

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**





KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ENDEMİK VE TERMOFİL *HELİOTROPİUM THERMOPHILUM* BİTKİSİNİN AŞIRI
YÜKSEK SICAKLIĞA KARŞI TOLERANS MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

Asiye SEZGİN MUSLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“DOKTOR (BİYOLOJİ)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09 / 12 /2019

Tezin Savunma Tarihi : 16 / 01 /2020

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Asim KADIOĞLU

Trabzon 2020

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Biyoloji Anabilim Dalında

Asiye SEZGİN MUSLU Tarafından Hazırlanan

**ENDEMİK VE TERMOFİL *HELIOTROPİUM THERMOPHILUM* BİTKİSİNİN AŞIRI
YÜKSEK SICAKLIĞA KARŞI TOLERANS MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 17 / 12 / 2019 gün ve 1832 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Üye : Prof. Dr. Asim KADIOĞLU

Üye : Prof. Dr. Rabiye TERZİ

Üye : Doç. Dr. Aykut SAĞLAM

Üye : Doç. Dr. Utku AVCI

Prof. Dr. Asim KADIOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

"Endemik ve Termofil *Heliotropium thermophilum* Bitkisinin Aşırı Yüksek Sıcaklığa Karşı Tolerans Mekanizmasının Araştırılması" adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Doktora Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi, gerek çalışmanın planlanmasında ve değerlendirilmesinde gerekse çalışmalarımın yürütülmesi sırasında ilgisini esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Asım KADIOĞLU'na, teşekkür ederim. Her zaman danıştığım da yardımcı olmaktan kaçınmayan, tezin geliştirilmesinde yardımcı olup, tez izleme jüri üyeliğini üstlenen sayın hocalarım Prof. Dr. Rabiye TERZİ'ye ve Doç. Dr. Aykut SAĞLAM'a teşekkür ederim. Ayrıca, KTÜ, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nın değerli hocaları sayın Doç. Dr. Neslihan SARUHAN GÜLER'e, Dr. Öğr. Üyesi Mehmet DEMİRALAY'a teşekkür ederim. Çalışmamda kullandığım *Heliotropium thermophilum* tohumlarının temin edilmesine katkı sağlayan Öğr. Gör. Kamil ÖZTÜRK'e ve akademik kariyerim boyunca her zaman yanımda olan, her türlü desteğini gördüğüm kıymetli arkadaşlarım Cansu ALTUNTAŞ'a, Muammer KURNAZ'a, Kemal Vehbi İMAMOĞLU'na, Esmâ CEYLAN'a ve sonsuz hoşgörülerinden dolayı benden her türlü destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme ve çok kıymetli sevgili eşim Ufuk MUSLU'ya her zaman yanı başımda olduğu için kalpten sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesinde FDK-2017-7214 kodlu BAP 06 projesi ile desteklenmiştir.

Asiye SEZGİN MUSLU

Trabzon 2020

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum "Endemik ve Termofil *Heliotropium thermophilum* Bitkisinin Aşırı Yüksek Sıcaklığa Karşı Tolerans Mekanizmasının Araştırılması" başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Asim KADIOĞLU'nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 16/01/2020

Asiye SEZGİN MUSLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
KISALTMALAR DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Stres ve Stres Çeşitleri	5
1.3. Yüksek Sıcaklık Stresi	6
1.3.1. Yüksek Sıcaklığın Büyüme Parametreleri Üzerine Etkisi	7
1.3.2. Yüksek Sıcaklığın Membran Hasarı Üzerine Etkisi	7
1.3.3. Yüksek Sıcaklığın Su Durumu Üzerine Etkisi	8
1.3.4. Yüksek Sıcaklığın Oksidatif Stres Üzerine Etkisi	9
1.4. Reaktif Oksijen Türleri	9
1.4.1. Singlet Oksijen.....	9
1.4.2. Süperoksit Anyonu	10
1.4.3. Hidrojen Peroksit	10
1.4.4. Hidroksil Radikali.....	11
1.5. Yüksek Sıcaklık Stresine Karşı Bitki Adaptasyonu.....	12
1.5.1. Yüksek Sıcaklıktan Sakınma Mekanizmaları	12
1.5.2. Yüksek Sıcaklığa Tolerans Mekanizmaları	13
1.5.2.1. Antioksidan Sistem.....	14
1.5.2.1.1. Süperoksit Dismutaz	14
1.5.2.1.2. Askorbat Peroksidaz	15
1.5.2.1.3. Katalaz	15
1.5.2.1.4. Glutasyon Peroksidaz.....	15
1.5.2.1.5. Monodehidroaskorbat Redüktaz.....	16
1.5.2.1.6. Dehidroaskorbat Redüktaz.....	16

1.5.2.1.7.	Glutasyon Redüktaz	16
1.5.2.1.8.	Askorbik Asit.....	16
1.5.2.1.9.	Glutasyon	17
1.5.2.1.10.	Karotenoid	18
1.5.2.2.	Metilglioksal	18
1.5.2.2.1.	Glioksalaz Sistem ve Sıcaklık Toleransı	19
1.5.2.3.	Sıcaklık Stresinin Osmolit Biyosentezi ile İlişkisi	19
1.5.2.4.	Bitkilerin Sıcaklığa Toleransında Absisik Asidin Rolü.....	20
1.5.2.5.	Sıcaklık Stresine Toleransta Sıcak Şok Faktörlerinin Rolü.....	21
1.6.	<i>Heliotropium thermophilum</i> Hakkında Genel Bilgiler	22
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	23
2.1.	Bitki Tohumlarının Temini ve Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	23
2.2.	Bitkilere Sıcaklık Uygulamaları	23
2.3.	Toprak Sıcaklıklarının ve Yaprak Yüzey Sıcaklıklarının Ölçülmesi	26
2.4.	Büyüme Parametrelerindeki Değişimlerin Belirlenmesi	26
2.4.1.	Sürgün ve Kök Uzunluklarının Ölçülmesi	27
2.4.2.	Sürgün Taze Ağırlığının ve Kuru Ağırlığının Belirlenmesi	27
2.5.	Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişimlerin Belirlenmesi.....	27
2.5.1.	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler	27
2.5.2.	Hidrojen Peroksit İçeriğinin Belirlenmesi	27
2.5.3.	3,3' - Diaminobenzidin Boyama	28
2.5.4.	Süperoksit İçeriğinin Belirlenmesi	28
2.5.5.	Metilglioksal İçeriğinin Belirlenmesi	28
2.5.6.	Yaprak Su potansiyeli Ölçümü.....	29
2.5.7.	Stoma İletkenliği.....	29
2.5.8.	Enzimatik Antioksidan Aktivitelerinin Tayini	29
2.5.8.1.	Guaiakol Peroksidaz	29
2.5.8.2.	Katalaz	30
2.5.8.3.	Süperoksit Dismutaz.....	30
2.5.8.4.	Askorbat Peroksidaz	30
2.5.8.5.	Glutasyon Redüktaz	30
2.5.8.6.	Monodehidroaskorbat Redüktaz.....	30
2.5.8.7.	Dehidroaskorbat Redüktaz.....	31
2.5.9.	Enzimatik Olmayan Antioksidan İçeriklerinin Belirlenmesi	31

2.5.9.1.	Askorbat İçeriğinin Belirlenmesi.....	31
2.5.9.2.	Glutasyon İçeriğinin Belirlenmesi	31
2.5.9.3.	Toplam Karotenoid Tayini	32
2.5.10.	Gliksalaz Sistem Enzimlerinin Aktivitesinin Belirlenmesi	32
2.5.11.	Ozmolitlerdeki Değişimlerin Belirlenmesi	33
2.5.11.1.	Prolin İçeriğinin Belirlenmesi.....	33
2.5.11.2.	Glisin-Betain İçeriğinin Belirlenmesi.....	33
2.5.11.3.	Toplam Çözünbilir Şeker İçeriğinin Belirlenmesi	33
2.5.12.	Absisik Asit Tayini	34
2.6.	Moleküler Analizler	34
2.6.1.	RNA Eldesi ve cDNA Yapımı.....	34
2.6.2.	Kantitatif Real-Time PCR Ölçümü	34
2.6.3.	Bazı Antioksidan Enzimlerin Protein Miktarlarının Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi	35
2.7.	Protein Tayini	36
2.8.	İstatistiksel Analizler	36
3.	BULGULAR.....	37
3.1.	Toprak ve Yaprak Yüzeyindeki Sıcaklıkların Değişimi.....	37
3.2.	Büyüme Parametreleri	38
3.2.1.	Morfolofik Değişimler	38
3.2.1.1.	Sürgün ve Kök Uzunluğu	38
3.2.2.	Sürgün Taze Ağırlık ve Kuru Ağırlık	40
3.3.	Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişimler	41
3.3.1.	TBARS İçeriği	41
3.3.2.	H ₂ O ₂ İçeriği	42
3.3.3.	DAB Boyama Metodu ile H ₂ O ₂ Dağılımının Belirlenmesi	43
3.3.4.	Süperoksit İçeriği.....	44
3.3.5.	Metilgliksal İçeriği.....	44
3.3.6.	Yaprak Su Potansiyeli.....	45
3.3.7.	Stoma İletkenliği.....	46
3.3.8.	Enzimatik Antioksidanlardaki Değişimler.....	47
3.3.8.1.	Guaiakol Peroksidaz Aktivitesi	47
3.3.8.2.	Katalaz Aktivitesi	47
3.3.8.3.	Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	48
3.3.8.4.	Askorbat Peroksidaz Aktivitesi	49

3.3.8.5.	Glutasyon Redüktaz Aktivitesi	50
3.3.8.6.	Monodehidroaskorbat Redüktaz Aktivitesi	51
3.3.8.7.	Dehidroaskorbat Redüktaz Aktivitesi.....	52
3.3.9.	Enzimatik Olmayan Antioksidanlardaki Değişimler.....	52
3.3.9.1.	Askorbat İçeriği	52
3.3.9.2.	Glutasyon İçeriği	53
3.3.9.3.	Toplam Karotenoid İçeriği	54
3.3.10.	Gliksalaz Sistem Enzimlerindeki Değişimler	55
3.3.10.1.	Gliksalaz I Aktivitesi	55
3.3.10.2.	Gliksalaz II Aktivitesi.....	56
3.3.11.	Ozmolitlerdeki Değişimler	57
3.3.11.1.	Prolin İçeriği	57
3.3.11.2.	Glisin Betain İçeriği.....	58
3.3.11.3.	Toplam Çözünbilir Şeker İçeriği	59
3.3.12.	Absisik Asit İçeriği	60
3.4.	Moleküler Analizler.....	61
3.4.1.	Kantitatif Real-Time PCR	61
3.4.1.1.	<i>HSFA4A</i> Gen İfadesi.....	62
3.4.1.2.	<i>HSFA3</i> Gen İfadesi	62
3.4.1.3.	<i>HSF4</i> Gen İfadesi	63
3.4.2.	Western Blot Analizleri	64
3.4.2.1.	FeSOD Protein Sentezi	64
3.4.2.2.	CAT Protein Sentezi	65
3.4.2.3.	GPX Protein Sentezi	65
3.4.2.4.	GR Protein Sentezi	65
4.	TARTIŞMA.....	67
5.	SONUÇLAR.....	81
6.	ÖNERİLER.....	83
7.	KAYNAKLAR	84
8.	EKLER	98

ÖZGEÇMİŞ

Doktora Tezi

ÖZET

ENDEMİK VE TERMOFİL *HELIOTROPİUM THERMOPHILUM* BİTKİSİNİN AŞIRI YÜKSEK SICAKLIĞA KARŞI TOLERANS MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Asiye SEZGİN MUSLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Asım KADIOĞLU
2020, 97 Sayfa, 6 Ek Sayfa

Endemik ve termofil *Heliotropium thermophilum*'un aşırı yüksek sıcaklığa karşı tolerans mekanizmasını aydınlatmak için, laboratuvarında kontrollü koşullarda toprak sıcaklıkları kademeli bir şekilde artırılarak 20±5, 40±5, 60±5 ve 80±5°C'de yetiştirilen bitkilerin 10 hafta boyunca gelişimleri gözlemlendi. 40±5°C'de yaşayan bitki gruplarının sürgün uzunluğu, sürgün taze ve kuru ağırlığının diğer gruplara göre daha fazla olduğu görüldü. Artan sıcaklıkla beraber kök uzunluklarında ise bir azalış kaydedildi. Aşırı yüksek sıcaklıkta (80±5°C), yaprak su potansiyeli ve stoma iletkenliğinde azalış, tiyobarbitürik asit-reaktif maddeler (TBARS), hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksit (O₂⁻), metilglioksal (MG) içeriklerinde önemsiz bir artış gözlemlendi. Antioksidanlardan, süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon reduktaz (GR), dehidroaskorbat reduktaz (DHAR) aktivitelerinin, askorbat (AsA) ve glutatyon (GSH) içeriklerinin 80±5°C'deki bitkilerde aşırı arttığı tespit edildi. Osmolit seviyesi, ABA içeriği ve sıcak şok faktörleri (HSF) gen ekspresyonunun 80±5°C'de yetişen bitkilerde aşırı yüksek olduğu bulundu. Ayrıca western blot analiz sonuçlarına göre FeSOD, CAT, GPX, GR enzimlerine ait protein içeriklerinin ve aktiviteleri ile paralellik gösterdiği de belirlendi.

