	965,587	491,820	,000
Sıcaklıklar	79142,957	7	11306,137	5758,764	,000
Sıc. Uyg.* Çeşit	1,897	1	1,897	,966	,329
Sıc. Uyg.*Sıc.	8848,252	7	1264,036	643,835	,000
Çesit * Sıc.	411,005	7	58,715	29,906	,000
Sıc. Uyg.* Çeşit * Sıc.	195,849	7	27,978	14,251	,000
Hata	125,651	64	1,963		
Toplam	273905,583	96			
Düzeltilmiş Toplam	91077,640	95			

SD: Serbestlik Derecesi, ÖD: Önem Derecesi (%5)

EK-2 H₂O₂ Miktarı (nmol/gTA) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	ÖD
Düzeltilmiş Model	6313,542(a)	35	180,387	42,815	,000
Kesişme	221770,917	1	221770,917	52638,045	,000
Sıc. Uyg.	135,016	1	135,016	32,047	,000
Çeşit	1977,015	1	1977,015	469,251	,000
Sıcaklık	1925,429	8	240,679	57,126	,000
Sıc. Uyg.* Çeşit	167,098	1	167,098	39,661	,000
Sıc. Uyg.* Sıc.	1101,424	8	137,678	32,678	,000
Çesit * Sıc.	413,239	8	51,655	12,260	,000
Sıc. Uyg.* Çeşit * Sıc.	594,322	8	74,290	17,633	,000
Hata	303,345	72	4,213		
Toplam	228387,804	108			
Düzeltilmiş Toplam	6616,888	107			

SD: Serbestlik Derecesi, ÖD: Önem Derecesi (%5)

EK-3 Toplam AsA Miktarı (mg/gTA) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	ÖD
Düzeltilmiş Model	43,386(a)	35	1,240	165,866	,000
Kesişme	410,101	1	410,101	54874,095	,000
Sıc. Uyg.	9,415	1	9,415	1259,795	,000
Çeşit	,256	1	,256	34,193	,000
Sıcaklık	7,791	8	,974	130,306	,000
Sıc. Uyg. * Çeşit	,791	1	,791	105,825	,000
Sıc. Uyg. * Sıc.	7,315	8	,914	122,342	,000
Çeşit * Sıc.	13,363	8	1,670	223,500	,000
Sıc. Uyg. * Çeşit * Sıc.	4,456	8	,557	74,537	,000
Hata	,538	72	,007		
Toplam	454,025	108			
Düzeltilmiş Toplam	43,924	107			

SD: Serbestlik Derecesi, ÖD: Önem Derecesi (%5)

EK-4 Redükte AsA Miktarı (mg/gTA) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	ÖD
Düzeltilmiş Model	22,953(a)	35	,656	340,548	,000
Kesişme	125,216	1	125,216	65022,943	,000
Sıcaklık	5,582	8	,698	362,347	,000
Çeşit	2,599	1	2,599	1349,381	,000
Sıc.Uyg.	5,026	1	5,026	2609,907	,000
Çeşit * Sıc.	3,812	8	,476	247,436	,000
Sıc.Uyg. * Sıc.	2,681	8	,335	174,019	,000
Çeşit * Sıc.Uyg.	,051	1	,051	26,341	,000
Sıc. * Çeşit * Sıc.Uyg.	3,203	8	,400	207,894	,000
Hata	,139	72	,002		
Toplam	148,308	108			
Düzeltilmiş Toplam	23,092	107			

SD: Serbestlik Derecesi, ÖD: Önem Derecesi (%5)

EK-5 Toplam GSH Miktarı (µg glutatyon /gTA) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	ÖD
Düzeltilmiş Model	41557,210(a)	35	1187,349	62,520	,000
Kesişme	562742,099	1	562742,099	29631,031	,000
Sıc.Uyg.	6024,397	1	6024,397	317,213	,000
Çeşit	12809,412	1	12809,412	674,476	,000
Sıcaklık	8737,940	8	1092,243	57,512	,000
Sıc.Uyg. * Çeşit	1554,552	1	1554,552	81,855	,000
Sıc.Uyg * Sıc.	2566,705	8	320,838	16,894	,000
Çeşit * Sıc.	7088,909	8	886,114	46,658	,000
Sıc.Uyg. * Çeşit * Sıc.	2775,294	8	346,912	18,267	,000
Hata	1367,399	72	18,992		
Toplam	605666,708	108			
Düzeltilmiş Toplam	42924,608	107			