Elde edilen veriler doğrultusunda, laboratuvar koşullarında yetiştirilen *H. thermophilum*'un antioksidan ve glioksalaz sistemi uyararak, ABA sentezini, HSF'lerin ifade seviyelerini ve osmolit birikimini önemli derecede artırarak aşırı toprak sıcaklığına (80±5°C) tolerans gösterebilen termofil model bir bitki olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Heliotropium thermophilum*, Aşırı yüksek sıcaklık, Termofil, Absisik asit, Osmolit, Sıcak şok faktörleri

PhD Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF TOLERANCE MECHANISM AGAINST EXTREMELY HIGH
TEMPERATURE OF ENDEMIC AND THERMOPHYL *HELIOTROPIUM*
THERMOPHILUM PLANT

Asiye SEZGİN MUSLU

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Asım KADIOĞLU
2020, 97 Pages, 6 Appendix Pages

In order to elucidate the tolerance mechanism of the endemic and thermophil *Heliotropium thermophilum* to extremely high temperatures, the soil temperature was gradually increased in the laboratory conditions and the growth of plants lived at 20±5, 40±5, 60±5 and 80±5°C was observed for 10 weeks. It was seen that shoot length, shoot fresh and dry weight of plant groups living at 40±5°C were higher than other groups. Root lengths decreased with increasing temperature. Leaf water potential and stomatal conductivity decreased, thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide (O₂⁻), methylglyoxal (MG) contents were insignificantly increased in plants living at 80±5°C. It was found that superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), dehydroascorbate reductase (DHAR) activities, ascorbate (AsA) and glutathione (GSH) contents, osmolite level, ABA content and heat shock factors (HSF) gene expression also extremely increased in plants. In addition, according to western blot analysis results, it was determined that the protein contents of FeSOD, CAT, GPX, GR were parallel with enzymes activities.

In line with the findings obtained, it was concluded that *H. thermophilum* grown in laboratory conditions is a thermophile model plant which can tolerate excessive soil temperature (80±5°C) by stimulating the antioxidant and glyoxalase system, ABA synthesis, HSF expression levels and osmolite accumulation.

Keywords: *Heliotropium thermophilum*, Extremely high temperature, Thermophile, Abscisic acid, Osmolite, Heat shock factor

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Bitkilerin yüksek sıcaklıklara farklı adaptasyon mekanizmaları	12
Şekil 2.	Doğal ortamında <i>Heliotropium thermophilum</i> bitkisi.....	22
Şekil 3.	<i>H. thermophilum</i> tohumlarının iki katlı ıslak filtre kağıdı arasında petri kaplarındaki görünümü	23
Şekil 4.	Çalışmalarda kullanılan toprak sıcaklığını sağlayan ısı ünitesi	24
Şekil 5.	Deney gruplarının oluşturulması ve uygulamaların şeması.....	25
Şekil 6.	Toprak sıcaklığı ve yaprak sıcaklığının ölçümünde kullanılan termometreler	26
Şekil 7.	Farklı toprak sıcaklıklarında yetiştirilen bitkilere ait toprak ve yaprak yüzey sıcaklıkları	37
Şekil 8.	Farklı toprak sıcaklıklarının <i>H. thermophilum</i> bitkilerindeki morfolojik değişimler üzerine etkisi.	38
Şekil 9.	Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının sürgün ve kök uzunluğu üzerine etkisi.....	39
Şekil 10.	Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının sürgün uzunluğuna etkisi.	39
Şekil 11.	Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının kök uzunluğuna etkisi.	40
Şekil 12.	Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının sürgün taze ağırlığına etkisi.....	41
Şekil 13.	Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının sürgün kuru ağırlığa etkisi.	41
Şekil 14.	Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının yaprak TBARS içeriğine etkisi.....	42
Şekil 15.	Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının H ₂ O ₂ içeriğine etkisi.	43
Şekil 16.	Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının DAB boyanması ile belirlenen H ₂ O ₂ dağılımı üzerine etkisi.....	43
Şekil 17.	Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının süperoksit içeriğine etkisi.	44
Şekil 18.	Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının MG içeriğine etkisi.	45
Şekil 19.	Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının yaprak su potansiyeline etkisi.....	46
Şekil 20.	Farklı sıcaklık uygulamalarının stoma iletkenliğine etkisi.	46
Şekil 21.	Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının GPOD aktivitesine etkisi.	47

Şekil 22. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının CAT aktivitesine etkisi.	48
Şekil 23. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının SOD aktivitesine etkisi.	49
Şekil 24. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının APX aktivitesine etkisi.	50
Şekil 25. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının GR aktivitesine etkisi.	51
Şekil 26. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının MDHAR aktivitesine etkisi.	51
Şekil 27. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının DHAR aktivitesine etkisi.	52
Şekil 28. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının AsA içeriğine etkisi.	53
Şekil 29. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının GSH içeriğine etkisi.	54
Şekil 30. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının toplam karotenoid içeriğine etkisi.	55
Şekil 31. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının Glioksalaz I aktivitesine etkisi.	56
Şekil 32. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının Glioksalaz II aktivitesine etkisi.	57
Şekil 33. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının prolin içeriğine etkisi.	58
Şekil 34. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının glisin betain içeriğine etkisi.	59
Şekil 35. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının toplam çözünebilir şeker içeriğine etkisi.	60
Şekil 36. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının ABA içeriğine etkisi.	61
Şekil 37. <i>HSF4A4</i> , <i>HSFA3</i> , <i>HSF4</i> genlerinin kantitatif Real-Time PCR amplifikasyonunun Melt Curve değerleri.	61
Şekil 38. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının <i>HSFA4A</i> ifadesine etkisi.	62
Şekil 39. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının <i>HSFA3</i> ifadesine etkisi.	63
Şekil 40. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının <i>HSF4</i> ifadesine etkisi.	64
Şekil 41. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının FeSOD proteini üzerine etkisi.	64
Şekil 42. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının CAT proteini üzerine etkisi.	65
Şekil 43. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının GPX proteini üzerine etkisi.	65
Şekil 44. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının GR proteini üzerine etkisi.	66

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>HSFA4A</i> , <i>HSF4</i> , <i>HSFA3</i> genlerinin ifade seviyeleri için qRT- PCR işlem basamakları	35
Tablo 2. qRT PCR’da kullanılan primerlerin sekansları	35
Tablo 3. Farklı toprak sıcaklığında yetiştirilen bitkilere ait yaprakların yüzey sıcaklığı.	37



KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	: Absisik asit
APX	: Askorbat peroksidaz
AsA	: Askorbat
CAT	: Katalaz
DAB	: 3-3'-Diamino benzidin
DHAR	: Dehidroaskorbat reduktaz
GPOD	: Guaiakol peroksidaz
GPX	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon s transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HSF	: Sıcak şok faktörü
HSP	: Sıcak şok proteini
KA	: Kuru ağırlık
MDHAR	: Monodehidroaskorbat reduktaz
MG	: Metilglioksal
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
OH ⁻	: Hidroksil radikali
PSI	: Fotosistem I
PSII	: Fotosistem II
ROT	: Reaktif oksijen türü
SLG	: S-D-laktoilglutasyon
SOD	: Süperoksit dismütaz
TA	: Taze ağırlık
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
TCA	: Trikloroasetik asit

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Küresel ısınmadan kaynaklanan yüksek sıcaklığın büyüme ve gelişimi üzerindeki zararlı etkisinden dolayı günümüzde ve gelecekte bitkisel verimin olumsuz yönde etkileneceği rapor edilmiştir (Bita ve Gerats, 2013). Yüksek sıcaklık stresi altındaki bitkilerde fenotipik değişikliklerin yanısıra enzim aktivitesi, membran akışkanlığı, protein fotosentez, solunum, klorofil ve protein sentezi ile redoks durumu dahil olmak üzere hücre fonksiyonlarının performansında düşüş meydana gelir (Li vd., 2013). Bitkilerin yüksek sıcaklığa cevapları sıcaklığın derecesine, süresine ve bitkinin türüne göre farklılık gösterebilir. Bitkiler yüksek sıcaklıkla başa çıkabilmek için sakınma ve tolerans gibi çeşitli adaptasyon mekanizmaları geliştirebilirler. Sakınma mekanizmalarının başlıcaları yaprak yönelmesi, transpirasyonal soğutma, yaprak kıvrılması, erken olgunlaşma ve membran lipid birleşimi değişimleridir (Fitter ve Hay, 2002). Tolerans mekanizmaları ise iyon taşıyıcıları, proteinler, ozmoprotektanlar, antioksidanlar, sinyal kaskatları ve transkripsiyonel kontrol gibi yollardan oluşur (Hasanuzzaman vd., 2013).

Yüksek sıcaklık stresi aynı zamanda oksidatif bir strese sebep olmaktadır. Bu nedenle yüksek sıcaklığa toleransta yukarıda anlatılan savunma mekanizmalarının en önemlilerinden birisi antioksidanlardır. Bilindiği üzere yüksek sıcaklık bitkilerde singlet oksijen (1O_2), süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini artırarak hasar oluşturabilir (Mittler, 2002). Bitkisel hasarlar genelde ROT'ların lipid membran peroksidasyonu, pigment yıkımı, membran geçirgenliğinde meydana gelen değişimlerle sağlanır (Rodriguez vd., 2005; Xu vd., 2006; Camejo vd., 2006). Bitkiler stres durumunda ortaya çıkan ROT'ların zararlı etkilerinden korunmak için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemine sahiptirler. Toleranslı ve hassas bitkilerde bu savunma sisteminin etkinliği farklı olabilir. Enzimatik antioksidan savunma sistemi süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX), katalaz (CAT), glutatyon *S*-transferaz (GST) ve askorbat-glutatyon (AsA-GSH) döngüsüne ait askorbat peroksidaz (APX), glutatyon reduktaz (GR), monodehidroaskorbat reduktaz (MDHAR) ve dehidroaskorbat reduktaz (DHAR) gibi

enzimlerden ve enzimatik olmayan askorbat (AsA), glutasyon (GSH), tokoferol, karotenoid, fenolik gibi bileşiklerden oluşur (Sharma vd., 2012). Yapılan birçok araştırmada, bazı zirai bitkilerdeki yüksek sıcaklığa toleransın antioksidan kapasitenin artması ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Almeselmani, 2006).

Bitkilerde çeşitli streslere aşırı miktarda üretilen ROT'ların toksik etkilerine benzer olarak metilglioksal (MG) olarak adlandırılan bileşikler de sentezlenir (Hasanuzzam vd., 2011a). Önemli bir ROT olan hidrojen peroksite benzer olarak MG'nin de bitkilerde yüksek konsantrasyonlarda toksik etki, düşük konsantrasyonlarda ise sinyal molekül olarak işlev gördüğü belirlenmiştir (Hoque vd., 2016). Bu ve diğer literatürler, çeşitli çevresel streslere cevapta ROT'lar ile MG'nin arasında fonksiyon yönünden bir benzerliğin olduğunu göstermiştir (Hasanuzzaman vd., 2011a). Ayrıca birçok araştırmada ROT ve MG'lerin süpürülmesinde antioksidan ve glioksalaz yolağı enzimlerinin eş güdümlü uyarıldığı veya düzenlendiği ve bitkilerde oksidatif strese karşı toleransta birlikte rol oynadığı ileri sürülmüştür (Hasanuzzaman vd., 2012b).

Sıcaklık stresine toleransta rol oynayan diğer bir grup ise ozmolitler olup, normal metabolizmayı engellemeden bitkideki su durumunu korumak için hücrenin su potansiyelini artıran ozmoprotektan bileşikler olarak tanımlanırlar. Bu organik bileşikler, hücrelerdeki ozmotik ayarlamayı düzenleyerek, bitkileri ROT kaynaklı oksidatif stres hasarlarından korur ve çeşitli stres faktörlerine karşı bitkinin hücresel fonksiyonlarının devam etmesini sağlarlar (Singh vd., 2017). Bu bileşiklerden en önemlileri prolin, sukroz, polioller, trehaloz, glisin betain ve alanin betain gibi metabolitlerdir (Yancey, 1994).

Yüksek sıcaklık stres toleransında anahtar bir rol oynayan diğer bir bileşik absisik asit (ABA) olup, bitkilerin büyümesinde ve gelişmesinde oldukça etkili bir bitki hormonudur (Kumar vd., 2018). Absisik asit bitkilerin normal fizyolojik işlevlerine ek olarak çevresel stres koşullarında da çok önemli rol oynar (Sripinyowanich vd., 2013). Stres altındaki bitkilerde ABA, çeşitli yolları uyararak etkili olabilir. Örneğin, kuraklık ve düşük sıcaklık altında ABA'nın bitki hücrelerinde ozmotik ayarlamayı sağlayan çeşitli ozmolit bileşiklerin sentezini uyardığı bulunmuştur (Zhang vd., 2012). Ayrıca yüksek sıcaklık stresi altındaki bitki hücrelerindeki tolerans, ABA tarafından uyarılan ozmolit biyosentezi ve birikimi ile ilişkilendirilmiştir (Ding vd., 2010; Kumar vd., 2012). Bu konuda yapılan diğer çalışmalar ABA'nın, ozmolitlerin biyosentetik yollarını moleküler seviyede düzenleyen bir sinyal molekülü olarak görev yaptığını göstermiştir (Sripinyowanich vd., 2013). Diğer taraftan ABA'nın abiyotik stres koşullarında stresle

ilişkili birçok genin ifadesini artırarak, bitkilerin toleransına önemli katkılar yaptığı da kaydedilmiştir (Lata ve Prasad, 2011).

Absisik asidin uyardığı genlere ilave olarak mikroarray ve transkriptom analizleriyle bitkilerde çok sayıda abiyotik strese duyarlı gen dizisi tanımlanmıştır (Nakashima vd., 2009). Bu genler, enzim ve fonksiyonel proteinleri üreterek hücreleri stresten korumalarının yanısıra; düzenleyici proteinleri de sentezleyerek stres cevaplarını kontrol ederler (Lata ve Prasad, 2011). Bu genlerden bazıları da transkripsiyon faktörleridir (TF). Bitki genomunda, kodlanan dizilerinin yaklaşık %7'si TF'lere aittir. Bunların çoğu sıcaklık stresi ile ilişkili ısı şok faktörleri (HSF) familyası gibi genellikle büyük gen ailelerine aittir (Baniwal vd, 2004). Isı şok faktörleri bitkilerde ısı şok proteinleri (HSP) gibi strese cevap veren genlerin ifadesini düzenleyerek birçok abiyotik strese cevapta önemli roller oynarlar (Meng vd., 2016).

Yukarıda açıklanmaya çalışılan mekanizmalara sahip olan veya bu mekanizmaları daha etkin kullanan bitkiler stres koşullarında hayatta kalmada daha başarılıdırlar. Nitekim termofil bitkiler yüksek sıcaklıkta daha kolay büyüebilmekte ve ani sıcaklık değişimlerine karşı kendilerini koruyabilmektedir. Bu nedenle termofil bitkilerin sıcaklığa karşı geliştirdikleri adaptasyon mekanizmalarının yanında genetik özelliklerinin de bilinmesi önemlidir. Ayrıca küresel sıcaklığın artmaya devam ettiği ve tarımsal verimi korumak için adaptasyon stratejilerinin geliştirilmesine acil bir ihtiyaç olduğu günümüzde, yüksek sıcaklığın bitki fizyolojisi, büyümesi ve gelişimi üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Dolayısıyla termofil bitkilerin sıcaklık stresine karşı geliştirdiği mekanizmalar üzerine yapılan araştırma sonuçları, sıcaklığa dayanıklı bitkilerin yetiştirilmesi ile ilgili çalışmalar için önemli görülmektedir. Termofil bitkilerin habitatlarında yaşamını sürdürebildiği toprak sıcaklıkları ile ilgili literatürde bazı çalışmalar mevcuttur. Örneğin Yeni Zelanda'da endemik termofil *Cyclosorus interruptus*'un ve *Kunzea robusta*'nın 68 °C, *Campylopus pyriformis*'un ise ortalama 72 °C toprak sıcaklığında yaşayan yüksek sıcaklığa toleranslı bitkiler olduğu rapor edilmiştir (Lange, 2014; Smale and Fitzgerald, 2015). Tercek vd. (2003) ise sıcaklığa adapte olmuş termofil *Agrostis scabra*'nın toprak sıcaklığının 45 °C'ye kadar olan jeotermal alanlarda yayılış gösterdiğini kaydetmişlerdir.

Yukarıdaki çalışmalar bitkilerin doğal ortamlarında yapılmıştır. Bununla birlikte laboratuvar koşullarında topraktan sıcaklık uygulaması yapılmış çalışmalar da literatürde bulunmaktadır. Örneğin Rachmilevitch vd. (2006) *Agrostis* türlerinde 24 saat boyunca

20°C (düşük sıcaklık) ve 37°C'ye (sıcaklık stresi) maruz bırakarak, gaz değişim parametreleri, kök ve sürgün gelişimlerdeki değişimleri rapor etmişlerdir. Diğer bir çalışmada da Du ve Tachibana, (1994) 6 günlük toprak sıcaklıklarının (35-38°C) salatalık fidelerinde kök kuru ağırlığını ve yaprak alanındaki değişimleri rapor etmişlerdir. Ayrıca yapılan atmosferik sıcaklık denemelerinde de sıcaklığa toleranslı çeltik (*Oryza meridionalis*) maksimum olarak 45°C'de 24 saat tutularak bitkideki fizyolojik ve moleküler değişimler araştırılmıştır (Scafaro vd., 2010). Rani vd. (2016) ise 45°C'de *Brassica juncea*'da sıcaklığa toleranslı (BPR-542-6), sıcaklığa duyarlı (NPJ-119) genotiplerinde SOD, POX, CAT, APX ve GR aktivitelerini belirleyerek bitkiler arasındaki farklılıkları ortaya koymuşlardır. Başka bir çalışmada da, Kumar vd. (2012), 40/45°C'de yetiştirilen *Zea mays* ve *Oryza sativa* bitkilerinde CAT, APX ve GR gibi enzimatik, AsA ve GSH gibi enzimatik olmayan antioksidan sistem cevaplarını karşılaştırmalı olarak araştırmışlardır. Benzer olarak Hasanuzzam vd.'nin (2013) *Triticum aestivum* bitkisinde yaptığı bir çalışmada sıcaklık uygulamasının (38°C, 24 ve 48 sa) APX, GR, GPX, GST aktivitelerini arttırdığı bulunmuştur. Diğer taraftan sıcaklığa toleranslı *Fragaria x ananassa* kültürleri ile yapılan çalışmalarda da kademeli sıcaklık artışları ile 35°C'den 60°C'ye kadar çıkılarak iyon sızıntısı, H₂O₂ içeriği ve peroksidaz aktivitesindeki değişimler belirlenmiştir (Ergin vd., 2012).

Yukarıda bahsedilen yüksek sıcaklık denemelerinin genellikle atmosferik sıcaklık uygulamaları şeklinde yapıldığı, toprak sıcaklık denemelerinin oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Ayrıca laboratuvar koşullarında bitkilerde 65°C'nin üzerinde ve uzun süreli bir sıcaklık uygulamasına literatürde rastlanılmamıştır. Diğer taraftan aşırı yüksek sıcaklıklarda yaşayan bitkilerde hangi tolerans mekanizmalarının görev yaptığı konusunda da yeterli bilgi literatürde mevcut değildir.

Literatürdeki yukarıda belirtilen boşlukları doldurmak amacıyla araştırmamızda endemik ve termofil bir bitki olan *H. thermophilum* bitkisi seçilmiştir. Çiçekli bir bitki olan *H. thermophilum*'un doğal ve laboratuvar koşullarında 65°C toprak sıcaklığında oldukça iyi bir büyüme sergilediği belirlenmiştir (Tan vd, 2008; Gören vd., 2008; Yıldırım vd., 2016; Konar, 2016; Öztürk, 2018; TÜBİTAK-114Z336, 2019). Bununla birlikte laboratuvar koşullarında bitkinin tolere edebildiği maksimum toprak sıcaklığının belirlendiği ve aşırı yüksek toprak sıcaklığına (80±5°C) karşı geliştirdiği tolerans mekanizmasının morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yönden ayrıntılı araştırıldığı herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.

Mevcut çalışmada laboratuvar koşullarında *H. thermophilum*'un maksimum yaşayabildiği toprak sıcaklığının belirlenmesi ve aşırı yüksek toprak sıcaklığına karşı geliştirdiği tolerans mekanizması/mekanizmalarının detaylı bir şekilde açığa çıkarılması amaçlanmıştır. Bu amaca ulaşmak için bu tez kapsamında aşağıdaki hipotezlere cevap aranmıştır:

1. *H. thermophilum* bitkisi $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında uzun süre canlı kalabilir. Bu hipotezi test etmek için yaprak yüzey sıcaklıkları, sürgün ve kök uzunlukları, sürgün kuru ve yaş ağırlığı gibi bazı morfolojik değişimler ile yaprak su potansiyeli, stoma iletkenliği ve TBARS, H_2O_2 , O_2^- , MG gibi reaktif bileşiklerin analizi yapılmıştır.

2. *H. thermophilum*'un yüksek toprak sıcaklığına toleransında antioksidan ve glioksalaz mekanizmaları rol oynar. Bu hipotezi test etmek için SOD, CAT, APX, GPX, GR, MDHAR, DHAR aktivitesine ve glioksalaz sitem enzimlerine (glioksalaz I ve glioksalaz II), AsA, GSH, karotenoid gibi enzimatik olmayan antioksidan bileşiklerdeki değişimler belirlenmiştir.

3. *H. thermophilum*'un yüksek toprak sıcaklığına toleransında ozmolit bileşiklerin de rolü vardır. Bu hipotezi test etmek için, prolin, glisin-betain, toplam çözünebilir şeker gibi ozmolit birikimleri tayin edilmiştir.

4. *H. thermophilum*'un yüksek toprak sıcaklığına toleransında absisik asit önemli role sahiptir. Bu hipotezi test etmek için ABA miktarındaki değişimlere bakılmıştır.

5. *H. thermophilum*'un yüksek toprak sıcaklığına toleransta bazı moleküler mekanizmalar da uyarılır. Bu hipotezi test etmek için qRT-PCR ile sıcaklık şok faktör (HSF) genlerinin ifade düzeyleri ve western blot ile bazı antioksidan enzimlerin (FeSOD, CAT, GPX, GR) protein miktarları belirlenmiştir.

1.2. Stres ve Stres Çeşitleri

Canlılarda normal sistemin fonksiyonlarını inhibe etme eğiliminde olan olumsuz etkiler ya da kuvvetler stres olarak tanımlanır (Kadioğlu, 2011). Bitkiler, biyotik ve abiyotik olmak üzere çeşitli stres faktörlerine maruz kalırlar. Abiyotik stres faktörler arasında, soğuk, sıcak, kuraklık, tuzluluk, su fazlalığı, radyasyon, çeşitli kimyasallar, oksidatif stres, rüzgar ve besin yetersizliği; biyotik stres faktörler arasında da, virüs, bakteri, fungus, böcekler ve diğer herbivorlar gösterilmektedir. Bütün bu faktörler, bitkilerin gelişim sürecini, hayatta kalmasını, biyokütle üretimini ve dolayısı ile verimini

olumsuz yönde etkilerler. Bu stres tiplerinin etkileri birbirleri ile ilişkilidir. Örneğin yüksek sıcaklığa dayanıklılık, genellikle onunla birlikte oluşan kuraklık koşullarına dayanıklılığa bağlıdır. Benzer şekilde donmaya dayanıklılık, dokunun dehidrasyona dayanıklılığı ile önemli derecede bağlantılıdır (Hale ve Orcutt, 1987).

1.3. Yüksek Sıcaklık Stresi

Yüksek sıcaklık stresi genellikle, bitki büyümesinde ve gelişiminde geri dönüşü olmayan bir hasara neden olan ve belirli bir süre boyunca eşik seviyesinin üzerindeki sıcaklık artışı olarak tanımlanır. Genel olarak, ortam sıcaklığındaki 10–15°C'lik geçici bir yükselme, sıcaklık şoku veya yüksek sıcaklık stresi olarak kabul edilir. Sıcaklıktaki artışlar bitkilerde, büyüme ve gelişimi etkileyerek, tarımsal verimde ciddi bir düşüşe yol açabilecek morfo-anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal değişimlere neden olur (Peet ve Willits, 1998).

Yüksek sıcaklık stresinin olumsuz etkileri, çeşitli genetik yaklaşımlar kullanılması ile termotoleranslı bitkiler geliştirilerek hafifletilebilir. Bunu gerçekleştirmek için bitkilerin yüksek sıcaklığa karşı fizyolojik cevaplarının, sıcaklık tolerans mekanizmalarının ve zirai bitkilerde termotoleransın iyileştirilmesine yönelik olası stratejilerin tam olarak anlaşılması gerekir. Sıcaklık stresi bitkilerin gelişim dönemlerinde farklı etkiler oluşturabilir. Örneğin, tohum çimlenmesi sırasında, yüksek sıcaklık bitki türlerine ve stresin yoğunluğuna bağlı olarak çimlenmeyi yavaşlatabilir. Daha sonraki aşamalarda, yüksek sıcaklık fotosentezi, solunumu, su ilişkilerini ve membran stabilitesini olumsuz yönde etkiler, hormonlar ile primer ve sekonder metabolitlerin seviyelerini değiştirebilir. Ayrıca, çeşitli sıcak şok proteinlerinin, strese bağlı diğer proteinlerin ve ROT üretiminin artması, sıcak stresi gösterilen önemli cevaplar arasındadır. Bitkilerin yüksek sıcaklık stresiyle başa çıkabilmeleri için membran stabilitesinin korunması, ROT'ların temizlenmesi antioksidanların üretimi, uyumlu çözünenlerin birikimi ve ayarlanması, mitojenle aktive olan protein kinazın (MAPK) ve kalsiyum bağımlı protein kinazın (CDPK), indüksiyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmaların harekete geçirilmesi gerekmektedir. Genetik yaklaşımlara ek olarak farklı ekzogenik uygulamalar ile bitkiler sıcaklığa karşı tolerans geliştirebilirler (Wahid vd., 2007).