SD: Serbestlik Derecesi, ÖD: Önem Derecesi (%5)

EK-6 APX Enzim Aktivitesi (µmol /gTA) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	ÖD
Düzeltilmiş Model	51,542(a)	35	1,473	110,587	,000
Kesişme	216,251	1	216,251	16239,407	,000
Sıc.Uyg.	2,514	1	2,514	188,792	,000
Çeşit	4,664	1	4,664	350,216	,000
Sıcaklık	35,701	8	4,463	335,119	,000
Sıc.Uyg. * Çeşit	,882	1	,882	66,236	,000
Sıc.Uyg * Sıc.	2,882	8	,360	27,051	,000
Çeşit * Sıc.	2,398	8	,300	22,512	,000
Sıc.Uyg. * Çeşit * Sıc.	2,501	8	,313	23,479	,000
Hata	,959	72	,013		
Toplam	268,752	108			
Düzeltilmiş Toplam	52,501	107			

SD: Serbestlik Derecesi, ÖD: Önem Derecesi (%5)

EK-7 Spesifik APX Enzim Aktivitesi (µmol /mgprot.) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	ÖD
Düzeltilmiş Model	121,007(a)	35	3,457	118,952	,000
Kesişme	294,987	1	294,987	10149,208	,000
Sıcaklık	67,503	8	8,438	290,311	,000
Çeşit	17,015	1	17,015	585,425	,000
Sıc. Uyg.	,098	1	,098	3,377	,070
Çeşit * Sıc.	15,712	8	1,964	67,572	,000
Sıc.Uyg. * Sıc.	10,422	8	1,303	44,820	,000
Çeşit * Sıc.Uyg.	1,338	1	1,338	46,025	,000
Sıc.* Çesit * Sıc.Uyg.	8,920	8	1,115	38,360	,000
Hata	2,093	72	,029		
Toplam	418,088	108			
Düzeltilmiş Toplam	123,100	107			

SD: Serbestlik Derecesi, ÖD: Önem Derecesi (%5)

EK-8 CAT Enzim Aktivitesi (µmol /gTA) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	ÖD
Düzeltilmiş Model	117625,194(a)	35	3360,720	446,932	,000
Kesişme	558693,902	1	558693,902	74298,938	,000
Sıcaklık	51670,924	8	6458,866	858,944	,000
Çeşit	10912,574	1	10912,574	1451,229	,000
Sıc.Uyg	19607,054	1	19607,054	2607,480	,000
Uyg. * Çeşit	7653,953	8	956,744	127,234	,000
Uyg. * Sıc.Uyg.	21313,380	8	2664,173	354,300	,000
Çeşit * Sıc.Uyg.	1447,076	1	1447,076	192,442	,000
Uyg.* Çeşit * Sıc.Uyg.	5020,233	8	627,529	83,453	,000
Hata	541,407	72	7,520		
Toplam	676860,503	108			
Düzeltilmiş Toplam	118166,601	107			

SD: Serbestlik Derecesi, ÖD: Önem Derecesi (%5)

EK-9 Spesifik CAT Enzim Aktivitesi (µmol /mgprot.) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	ÖD
Düzeltilmiş Model	118200,458(a)	35	3377,156	518,284	,000
Kesişme	514329,921	1	514329,921	78932,915	,000
Sıc.Uyg.	2045,363	1	2045,363	313,897	,000
Çeşit	20402,593	1	20402,593	3131,135	,000
Sıcaklık	76247,736	8	9530,967	1462,693	,000
Sıc.Uyg. * Çeşit	74,348	1	74,348	11,410	,001
Sıc.Uyg. * Sıc.	9594,972	8	1199,372	184,065	,000
Çeşit * Sıc.	5725,382	8	715,673	109,832	,000
Sıc.Uyg. * Çeşit * Sıc.	4110,063	8	513,758	78,845	,000
Hata	469,155	72	6,516		
Toplam	632999,534	108			
Düzeltilmiş Toplam	118669,613	107			