1.3.1. Yüksek Sıcaklığın Büyüme Parametreleri Üzerine Etkisi

Tropik iklimlerde, aşırı miktarda radyasyon ve yüksek sıcaklık, genellikle bitki büyüme ve gelişimini ve ürün verimini sınırlandıran faktörlerdir. Yüksek sıcaklıklar, yapraklarda güneş yanıkları, sürgün ve kök büyümesinin engellenmesi, meyvelerde renk değişikliği ve verimin düşmesi gibi hasat öncesi ve sonrası önemli zararlara neden olabilir (Vollenweider ve Gunthardt-Goerg, 2005). Benzer şekilde, sıcaklık stresinin mısır da dahil olmak üzere birçok zirai bitkide verim ve kuru madde üretiminin azalmasında en önemli nedenlerden biri olduğu bildirilmiştir (Giaveno ve Ferrero, 2003). Bitkilerin yüksek sıcaklıklara karşı hassasiyeti, vejetatif ve üreme gibi bitki gelişim aşamasına göre değişkenlik gösterir. Örneğin vejetatif aşamada, yüksek gün sıcaklığı yaprak transpirasyon hızını etkileyerek bitkilerde su kaybına, üreme aşamasında ise kısa süreli bir sıcaklık stresi çiçek tomurcuklarının absisyonunda önemli artışlara neden olabilir. Zirai bitkiler sıcaklıkta sadece minimum artışları tolere edebilirler. Ancak sıcaklıktaki artış çiçeklenme aşamasında ise döllenme ve tohum üretimine zarar verebilir ve böylece meyve veriminde azalmalar meydana gelir (Sato vd., 2006). Ayrıca, dane dolumu sırasında yüksek sıcaklıklar buğday gibi tahıl ürünlerinde protein içeriğindeki değişimler de dahil olmak üzere diğer fiziko-kimyasal özelliklerini değiştirerek un ve ekmek kalitesini düşürebilir (Wardlaw vd., 2002). Bu nedenle, yüksek sıcaklıklar altında mahsul üretimi için, bitkilerin sıcaklık stresine en hassas olan gelişim aşamalarını ve bitki süreçlerini bilmek önemlidir. Bu tür bilgiler, zirai bitkilerin sıcaklık tolerans durumunun belirlenmesinde önemlidir. Yüksek sıcaklıklar internod uzunluğunda ciddi bir azalma meydana getirir. Böylece sürgün büyümesi olumsuz etkilenerek, bitkilerin erken ölümüne sebep olur (Hall, 1992).

1.3.2. Yüksek Sıcaklığın Membran Hasarı Üzerine Etkisi

Sıcaklık stresi lipid peroksidasyonuna bağlı olarak membran hasarında artışa neden olur (Amirjani, 2012). Bitkilerde stres etkisiyle oluşan serbest radikaller bitki hücrelerinde lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Thompson vd., 1987). Oksidatif stresin bir sonucu olarak gerçekleşen lipid peroksidasyonu, tiyobarbütirik asit reaktifleri (TBARS) içeriği ölçülerek belirlenir ve membran hasarı hakkında bilgi verir. Artan TBARS membran akışkanlığı, iyon taşınması, enzim aktivitelerinin kaybı gibi biyolojik membranların yapısında değişiklikler meydana getirir ve bu değişiklikler sonucunda hücre ölümleri

gerçekleşir (Sharma vd., 2012). Lipid peroksidasyonu normal şartlar altında doğal bir metabolik işlem olup, membran yapısı ve fonksiyonundaki ROT'ların etkisi en çok araştırılan konulardan birisidir (Blokhina vd., 2003). Diğer bir deyişle, ROT seviyeleri bitkinin antioksidan temizleme kapasitesinin azaldığı durumlarda, biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonunu artırır, böylece hücrenin fizyolojik süreçleri ciddi anlamda etkilenir. Şöyle ki özellikle SOD ve peroksidaz gibi bazı antioksidan enzim aktivitelerinin yüksek seviyede seyretmesini lipid peroksidasyonunun düşük seviyede tutmaktadır (Fu ve Huang, 2001). Stres altında lipidlerin oksidasyonu kat ve kat artabilir. Örneğin sıcaklık stresi şeker kamışı yapraklarında (Smirnoff, 1993) lipid peroksidasyonunu artırmıştır.

1.3.3. Yüksek Sıcaklığın Su Durumu Üzerine Etkisi

Yaprak su potansiyeli, nispi su içeriği, stomatal direnç, transpirasyon oranı, yaprak sıcaklığı ve kanopi sıcaklığı stres altındaki bitkilerde su durumu hakkında bilgi veren parametrelerdendir (Anjum vd., 2011). Yapılan araştırmalarda gelişim aşamasındaki mısır yapraklarının su potansiyelinin -0,6 ile -0,7 MPa'dan düşük olmaması gerekmektedir (Padurariu vd., 1969). Transpirasyon yaprak su potansiyeline en fazla etki eden olaylardan birisidir. Ayrıca toprak su durumuna bağlı olarak yaprak su içeriğinin azaldığı ve su durumundaki bu azalmaların çeşitli ekzogenik uygulamalarla giderildiği de bilinmektedir. Değişen ortam sıcaklıklarından etkilenen en önemli değişkenlerden birisi olan bitki su durumu nemin bol olduğu koşullarda muhafaza edilir. Bununla birlikte, yüksek sıcaklıklar, su kullanımını sınırlandırdığında bitki su durumu ciddi bir şekilde bozulur (Machado ve Paulsen, 2001; Mazorra vd., 2002). Tarla koşullarında yüksek sıcaklık stresi genellikle su miktarının azalmasına neden olur (Simoes-Araujo vd., 2003). Örneğin, *Lotus creticus*'ta, yüksek gece sıcaklıkları, stresli olmayan bitkilerle karşılaştırıldığında yaprak su potansiyelinde daha büyük bir azalmaya sebebiyet vermiştir (Anon vd., 2004). Şeker kamışında da toprak suyu ve bağıl nem koşulları normal olmasına rağmen, sıcaklık stresine maruz kaldığında kök hidrolik iletkenliğini etkileyerek yaprak su potansiyeli azalmıştır (Wahid ve Close, 2007). Benzer olarak, sıcaklık stresi altındaki domateste yaprak su ilişkileri ve kök hidrolik iletkenliğinin bozulduğu rapor edilmiştir (Morales vd., 2003).

1.3.4. Yüksek Sıcaklığın Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Oksidatif stres, farklı streslerin ortak bir metabolik yolu olarak bilinir (Apel ve Hirt., 2004). Bitkilerde oksidatif stresin düzenlenmesi, abiyotik stres toleransının bir göstergesi olarak kabul edilir (Hasanuzzaman vd., 2012). Yapılan bazı çalışmalar, abiyotik stres altında serbest radikallerin ve ROT üretimini belirgin şekilde arttırdığını göstermiştir (Hasanuzzaman vd., 2011). Sıcaklık stresi, singlet oksijen (1O_2), süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-) gibi ROT'ların üretimini hızlandırır ve böylece oksidatif stres uyarılır (Mittler vd., 2002). Bitki hücrelerinde ROT'lar genel olarak tüm organellerde, özellikle kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda aerobik metabolizmanın bir sonucu olarak üretilir. Ancak kloroplast, bitkilerde ROT'un ana kaynağı olarak kabul edilir (Apel ve Hirt., 2004; Sharma vd., 2012). Reaktif oksijen türleri, membran lipidlerinin ve pigmentlerinin otokatalitik peroksidasyonuna ve böylece membran geçirgenliğinin kaybına ve hücre fonksiyonlarının değişmesine neden olur (Xu vd., 2006). Sıcaklık stresi sırasında, ROT seviyesi çarpıcı bir şekilde artabilir ve bu da hücre yapısına önemli ölçüde zarar verebilir (Mittler, 2004). Vallelian-Bindschedler vd. (1998), çok kısa sıcaklık uygulamalarının bile O_2^- ve / veya H_2O_2 'nin oksidatif patlamalarına neden olabileceğini bildirmişlerdir. Sıcaklık stresi, hücrenin homeostatik dengesini bozabilir ve ROT'ların üretimini artırarak veya hücrede O_2 radikal temizleme kabiliyetini azaltarak lipid peroksidasyonunu uyarabilir (Bowler vd., 1992). Birçok araştırmacı tarafından yüksek sıcaklık stresi nedeniyle lipid peroksidasyonunda ciddi bir artış olduğu bildirilmiştir (Hasanuzzaman vd., 2012).

1.4. Reaktif Oksijen Türleri

1.4.1. Singlet Oksijen

Singlet oksijen (1O_2), fotoinhibisyon ve kloroplastlardaki fotosistem II'nin elektron transfer reaksiyonları sırasında oluşur. Singlet oksijen radikali proteinleri, çoklu doymamış yağ asitlerini ve DNA'yı doğrudan okside eder (Karuppanapandian vd., 2011). Hücre ölümünü tetikleyebilen ışığa bağlı fotosistem II aktivitesinin kaybından sorumlu en önemli radikal olduğu ileri sürülmüştür (Krieger-Liszkay, 2005). 1O_2 'nin zararlı etkileri β -karoten,

α -tokoferol ile veya fotosistem II'nin D1 proteini ile reaksiyona girmesiyle yatıştırılabilir (Krieger-Liszkay, 2008).

1.4.2. Süperoksit Anyonu

Kararsız bir yapıya sahip olan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) kloroplastlarda fotosistem I ve II'de elektron taşıma sisteminde görev alan moleküler oksijenin (O_2) birçok fotooksidasyon reaksiyonlarında (flavoprotein, redoks döngüsü) oluşur. Ayrıca Mehler reaksiyonunda, mitokondriyal ETS reaksiyonlarında, glikoksizomal foto-solunumunda, plazma membranlarında NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz ve membran polipeptitlerinde bir elektron transferi sonucu indirgenmesi ile meydana gelir (Halliwell, 1999). Süperoksit radikali moleküler oksijenin ferrodoksin (Fd_{ind}) aracılığı ile indirgenmesi sonucunda aşağıdaki tepkimeyle oluşur (Mehler, 1951).

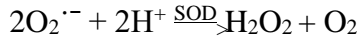


Normal metabolik koşullarda hücrelerde üretilen süperoksit, oksitleyici veya indirgeyici olarak görev alabilir. Oksijenden daha oksitleyici güce sahip olan süperoksit bir elektron daha alarak peroksit anyonuna indirgenir. Aerobik canlılarda $O_2^{\cdot-}$ 'lerin H_2O_2 'e dönüştürülmesi çok yüksek katalitik aktiviteye sahip bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından gerçekleştirilir. Aynı zamanda süperoksit, hafif asidik koşullarda SOD olmadan kendiliğinden de H_2O_2 'e çevrilebilir. SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde aşırı $O_2^{\cdot-}$ birikimine müsaade edilmez. Ancak çeşitli çevresel stres altında süperoksit yapımının artmasıyla süperokside özgü tepkimeler gerçekleşir. Örneğin, süperoksit radikali metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden metallerin salınımı gerçekleşebilir (Harbinson ve Hedley 1993).

1.4.3. Hidrojen Peroksit

H_2O_2 , stressiz koşullarda üretilebileceği gibi, kuraklık, yüksek ve düşük sıcaklık, UV ışınması, yoğun ışığa maruz kalma, yaralanma ve patojenler gibi çok çeşitli stresli koşullarda da üretilir. Kloroplast, mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membranının elektron taşıma reaksiyonları, yağ asidinin β -oksidasyonu ve fotorespirasyon,

bitki hücrelerinde H₂O₂ oluşumunun esas kaynaklarıdır (Mittler ve Zilinskas, 1991). H₂O₂ diğer oksijen radikallerinin aksine eşlenmemiş elektronlar ihtiva etmez, biyolojik membranları kolayca geçebilir ve dolayısıyla oluştuğu bölgeden uzakta bile oksidatif hasara neden olabilir. H₂O₂, membranlardaki akuaporinlerden ve hücre içindeki daha uzun mesafelerden yayılabilen tek ROT olduğundan ve diğer ROT'lar ile karşılaştırıldığında nispeten stabil olduğundan, belirli biyolojik işlemlerin düzenlenmesinde yer alan bir sinyal molekülü olarak işlev görür (Zaefyzadeh vd., 2009). Aynı zamanda H₂O₂, düşük konsantrasyonlarda çeşitli çevresel streslere karşı toleransı uyarmada etkin iken yüksek konsantrasyonlarda toksik etkilere sahiptir (Mittler ve Zilinskas, 1991). Hidrojen peroksidin toksik bir bileşik olarak bilinmesinin asıl nedeni, demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında OH⁻ radikalinin öncül bir molekülü olmasından kaynaklanır. H₂O₂ özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyinde reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Bu özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂'nin derhal ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. SOD enziminin katalizörlüğü ile hidrojen peroksit oluşumu aşağıdaki reaksiyon ile gerçekleşir (Asada vd., 1974).

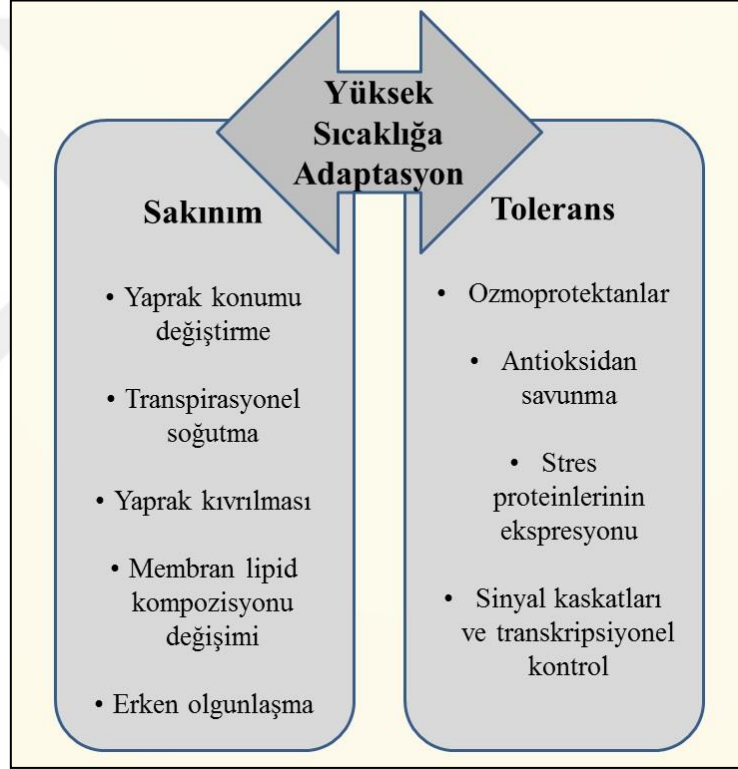


1.4.4. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali (OH⁻) hücredeki en reaktif oksidanlardandır. Pigmentler, proteinler, lipidler ve DNA gibi tüm biyomoleküller ve hemen hemen tüm hücre bileşenleri ile potansiyel olarak reaksiyona girebilir (Halliwell, 1999). Aşırı miktarda üretildiğinde ise hücrelerin ölümüne sebep olabilir. Hidroksil radikali H₂O₂ ve O₂⁻ anyonunun metal iyonları varlığında Haber-Weiss (Cu⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺) veya fenton (Fe²⁺ ve diğer geçiş metalleri; Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) reaksiyonu ile oluşur (Smirnoff 1993).

1.5. Yüksek Sıcaklık Stresine Karşı Bitki Adaptasyonu

Canlı organizmalar, tercih ettikleri büyüme sıcaklıklarına bağlı olarak düşük sıcaklık aralıklarında (0 ile 10°C) iyi büyüeyebilenler psikrofil, orta dereceli sıcaklık (10 ile 30°C) arasında iyi büyüeyebilenler mezofil, 30 ile 65°C arasında sıcaklıklarda (30 ile 65°C veya daha yüksek) büyüeyebilenler ise termofil olarak adlandırılırlar (Żróbek-Sokolnik, 2012). Bitki türleri sıcaklık stresine verdikleri cevap ve tolerans bakımından büyük farklılıklar gösterirler. Sıcaklık stresine karşı bitkilerin geliştirdiği adaptasyon kaçınma ve tolerans gibi mekanizmalar ile sağlanır (Fitter ve Hay, 2002, Şekil 1).



Şekil 1. Bitkilerin yüksek sıcaklıklara farklı adaptasyon mekanizmaları (Fitter ve Hay, 2002)

1.5.1. Yüksek Sıcaklıktan Sakınma Mekanizmaları

Yüksek sıcaklık altındaki bitkiler, hayatta kalmak için uzun vadeli evrimsel fenolojik ve morfolojik adaptasyonların yanısıra yaprak konumu değiştirme, transpirasyonel soğutma, membran lipid bileşiminin değiştirilmesi gibi kısa süreli kaçınma veya aklimasyon mekanizmalarını kullanırlar. Ayrıca yüksek sıcaklık stresi koşullarında

stomaların kapatılması ve su kaybının azaltılması da bitkideki yaygın olarak ortaya çıkan özelliklerdendir (Srivastava vd., 2012). Birçok tür, yılın en sıcak dönemlerinde yaşam periyodlarını devam ettirebilmek için kaçış mekanizması geliştirmiştir. Örneğin birçok zirai bitkide kaçış mekanizması olarak bilinen erken olgunlaşma, sıcaklık stresi altındaki verim kayıplarını azaltmak için başvurulan bir yoldur (Rodriguez vd., 2005). Ayrıca sıcak bir iklimde yetişen bitkiler, güneş ışınlarının emilimini azaltarak sıcaklık stresinden kaçınırlar. Bu özellik, yaprak yüzeyinde kalın bir yüzey oluşturan küçük tüyler ve koruyucu mumlu örtünün varlığı ile desteklenir. Diğer taraftan küçük yapraklı bitkilerin sıcaklık stresinden etkilenmeleri büyük yapraklı bitkilere oranla daha azdır. Çünkü küçük yapraklı bitkiler büyük yapraklı bitkilere oranla ısıyı ortama daha hızlı yayarlar. Bunlara ilave olarak bitkiler, terlemeyi kontrol altına almak için anatomik ve fizyolojik adaptasyonlar geliştirirler. Örneğin nemli bölgelerde yaşayan bitkilerde meydana gelen yüksek transpirasyon, yaprak sıcaklığını ortam sıcaklığından 6°C hatta 10–15°C daha düşük tutarak, yaprakları sıcaklık stresinden korurlar. Yüksek sıcaklık, birçok bitkide yaprak kıvrılma derecesini de etkileyebilir. Örneğin, sıcaklık stresi altındaki buğday bitkisinde yaprak kıvrılması su metabolizmasının etkinliğini artırmıştır (Sarieva vd., 2010).

1.5.2. Yüksek Sıcaklığa Tolerans Mekanizmaları

Sıcaklık toleransı bitkinin genellikle sıcaklık stresi altında büyümesi ve ekonomik olarak verimli olması olarak tanımlanır. Sıcaklık toleransı spesifik bir özellik olup, yakın ilişkili türler arasında, aynı bitkinin farklı organları ve hatta dokularında bile önemli ölçüde değişiklikler gösterebilir (Hasanuzzman vd., 2013).

Bitkiler, uzun süreli yüksek sıcaklıklar altında gelişebilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalara örnek olarak, iyon taşıyıcıları, geç embriyogenez bolluk (LEA) proteinleri, ozmoprotektanlar, antioksidan savunma ve sinyal kaskadlarında ve transkripsiyonel kontrolde rol oynayan faktörler verilebilir (Rodriguez vd., 2005). Ani sıcaklık stresi durumunda ise yaprak konum değişimi, transpirasyonel soğutma ve membran lipid bileşimindeki değişiklikler gibi kısa süreli sakinme cevaplar bitkilerin hayatta kalması için oldukça önemlidir (Rodriguez vd., 2005). Ayrıca kaçış mekanizması olarak adlandırılan ve yaz aylarında erken olgunlaşma sonucu daha az verim kayıplarının olması diğer bir sıcaklık stresi sakinim mekanizmasıdır (Adams vd., 2001). İyonik ve ozmotik etki veya membran akışkanlığındaki dengenin bozulması bir stres sinyali olarak

algılanabilir. Tolerans mekanizmaları da bu dengenin yeniden kurulmasına ve hasar görmüş proteinlerin, membranların korunmasına ve onarılmasına yardımcı olur (Vinocur ve Altman, 2005).

1.5.2.1. Antioksidan Sistem

Bitkiler, ROT'ların zararlı etkilerini en aza indirmek için çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemlerine sahiptir. Enzimatik olanlara örnek olarak: katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GPX), süperoksit dismutaz (SOD), enzimatik olmayanlara ise askorbat (AsA), glutatyon (GSH), tokoferoller, karotenoidler verilebilir. Antioksidanlar hücrel hasar ve ölümle sonuçlanan ROT üretimini sınırlandırmak süpürücü olarak etki ederler. Bitkilerde sıcaklık stresine tolerans ile antioksidanlardaki artış arasında pozitif bir ilişkili olduğunu gösteren çok sayıda çalışmalar mevcuttur (Zhao vd., 2009). Yüksek sıcaklık stresi altında bitkilerin enzimatik olmayan bileşikleri biriktiği ve enzimatik antioksidan aktivitelerini arttırdığı bulunmuştur (Lin vd., 2010; Soengas vd., 2018).

1.5.2.1.1. Süperoksit Dismutaz

Metalloenzim süperoksit dismutaz, $O_2^{\cdot-}$ 'yi H_2O_2 'ye dönüştüren reaksiyonu katalizler. Aktif bölgelerindeki metal iyonuna göre SOD; bakır ve çinko (Cu / Zn SOD), manganez (MnSOD) veya demir (FeSOD) olarak sınıflandırılır. Merkezinde aktif Ni bulunan bir başka SOD tipi *Streptomyces*'te keşfedilmiştir (Kim vd., 1996). Cu / ZnSOD, bitki hücrelerinin sitozol ve kloroplastında, MnSOD mitokondri ve peroksizomların matrisinde bulunur. Ayrıca *Zea mays*'ın (mısır) altı SOD izoenzimi içerdiği bulunmuştur (Scandalios, 1993). Yapılan çalışmalarda; SOD'ların ifadesindeki artışların biyotik ve abiyotik strese bağlı oluşan oksidatif stresle başa çıkmada ve bitkilerin stres koşulları altında canlılıklarını sürdürmede önemli rollerinin olduğu ileri sürülmüştür. Örneğin, çeşitli stres koşulları altında *Morus alba* L. (dut), *Cicer arietinum* L. (nohut) ve *Lycopersicon esculentum* (domates) gibi birçok bitkide gerçekleştirilen çalışmalarda SOD aktivitesinde meydana gelen artışların oksidatif stres ile başatmede etkili olduğu bulunmuştur (Attia vd., 2009).

1.5.2.1.2. Askorbat Peroksidaz

Askorbat peroksidaz (APX), AsA-GSH döngüsünün merkezi bir bileşenidir ve hücre içi ROT seviyelerinin kontrolünde önemli bir rol oynar. Katalaz (CAT), peroksizomlardaki H₂O₂'yi ağırlıklı olarak temizlerken, APX de sitozol ve kloroplastta aynı işlevi görür. Şöyleki APX, indirgeyici madde olarak Askorbik Asit (AsA) kullanarak H₂O₂'yi H₂O ve DHA'ya düşürür. Yüksek bitkilerde amino asit sekanslarına dayanarak, APX'in kimyasal ve enzimatik olarak belirgin beş izoenzimi sitozolik, mitokondriyal, peroksizomal ve kloroplastik (stromal ve thylakoidal) gibi farklı hücre içi lokalizasyonda bulunmuştur (Sharma ve Dubey, 2004).

1.5.2.1.3. Katalaz

Antioksidan enzimler arasında, keşfedilen ve karakterize edilen ilk enzim katalazdır (CAT). Peroksizomlarda bulunan hidrojen peroksit (H₂O₂) molekülünün su ve oksijene ayrışmasını katalize eden ve tetramerik hem grubu içeren bir enzimdir. Yağ asitlerinin β-oksidasyonu, fotorespirasyon, pürin katabolizması ve oksidatif stres nedeniyle peroksizomlar H₂O₂ üretiminin ana bölgeleridir (Mittler, 2002). Ancak son zamanlarda her ne kadar CAT'ın sitozol, kloroplast ve mitokondri gibi diğer hücresel bölümlerde bulunduğu rapor edilse de, bu bölümlerde CAT aktivitesinin henüz görülmediği rapor edilmiştir (Mhamdi vd., 2010).

1.5.2.1.4. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz, stresli ve stressiz koşullarda aşırı biriken H₂O₂'yi temizleyen, 40-50 kDa ağırlığındaki monomerlerden oluşan ve hem grubu içeren bir enzimdir. Glutatyon peroksidaz oksidatif strese karşı bitkileri korumada görevlidir. Arabidopsis'in çeşitli organellerinde tanımlanmış yedi proteinden oluşmuş (AtGPX1-AtGPX7) geniş bir GPX ailesi belirlenmiştir (Millar, 2003). Ayrıca stresli koşullarda GPX'in *Lycopersicon esculentum*, *Capsicum annuum* L., *Pisum sativum* gibi birçok bitkide koruyucu rolü olduğu da bulunmuştur (Dixit vd., 2001; Leisinger vd., 2001).

1.5.2.1.5. Monodehidroaskorbat Redüktaz

Monodehidroaskorbat redüktaz, NADPH'ı indirgeyici madde olarak kullanarak MDHA'dan askorbik aside (AsA) dönüşümünden sorumlu olup, hücrel AsA havuzunun yenilenmesini sağlar. MDHAR, askorbik asiti yenilediğinden, peroksizomlarda ve mitokondrilerde APX ile birlikte bulunur. Kloroplast, mitokondri, peroksizom, sitozol ve glisoksizomlarda sınırlı sayıda MDHAR izoenzimin bulunduğu tespit edilmiştir (Mittler, 2002).