SD: Serbestlik Derecesi, ÖD: Önem Derecesi (%5)

EK-10 GR Enzim Aktivitesi (nmol /gTA) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	ÖD
Düzeltilmiş Model	5,794(a)	35	,166	12,294	,000
Kesişme	3642,699	1	3642,699	270532,738	,000
Sıcc.Uyg.	,199	1	,199	14,816	,000
Çeşit	,412	1	,412	30,626	,000
Sıcaklık	1,709	8	,214	15,866	,000
Sıc.Uyg. * Çeşit	,042	1	,042	3,094	,083
Sıc.Uyg. * Sıc.	,336	8	,042	3,118	,004
Çeşit * Sıc.	,956	8	,119	8,871	,000
Sıc.Uyg. * Çeşit * Sıc.	2,140	8	,267	19,864	,000
Hata	,969	72	,013		
Toplam	3649,463	108			
Düzeltilmiş Toplam	6,763	107			

SD: Serbestlik Derecesi, ÖD: Önem Derecesi (%5)

EK-11 Spesifik GR Enzim Aktivitesi (ünite/mgprot.) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	ÖD
Düzeltilmiş Model	8,047(a)	35	,230	12,705	,000
Kesişme	305,483	1	305,483	16881,346	,000
Sıc.Uyg.	,533	1	,533	29,453	,000
Çeşit	,654	1	,654	36,161	,000
Sıcaklık	1,395	8	,174	9,635	,000
Sıc.Uyg. * çeşit	,154	1	,154	8,486	,005
Sıc.Uyg. * Sıc.	1,087	8	,136	7,511	,000
Çeşit * Sıc.	2,503	8	,313	17,287	,000
Sıc.Uyg. * Çeşit * Sıc.	1,721	8	,215	11,888	,000
Hata	1,303	72	,018		
Toplam	314,833	108			
Düzeltilmiş Toplam	9,350	107			

SD: Serbestlik Derecesi, ÖD: Önem Derecesi (%5)

EK-12 Prolin Miktarı (µM prolin/gTA) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	ÖD
Düzeltilmiş Model	65559053,869(a)	35	1873115,825	189,120	,000
Kesişme	71241246,752	1	71241246,752	7192,924	,000
Sıc.Uyg.	13935171,438	1	13935171,438	1406,975	,000
Çeşit	4009420,908	1	4009420,908	404,814	,000
Sıcaklık	23907266,848	8	2988408,356	301,727	,000
Sıc.Uyg. * Çeşit	81546,235	1	81546,235	8,233	,005
Sıc.Uyg.* Sıc.	15518649,208	8	1939831,151	195,856	,000
Çeşit * Sıc.	3813168,036	8	476646,004	48,125	,000
Sıc.Uyg. * Çeşit * Sıc.	4293831,196	8	536728,900	54,191	,000
Hata	713113,338	72	9904,352		
Toplam	137513413,960	108			
Düzeltilmiş Toplam	66272167,207	107			

SD: Serbestlik Derecesi, ÖD: Önem Derecesi (%5)

EK-13 Toplam Çözünebilir Protein Miktarı (mg protein/gTA) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Ortalama Kareler Top.	F	ÖD
Düzeltilmiş Model	85,365(a)	35	2,439	2136,698	,000
Kesişme	201,056	1	201,056	176136,576	,000
Sıc.Uyg.	1,761	1	1,761	1542,484	,000
Çeşit	,295	1	,295	258,563	,000
Sıcaklık	75,641	8	9,455	8283,217	,000
Sıc.Uyg. * Çeşit	,311	1	,311	272,387	,000
Sıc.Uyg. * Uyg.	6,737	8	,842	737,745	,000
Çeşit * Uyg.	,133	8	,017	14,542	,000
Sıc.Uyg. * Çeşit * Uyg.	,487	8	,061	53,369	,000
Hata	,082	72	,001		
Toplam	286,504	108			
Düzeltilmiş Toplam	85,447	107			

SD: Serbestlik Derecesi, ÖD: Önem Derecesi (%5)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sergül Ergin
Doğum Yeri ve Tarihi : Bayındır /1979
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Ülfet Onart Lisesi / 1996
Lisans : Ege Üniversitesi / 2002
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi / 2006
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Uludağ Üniversitesi / 2008-....
İletişim (e-posta) : satlar@uludag.edu.tr
Yayınları :

Gülen, H., İpek, A., Ergin, S., Akçay M.E., Eriş, A. 2010. Assesment of genetic relationships among 29 introduced and 49 local sweet cherry accescions in Turkey using AFLP and SSR markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. Vol:85. No:5 pp: 427-431.