1.5.2.1.6. Dehidroaskorbat Redüktaz

Dehidroaskorbat, elektron vericisi olarak indirgenmiş glutasyonu (GSH) kullanarak dehidroaskorbatı (DHA) AsA'ya indirger (Eltayeb vd., 2007). Dehidroaskorbat redüktaz, MDHAR gibi AsA havuzunu düzenleyen diğer bir enzimdir. Dehidroaskorbat redüktaz tohumlarda, köklerde ve sürgünlerde bol miktarda bulunur (Das ve Roychoudhury, 2014).

1.5.2.1.7. Glutatyon Redüktaz

Glutatyon redüktaz NADPH'ı indirgeyici olarak kullanarak GSSG'yi GSH'a indirgeyen bir flavoprotein oksido redüktazdır. İndirgenmiş glutatyon (GSH), monodehidroaskorbat ve dehidroaskorbattan askorbik asitin (AsA) yeniden oluşumu için kullanılır. AsA-GSH döngüsünün önemli bir enzimi olan GR, yüksek bir hücrel GSH / GSSG oranını korumak için glutatyon disülfid içerisinde bir disülfid bağ oluşumunu katalize eder. GSH, tiyol gruplarının oksitlenmesini önlemek için indirgeyici bir rol oynayan düşük molekül ağırlıklı bir bileşiktir (Das ve Roychoudhury, 2014).

1.5.2.1.8. Askorbik Asit

Askorbik asit en çok çalışılan ve en güçlü antioksidanlardan birisidir ve birçok hücre tipinde, organellerde ve apoplasta bulunur (Smirnoff, 2000). Normal olarak indirgenmiş formda askorbat (AsA), askorbat havuzunun %90'ını oluşturur ve hücre içi

konsantrasyonu, sitozolde 20 mM, kloroplast stromasında 20-300 mM arasında değişkenlik gösterir (Noctor ve Foyer, 1998). AsA'nın çok çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarda elektron verici yeteneği, AsA'yı en iyi ROT temizleyici bir bileşik yapar. AsA, $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} ve 1O_2 'yi doğrudan temizleyebilir ve APX reaksiyonu yoluyla H_2O_2 'yi H_2O 'ya dönüştürür (Noctor ve Foyer, 1998). Kloroplastlarda AsA, viyoloksantin de-epoksidaz'ın bir kofaktörü olarak görev yapar ve böylece kloroplastlardaki aşırı enerjiyi dağıtmış olur (Smirnoff, 2000).

İçsel AsA bitkilerin büyüme ve gelişimini düzenlemesinin yanı sıra, bitkilerde devam eden metabolik süreçleri, H_2O_2 'ye ve diğer toksik oksijen türevlerine karşı korur. AsA, esas olarak indirgeyici olarak işlev görür ve birçok serbest radikal türünü temizler. Değişik biyotik ve abiyotik stres koşullarında *Crocus sativus* L., *Arabidopsis thaliana* L., *Pisum sativum* L., *Nicotiana. tabacum* L., *Phyllostachys nigra* L., *Hordeum vulgare* ve daha pek çok bitkide askorbik asit ile ilişkili enzimlere ait gen ifade seviyelerinin arttığı saptanmıştır (Hollander-Czytko vd., 2005).

1.5.2.1.9. Glutasyon

Glutasyon kloroplast, mitokondri, ER, vakuol ve sitozol gibi hemen hemen tüm hücrel bileşenlerde meydana gelen ve çok sayıda fonksiyonu yerine getiren, bitki dokularında bol miktarda bulunan bir tripeptittir (Noctor ve Foyer, 1998). Oksitlenmiş formu (GSSG) ile birlikte GSH, hücrel bölümlerde redoks dengesini korumada önemli roller üstlenir (Foyer vd., 1997). Glutasyon bitkilerde oksidatif streste rolü olan en önemli antioksidan bileşiklerden birisidir. GSH'nin antioksidan savunmadaki merkezi rolü, diğer bir suda çözünebilir güçlü antioksidan olan askorbatı, AsA-GSH döngüsü yoluyla yeniden üretme kabiliyetinden kaynaklanır (Noctor ve Foyer, 1998). Hücrel GSH'nin konsantrasyonu, antioksidan işlev üzerinde büyük bir etkiye sahip olup, abiyotik stres durumlarında önemli ölçüde değişiklik gösterebilir. Ayrıca yüksek GSH konsantrasyonunun bitkilerin metal kaynaklı oksidatif strese dayanıklılık kabiliyetleriyle ilişkili oldukları da bilinmektedir. Antioksidan özelliği dışında GSH'nin bitkilerin büyüme ve gelişimi ile ilgili olaylarda da merkezi bir role sahip olduğu bilinmektedir (Khan ve Sing, 2008).

1.5.2.1.10. Karotenoid

Karotenoidler, lipofilik antioksidanlar grubuna aittir ve çeşitli ROT formlarını detoksifiye edebilirler (Young, 1991). Karotenoidler doğada 600'ün üzerinde çeşidi olan bitki ve mikroorganizmalarda bulunan pigmentlerdir. Bitkilerde karotenoidler görünür ışık spektrumun 400 ila 550 nm arasındaki ışığı absorbe ederler ve yakaladığı enerjiyi klorofile iletirler (Sieferman-Harms, 1987). Bir antioksidan olarak, oksidatif hasarı engellemek ve fotosentetik aygıtını korumak için 1O_2 'yi temizlerler. Karotenoidler ayrıca bitki gelişimini ve biyotik / abiyotik stres cevaplarını düzenleyen sinyal moleküllerinin habercisi olarak da görev yaparlar (Vallabhaneni vd. 2008). Bitki metabolizmasında oksidatif stres toleransını da içeren birçok rolü olan bu antioksidanların yüksek sıcaklık koşullarında Arabidopsis'te artan oksidatif stres hasarlarının yatıştırılmasında etkili olduğu rapor edilmiştir (Meiri vd., 2010)

1.5.2.2. Metilglioksal

Metilglioksal (MG; CH_3COCHO) glikoliz, fotosentez, lipid peroksidasyonu ve proteinlerin oksidatif degradasyonu dahil olmak üzere birçok metabolik yolun yan ürünü olarak oluşan bir bileşiktir. Bitkilerde MG üretimi kendiliğinden ve kaçınılmaz olup, abiyotik ve biyotik stresler altında birikimi oldukça fazladır (Singh ve Dhaka, 2015).

MG üretiminin ana yolunu hem normal hem de stres koşullarında temel olarak glikolitik yoldan üretilen gliseraldehit-3-fosfat (GAP) ve dihidroksiaseton fosfat (DHAP) trioz fosfat izomerlerinin kendiliğinden (enzimatik olmayan) parçalanması ile oluşur (Kaur vd., 2014). Glikolitik kaynakların yanı sıra, keton bileşiklerinin ve şekerlerin kendiliğinden oksidasyonu, indirgen şekerler ve amino asitler arasındaki Maillard reaksiyonu, lipid peroksidasyonu MG'nin enzimatik olmayan oluşumuna da katkıda bulunur (Sousa Silva vd., 2013). Bitkiler MG'yi toksik olmayan veya daha az toksik moleküllere dönüştürmek için farklı enzimler geliştirirler ve böylece MG konsantrasyonu kontrol altına alınmış olur. GSH'ı gerekliliklerine bağlı olarak, MG-detoksifiye edici enzimler: GSH bağımlı ve GSH bağımsız olmak üzere iki gruba ayrılır. GSH-bağımlı glioksalaz yolu, glioksalaz I ve glioksalaz II ile katalizlenen iki ardışık reaksiyondan oluşur. İlk adımda MG ve GSH arasında bir reaksiyon gerçekleşerek hemitiyoasetal (HTA) oluşur daha sonra oluşan bu bileşiğin glioksalaz I ile S-D-laktoilglutatyona (SLG) dönüşümü sağlanır. İkinci aşamada,

gliksalaz II GSH molekülünü sisteme geri dönüştürür ve D-laktat oluşturmak için, SLG'yi hidrolize eder. Böylece bitkilerin MG detoksifikasyonu GSH homeostazının muhafaza edilmesine katkı sağlar (Singh ve Dhaka, 2015).

1.5.2.2.1. Gliksalaz Sistem ve Sıcaklık Toleransı

Abiyotik ve biyotik stresler altında, gliksilazlar farklı şekilde düzenlenir ve aşırı ifade edilmeleri sonucunda bitkiler, çeşitli abiyotik streslere karşı daha yüksek tolerans sağlar (Yadav vd., 2005a). Son zamanlarda gliksalaz sisteminin düzenleyici rolleri bitkilerde abiyotik stres toleransı araştırmasında büyük ilgi çekmiştir. Bitki gliksilaz sistemin güçlü bir stres tolerans cevabı oluşturmak için önemli olduğu düşünülmektedir (Sousa Silva vd., 2013). Yapılan birçok araştırma, bitkilerde gliksilaz sisteminin stres toleransının sağlanmasında ve oksidatif savunma sistemlerinin uyarılmasında rol oynadığını göstermiştir (Yadav vd. 2005a). Ayrıca içsel MG'nin, birçok bitki türünde yüksek ve düşük sıcaklık, tuzluluk, kuraklık, ağır metal ve yüksek ışık stresleri gibi abiyotik stresler altında yaklaşık 2-6 kat arttığı ve birikiminin temel stres yanıtları ile yakından ilişkili olduğu kaydedilmiştir (Yadav vd., 2005a)

1.5.2.3. Sıcaklık Stresinin Ozmolit Biyosentezi ile İlişkisi

Tuzluluk, su eksikliği ve aşırı sıcaklıklar dahil olmak üzere, abiyotik stresler altında yetiştirilen bitkilerde düşük molekül ağırlıklı ozmolitlerin birikimi, önemli tolerans mekanizmaları arasında gösterilir (Hare vd., 1998; Sakamoto ve Murata, 2000). Stres altında bitkilerin biriktirdiği ozmolitler; şekerler, şeker alkoller (polioller), prolin, glisin betain, üçüncül ve kuaterner amonyum bileşikleri ve üçüncül sülfonyum gibi bileşiklerdir (Sairam ve Tyagi, 2004). Yüksek sıcaklıkta ozmolitlerin birikimi, hücre su dengesini, membran stabilitesini devam ettirerek ve hücrel redoks potansiyeli tamponlayarak ozmotik aktiviteyi düzenler ve böylece hücrel yapılar korunmuş olur (Farooq vd., 2008). Bu tür çözünen maddelerin birikimi, aşağıda kısaca tarif edildiği gibi bitkilerin strese toleransının artmasına katkıda bulunabilir.

Amfoterik bir kuaterner amin olan glisin betain (GB), tuzluluk veya yüksek sıcaklık altındaki bitkilerde çözünen madde olarak önemli bir rol oynar (Sakamoto ve Murata,

2002). Stres altında GB'yi sentezleme kapasitesinin türden türe farklılık gösterdiği ileri sürülmüştür (Ashraf ve Foolad, 2007). Örneğin su eksikliğinden veya yüksek sıcaklıktan etkilenen şeker kamışında yüksek düzeyde GB birikimi olduğu rapor edilmiştir (Wahid ve Close, 2007). Ancak, *Oriza sativa*, *Brassica spp.*, *A. thaliana* ve *N. tabacum* gibi bitki türleri stres koşullarında GB üretmediği bulunmuştur (Sakamoto ve Murata, 2002). Glisin betain gibi prolinin de daha yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunduğu ve normal olarak çevresel streslere cevap olarak yüksek miktarlarda biriktirildiği bilinmektedir (Kavi Kishore vd., 2005). Prolin ve GB gibi çözünebilen maddelerin birikiminin fonksiyonel önemini değerlendirirken, sıcaklık ve diğer çevresel stresler altındaki sentezinin hücrel redoks potansiyelini tamponladığı rapor edilmiştir. Benzer şekilde, sıcaklık stresi altındaki şeker kamışında sıcaklık stresine tolerans için çözünebilir şekerlerin biriktirildiği rapor edilmiştir (Wahid ve Close, 2007). Ayrıca yüksek sıcaklıklarda, domates bitkilerinde meyve gelişimi erkek üreme organının gelişimi sırasında şeker metabolizması ve prolin taşınımının bozulması nedeniyle başarısız olduğu bulunmuştur (Sato vd., 2006). Trehaloz, fruktan veya mannitol üretmek üzere tasarlanan transgenik bitkilerde heksoz algılaması, strese dayanıklı fenotipler için önemli bir katkı faktörü olmuştur (Hare vd., 1998). Yüksek sıcaklık altında artan karbohidratların (glukoz, sukroz vb.) kullanılabilirliği bitkilere yüksek sıcaklık stres toleransı ile ilgili önemli bir fizyolojik özellik kazandırmıştır (Liu ve Huang, 2000). Ayrıca şekerler çeşitli stres altındaki bitkilerde antioksidan olarak da etki edebilir (Lang-Mladek vd., 2010). Örneğin sakkarozun düşük konsantrasyonlarda bir sinyal molekül, yüksek konsantrasyonlarda ise bir ROT temizleyicisi olarak görev yaptığı kaydedilmiştir (Altuntaş vd., 2019).

1.5.2.4. Bitkilerin Sıcaklığa Toleransında Absisik Asidin Rolü

Abiyotik stressörlere verilen bitki cevapları, fitohormonların da dahil olduğu çeşitli faktörlere bağlıdır. Fitohormonların, stresli koşullar altında hayatta kalan bitkilerde fizyolojik ve moleküler tepkileri modüle eden en önemli endojen maddeler olduğu düşünülmektedir (Fahad vd., 2015). Stres hormonu absisik asit (ABA), tohum dormansisi ve gelişimi, embriyo morfogenezi, stoma açılması ve aynı zamanda depolama proteinleri ve lipidlerinin sentezi dahil olmak üzere çeşitli bitki fizyolojik süreçlerini ve gelişim aşamalarını düzenler (Ciura ve Kruk, 2018). Ayrıca bitki savunma cevaplarında ve sıcaklık, soğukluk, kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik streslere toleransta anahtar rol oynar

(Lee ve Luan 2012). ABA, koruyucu proteinlerin (LEA proteinleri, dehidrinler), ozmoprotektanlar, antioksidan enzimler ve turgorun korunmasından da sorumludur. ABA içeriği, çevresel streslere cevap olarak artar, gen ekspresyonunun aktifleşmesine neden olan sinyal yollarını aktive eder (Wani vd., 2016).

1.5.2.5. Sıcaklık Stresine Toleransta Sıcak Şok Faktörlerinin Rolü

Bitkiler, yüksek sıcaklığa toleransta sıcak şok faktörlerinin (HSF'ler) de dahil olduğu transkripsiyon faktörleri (TF'ler) tarafından düzenlenen stresten sorumlu genlerin ifadesini uyarırlar. Sıcaklık stresi de dahil olmak üzere çeşitli abiyotik streslerde HSF'lerin merkezi rolleri hakkında birçok çalışma mevcuttur. Örneğin, daha önceki raporlarda bitki genomunda ve genom ölçeğinde 20'den fazla bitki türünden çok sayıda HSF gen ailesi tanımlanmıştır. Arabidopsis'te 21, domateste 24, biberde 25, soya fasulyesinde 52, buğdayda da en az 56 adet HSF kodlayan gen olduğu bulunmuştur (Scharf vd., 2012; Xue vd., 2014; Guo vd., 2015). Bitki HSF'lerinin abiyotik streslerde, özellikle de sıcaklık stresindeki rolü son zamanlarda çalışılmıştır (Fragkostefanakis vd., 2015). Farklı abiyotik stresler altında bitki HSF genlerinin genom çapında ifade profili, çeşitli türlerde ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Bitki HSF'lerindeki çoğu sıcaklık stresi tarafından düzenlenmektedir. Sıcaklık stresi ile ilgili olarak HSFA2 ve A6 üyelerinin transkript seviyelerinin, buğdayda baskın HSF'ler haline geldiği ve HSF'lerin sıcaklık stresi sırasında önemli bir düzenleyici role sahip oldukları ortaya koyulmuştur (Xue vd., 2014). HSF'ler ayrıca bitkilerde, sıcak şok proteinleri (HSP'ler) gibi strese cevap veren genlerin ekspresyonunu düzenleyerek birçok abiyotik strese cevap vermede önemli bir rol oynamaktadır (Guo vd., 2016). HSP100'ler, HSP90'lar, HSP70'ler, HSP60'lar ve sHSP'ler (küçük HSP'ler) dahil HSP'ler, birçok normal hücrel işlem sırasında protein konformasyonunu sağlayıp membranları stabilize ederler ve strese karşı bitkileri korumak için moleküler şaperonlar olarak görev yaparlar. Böylece stresten etkilenen hücrel homeostaziyi yeniden sağlamış olurlar (Waters, 2013). Mısır, ayçiçeği, fasulye, buğday ve tütünde olmak üzere sıcaklık kaynaklı bir dizi HSP'nin, aşırı bir şekilde uyarıldığı belirlenmiştir (Zou vd., 2009).

1.6. *Heliotropium thermophilum* Hakkında Genel Bilgiler

Heliotropium L. cinsi dünyanın ılıman sıcak bölgelerinde bulunan yaklaşık 250 tür ile temsil edilir ve bu türlerin Türkiye'de kaydedilen on beş türü mevcuttur. *Heliotropium thermophilum* (Sarı bambul) bitkisi Boraginaceae (Hodangiller) familyasından olup *Heliotropium* cinsine aittir ve Tan ve arkadaşları tarafından ilk olarak 2008 yılında Türkiye'de yeni bir tür olarak yayınlanmıştır. *H. thermophilum* termofil ve endemik bir çiçekli bitkidir. Bitkinin toprak üstü kısımlarında örtü tüyleri mevcuttur. Doğal ortamına ait bitkinin fotoğrafı Şekil 2'de sunulmuştur. Bitkinin doğal yayılış alanları, Batı Anadolu'da Aydın-Buharkent'deki 55-65°C'de sıcaklıklardaki jeotermal bir alanlardır. Jeotermal suyun kaynağı bu alanın daha öncesinde yeralan Kızıldere'de bulunmakta olup, su sıcaklığı bu bölgede yaklaşık 116°C civarındadır. Jeotermal su, ilkbahar ortalarından sonra ve yaz mevsiminde kaynaktan Buharkent'e akarken yukarıda belirtilen derecelere (55-65°C) kadar soğumaktadır (Tan vd., 2008).

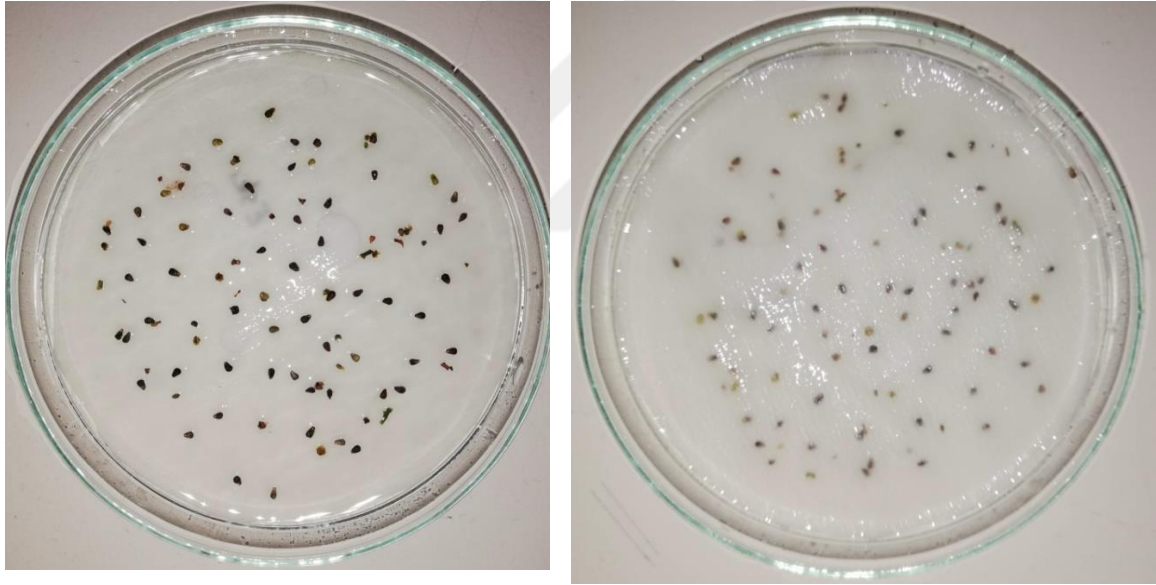


Şekil 2. Doğal ortamında *Heliotropium thermophilum* bitkisi (Tan vd., 2008)

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitki Tohumlarının Temini ve Bitkilerin Yetiştirilmesi

Aydın ili Buharkent Jeotermal alanından toplanmış olan *H. thermophilum* tohumları çimlendirilmeden önce, petri kabında nemlendirilmiş filtre kâğıtlarında +4°C'de 2 gün boyunca soğuk şokuna maruz bırakıldı (Şekil 3). Bu muamelenin ardından tohumlar bitki büyütme odasında (23±2°C, % 50 nem, ışık şiddeti 400 µmol m⁻²s⁻¹, 16 saat ışık/8 saat karanlık periyodunda) doğal ortamından alınan toprakları ihtiva eden kaplara ekildi. Toprak suları düzenli olarak kontrol edildi. Çimlenme aşaması 20±5°C toprak sıcaklığında gerçekleştirildi (Tan vd., 2008).



Şekil 3. *H. thermophilum* tohumlarının iki katlı ıslak filtre kağıdı arasında petri kaplarındaki görünümü

2.2. Bitkilere Sıcaklık Uygulamaları

20±5°C'de çimlenmesi gerçekleşen tohumlar, yapılan denemelerden yola çıkılarak bitki ölümlerinin önüne geçilebilmesi ve çalışmaların sağlıklı gerçekleştirilebilmesi için sıcaklık uygulamaları bitkilere kademeli olarak (Gülen vd., 2004; Gür vd., 2010)

laboratuvar ortamında kontrollü şartlar altında gerçekleştirildi. Sıcaklık uygulamaları istenilen sıcaklığa ayarlı ısı ünitelerinde (Şekil 4) toprağın ısıtılması ile sağlandı.



Şekil 4. Çalışmalarda kullanılan toprak sıcaklığını sağlayan ısı ünitesi

Gruplandırma $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ (Kontrol) toprak sıcaklığında büyümeye devam eden, kademeli olarak artırılan 40 ± 5 , 60 ± 5 ve $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ yüksek toprak sıcaklığında büyüyen gruplar olmak üzere 4 farklı şekilde oluşturuldu. Kontrol dışındaki yüksek toprak sıcaklık uygulamaları termofil bitki için hafif, orta ve aşırı yüksek sıcaklık olmak üzere 3 farklı şekilde gerçekleştirildi. Şöyle ki;

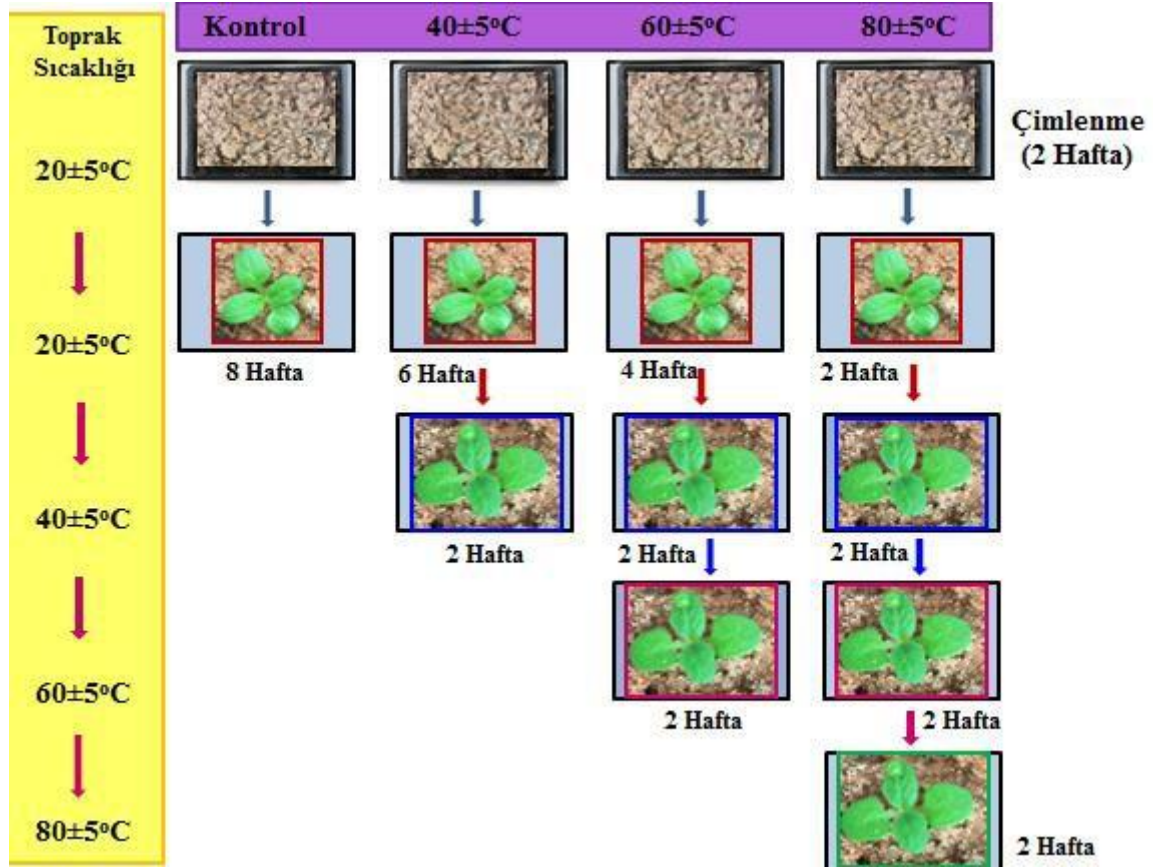
Grup I: Stressiz (Kontrol- $20\pm 5^{\circ}\text{C}$), ilk 2 hafta $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında çimlenen tohumlar aynı ortamda 8 hafta boyunca büyütüldü.