İpek, A., Gülen, H., Akçay, M.E., İpek, M., Ergin S., Eriş, A. 2011. Determination of self-incompatibility groups of sweet cherry genotypes from Turkey. *Genetics and Molecular Research*. 10 (1): 253-260.

Turhan, E., Ergin, S. 2012. Soluble sugars and sucrose-metabolizing enzymes related to cold acclimation of sweet cherry cultivars grafted on different rootstocks. *The Scientific World Journal*. Vol. 2012. doi:10.1100/2012/979682

Ergin, S., Kesici, M., Gülen, H. 2012. Changes in H₂O₂ and Peroxidase Activities in Strawberry Plants Under Heat Stress. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16(1): 25-35.

Gülen, H., Atlar, S., Kesici, M., Köksal, N. 2009. Soğuğa Alıştırma Uygulamasının Çilek Bitkisinin Düşük Sıcaklığa Toleransına Etkisi. III. Ulusal Üzüm Sü Meyveler Sempozyumu Bildiriler Kitabı, 240-246.

Gülen, H., Cansev, A., Kesici, M., Atlar, S., Aydoğan, Ç. 2009. Düşük Sıcaklık Uygulamasının Çilek Bitkisindeki Bazı Fenotipik Özelliklere Etkisi. III. Ulusal Üzüm Sü Meyveler Sempozyumu Bildiriler Kitabı, 233-239..

İpek, A., Gülen, H., Akçay, M. E., İpek, M., Ergin, S., Eriş, A. 2010. Bazı yerel kiraz çeşitlerimizde S-allellerinin PCR yöntemi ile belirlenmesi. 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 26-29 Ekim 2010, Antalya, Bildiri Özetleri, p.6.

Çetinkaya, C., Kesici, M., Ergin, S., Gülen, H. 2010. Kuraklık ve geri kazanım uygulamalarında bazı çilek çeşitlerinin prolin ve peroksidaz aktivitesi. 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 26-29 Ekim 2010, Antalya, Bildiri Özetleri, p.13.

- Gülen, H., Cansev, A., Kesici, M., Ergin, S., Turhan, E., İpek, A., Köksal, N. 2011.** Çilek yaprak dokularının toplam fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesi. Uluslar arası Katılımlı I. Ali Numan Kıraç Tarım Kongresi, 27-30 Nisan 2011, Eskişehir, Bildiriler Kitabı, Cilt I, 817-822.
- Gülen, H., Turhan, E., İpek, A. Köksal, N., Ergin, S., Kesici, M., Eriş, A. 2011.** Çilek bitkisinin yüksek sıcaklığa toleransında moleküler değişimler. Uluslar arası Katılımlı I. Ali Numan Kıraç Tarım Kongresi, 27-30 Nisan 2011, Eskişehir, Özetler Kitabı, 103.
- Gülen, H., Ergin, S., Kesici, M., Turhan, E., İpek, A., Köksal, N. 2011.** Çilekte yüksek sıcaklığa bağlı çiçek tozu canlılığı ve çimlenme oranı. Uluslar arası Katılımlı I. Ali Numan Kıraç Tarım Kongresi, 27-30 Nisan 2011, Eskişehir, Bildiriler Kitabı, Cilt I, 811-815.
- Gülen, H., Kesici, M., Ergin, S., Demir, S., Zaimoğlu Z., Eriş, A. 2011.** Kadmiyum uygulamalarının çilek bitkisindeki peroksidaz izoenzim aktivitesine etkisi. Türkiye VI. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 4-8 Ekim 2011, Şanlıurfa, Özet Kitabı, 5.
- Barut, E., Gülen, H., Cansev, A., Ergin, S., Kesici, M. 2011.** Marmara bölgesi meyveciliği. Türkiye VI. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 4-8 Ekim 2011, Şanlıurfa, Özet Kitabı, 9