Grup II: Hafif yüksek sıcaklık ($40\pm 5^{\circ}\text{C}$), ilk 2 hafta $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında çimlenen tohumlar aynı ortamda 6 hafta boyunca büyütülerek, 2 hafta boyunca $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığına maruz bırakıldı.

Grup III: Orta yüksek sıcaklık ($60\pm 5^{\circ}\text{C}$), ilk 2 hafta $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında çimlenen tohumlar aynı ortamda 4 hafta boyunca büyütülerek, kademeli olarak 2 hafta $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığına, sonrasında da 2 hafta $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığına maruz bırakıldı.

Grup IV: Aşırı yüksek sıcaklık ($80\pm 5^{\circ}\text{C}$), ilk 2 hafta $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında çimlenen tohumlar aynı ortamda 2 hafta boyunca büyütülerek, kademeli olarak, 2 hafta $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığına, 2 hafta $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığına ve son olarak da 2 hafta

$80\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığına maruz bırakıldı. Deney gruplarının oluşturulması ve uygulamaların şeması Şekil 5'te verilmiştir:



Şekil 5. Deney gruplarının oluşturulması ve uygulamaların şeması. Şekildeki *H. thermophilum* bitkileri sıcak ayarlı ısı ünitelerinde büyütülmekte olup, bitki fotoğrafları deney düzeneğini şematize etmek için kullanılmıştır.

Her grup kendi toprak uygulama sıcaklığına toplamda 2 hafta boyunca maruz bırakılmış oldu. Uygulamalar tamamlandığında bitkiler toplamda 10 haftalık oluncaya hasat işlemi tamamlandı. Fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler analizler için bitkilerin yaprakları kullanıldı. Yaprak su potansiyeli ve stoma iletkenliği örneklemeden önce canlı bitkiler ile gerçekleştirilirken sürgün, kök uzunluğu ve sürgün yaş ve kuru ağırlığı örneklemeden hemen sonra gerçekleştirildi. Daha sonrasında hasat edilen bitkiler fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler analizler için -20°C ve -80°C 'de saklandı.

2.3. Toprak Sıcaklıklarının ve Yaprak Yüzey Sıcaklıklarının Ölçülmesi

Çalışmamızda toprak sıcaklık uygulamaları $20\pm 5^{\circ}\text{C}$, $40\pm 5^{\circ}\text{C}$, $60\pm 5^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ olmak üzere 4 farklı sıcaklıkta yapılmış olup, bu sıcaklık ölçümleri 5 cm toprak derinliklerinde dijital bir termometre ile belirli aralıklarla ölçülerek kaydedildi. $20\pm 5^{\circ}\text{C}$, $40\pm 5^{\circ}\text{C}$, $60\pm 5^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıklarda yetiştirmeye devam eden bitkilerin yapraklarına ait yüzey sıcaklıkları ise infrared dijital termometre (TROTEC BP21) ile ölçüldü. Ölçümlerde kullanılan termometreler Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. Toprak sıcaklığı ve yaprak sıcaklığının ölçümünde kullanılan termometreler
(A) Batırmalı dijital termometre (B) İnfrared dijital termometre

2.4. Büyüme Parametrelerindeki Değişimlerin Belirlenmesi

Dört farklı toprak sıcaklığına (20 ± 5 , 40 ± 5 , 60 ± 5 ve $80\pm 5^{\circ}\text{C}$) kademeli olarak aktarılan *H. thermophilum* bitkileri toplamda 10 hafta boyunca büyütüldü ve bu sürenin sonunda aşağıdaki ölçümler gerçekleştirildi.

2.4.1. Sürgün ve Kök Uzunluklarının Ölçülmesi

Her deney grubuna ait bitkiler 10 hafta sonunda hasat edildi ve bitki başına ortalama kök ve sürgün uzunluğu kaydedildi.

2.4.2. Sürgün Taze Ağırlığının ve Kuru Ağırlığının Belirlenmesi

Her bir deney grubundan 5'er tekrarlı olacak şekilde *H. thermophilum* bitkilerinin sürgün taze ağırlıkları (TA) tartıldı ve kaydedildi. Taze ağırlıkları hesaplanmış sürgünler 70°C'de 72 saat boyunca etüvde kurutuldu ve sürgünlerin kuru ağırlıkları (KA) hesaplandı.

2.5. Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişimlerin Belirlenmesi

2.5.1. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler

Lipid peroksidasyonu, Heath ve Packer' a (1968) göre 0,1 g taze yapraktaki TBA-reaktif maddelerin (TBARS) içeriğinin ölçülmesi ile belirlendi. Her bir numune 10 mL % 0,1 trikloro asetik asit (TCA) içerisinde homojenize edildi. Homojenat 15 000 g'de 5 dak santrifüj edildi. Süpernatanta (1 mL) % 20 TCA içerisinde hazırlanmış % 0,5 tiobarbitürik asit (4 mL) ilave edildi. Karışım 95°C'de 30 dak ısıtılmasının ardından buz banyosunda soğutuldu, 10 000 g'de 10 dak santrifüj edildi. TBARS konsantrasyonunun hesaplanması için 532 ve 600 nm'de absorbansı okundu.

2.5.2. Hidrojen Peroksit İçeriğinin Belirlenmesi

Velikova vd. (2000) tarafından geliştirilen metot kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için TCA içerisinde aktif kömür ile ezilen yaprak numunelerinden elde edilen ekstraktın santrifüjünden sonra süpernatantın (1 mL) üzerine 10 mM potasyum fosfat tamponu ve 1 M potasyum iyodür (KI) ilave edilmesiyle oluşan karışım 390 nm'de absorbansları okundu. Hesaplamalar için gerekli standartlar ve standartlardan elde edilen standart eğrisi Ek 1'de sunuldu.

2.5.3. 3,3' - Diaminobenzidin Boyama

Hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığının belirlenmesi için DAB boyama protokolü Daudi vd. (2012) metodundan modifiye edildi. Bitki yaprakları % 0,05 v/v Tween 20 ve 10 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0) hazırlanan DAB'a maruz bırakıldı. Sonrasında yapraklar test tüplerine yerleştirilerek standart laboratuvar sallayıcısı üzerinde 80–100 rpm'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında yapraklar su banyosunda 90–95 °C'de 15 ± 5 dak ağartma solüsyonunda (etanol: asetik asit: gliserol (3:1:1)) kaynatıldı ve 30 dak bekletildi. Ardından yapraklarda renk değişimleri gözlemlendi.

2.5.4. Süperoksit İçeriğinin Belirlenmesi

Süperoksit miktarı XTT {(2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-5-[(fenilamino) karbonil] -2H-tetrazolyum hidroksit} kullanılarak Frahry and Schopfer'a (2001) göre belirlendi. *H. thermophilum* yapraklarından alınan 0,5 g numune küçük parçalara ayrıldı ve 3,5 unite mL^{-1} süperoksit dismutaz (SOD) içeren ve içermeyen 5 mL 500 μM XTT içeren, 10 mM Na-sitrat tamponunda (pH 7,0) karanlıkta vakum infiltrasyonu yapıldı. Numuneler 2 saat bu tamponda bekletildi. Süperoksit radikalinin tespit için yapraklardan elde edilen sıvı kullanıldı. Daha sonra XTT indirgenmesindeki artış 470 nm'de spektrofotometrede okundu. Süperoksitten kaynaklanan spesifik absorbans, 470 nm'de SOD'lu ve SOD'suz numuneler arasındaki fark hesaplandı ve bu değer etki faktörü olarak $2,16 \times 10^4 M^{-1}cm^{-1}$ kullanılarak molar konsantrasyona dönüştürüldü.

2.5.5. Metilglioksal İçeriğinin Belirlenmesi

Metilglioksal Yadav vd.'ye (2005a) göre hesaplandı. MG ölçümü için örneklerin hazırlanmasında yaklaşık 0,1 g yaprak numunesi, 3 mL 0,5 M perklorik asit içerisinde homojenize edildi. Buz üzerinde 15 dak inkübe edildikten sonra karışım, 15 000 g'de 10 dak süreyle 4°C'de santrifüj edildi. Süpernatanta aktif kömür ($10 mg mL^{-1}$) eklenerek renksizleştirilmesi sağlandı. Ardından 15 dakika oda sıcaklığında tutularak 10 dak boyunca 15 000 g'de santrifüj edildi. Bu süpernatant MG analizi için kullanmadan önce, oda sıcaklığında doymuş potasyum karbonat çözeltisinde 15 dak tutularak nötralize edildi ve

tekrar 15 000 g'de 10 dak santrifüje tabi tutuldu. Nötralize edilmiş süpernatant MG içeriğinin belirlenmesi için kullanıldı. Metilglioksal ölçümü için, 650 µL süpernatant üzerine toplam 1 mL'lik bir hacimde, 7,2 mM 1,2-diaminobenzen (250 µL), 5 M perklorik asit (100 µL) ilave edildi. Türevlendirilmiş MG 25 dak sonra 335 nm'de ölçüldü. Metilglioksal içeriğinin hesaplanması için gerekli olan standart eğrisi Ek 2'de sunuldu.

2.5.6. Yaprak Su potansiyeli Ölçümü

Yaprak su potansiyelleri, Savage ve Cass'a (1984) göre su potansiyel sistem cihazı (Psypro P2-132 Water Potential System) kullanılarak ölçüldü.

2.5.7. Stoma İletkenliği

Stoma iletkenliği bir difüzyon porometresi vasıtası (AP4 Delta T, UK) ile Cohen vd.'e (1987) göre ölçüldü. Cihazın kalibrasyonu, üreticinin talimatlarına göre standart bir kalibrasyon plakası ile gerçekleştirildi.

2.5.8. Enzimatik Antioksidan Aktivitelerinin Tayini

Bitki numunelerinden 0,1 g taze yaprak tartılarak sıvı azot içerisinde toz haline getirildi. Daha sonra 2 mL ekstraksiyon tamponu (50 mM K₂HPO₄, 1 mM EDTA pH 7,0, % 1 PVPP) içerisinde ekstrakte edildi. Ekstrakt +4°C'de 20 000 g'de 20 dak santrifüj edilerek, alınan süpernatant enzim aktivitesinin tayini ve protein içeriğinin belirlenmesi için kullanıldı.

2.5.8.1. Guaiakol Peroksidaz

Guaiakol peroksidaz aktivitesi 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, 5 mM guaiakol, 15 mM H₂O₂ ve 50 µL enzim ekstraktından oluşan toplam hacimde 2 mL'lik karışımının 470 nm'de 1 dak süreyle ölçülmesiyle belirlendi (Urbanek vd., 1991).

2.5.8.2. Katalaz

Katalaz aktivitesi, Aebi'nin (1983) yöntemine göre tayin edildi. Katalaz aktivitesi 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 30 mM H₂O₂ ve 20 µL enzim ekstraktını içeren karışım 240 nm'de 5 dak boyunca ölçülerek belirlendi.

2.5.8.3. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich (1971) metodunun uyarlanması ile belirlendi. Enzim aktivitesi için 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 13 mM metiyonin, 75 µM NBT karışımına 50 µL enzim ekstraktı ilave edildi ardından reaksiyonu başlatmak için karışıma 2 µM riboflavin ilave edildi. Bu karışım 10 dak boyunca 375 µmol m⁻²s⁻¹ şiddetindeki beyaz ışığa maruz bırakılarak 560 nm'de absorbansı okundu.

2.5.8.4. Askorbat Peroksidaz

Enzim aktivitesi 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 250 µM askorbat (AsA), 5 mM H₂O₂ ve enzim ekstraktı içeren 1 mL'lik reaksiyon karışımının 290 nm'deki azalışına bağlı olarak Nakona ve Asada'ya (1981) göre belirlendi.

2.5.8.5. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz aktivitesi Foyer ve Halliwell'e (1976) göre, 200 µL 0,5 mM EDTA içerisinde hazırlanmış 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 250 µL GSSG ve 500 µL NADPH içeren karışıma 50 µL enzim ekstraktı ilave edilmesiyle NADPH oksidasyonunun 340 nm'de 5 dak içerisindeki azalışı ile belirlendi.

2.5.8.6. Monodehidroaskorbat Redüktaz

Monodehidroaskorbat redüktaz aktivitesi, tanımladığı gibi ölçüldü. Enzim aktivitesi, 100 µL numune ekstraktı üzerine 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,8), 150 µM

NADH, 500 μ M AsA eklenmesi ile oluşan 1 mL'lik reaksiyon karışım 340 nm'de ölçülmesi ile hesaplandı. Ölçülen değerler askorbat oksidazın yokluğunda elde edilen verilerden çıkarıldı (Hossain vd., 1984).

2.5.8.7. Dehidroaskorbat Redüktaz

0,1 g taze yaprak örnekleri, 50 mM Tris-HCl, (pH 7,4), 100 mM NaCl, 2 mM EDTA ve 1 mM $MgCl_2$ içeren ekstraksiyon tamponunda homojenize edildi. Ekstrakt +4 °C'de 20 000 g'de 10 dak santrifüj edildi. Enzim aktivitesi Hossain ve Asada (1984)'nın tanımladığı gibi 50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 6,5), 0,5 mM DHA, 1 mM GSH ve 100 μ L enzim ekstraktından oluşan 1 mL'lik karışımının ölçülmesiyle belirlendi. DHAR aktivitesi, 265 nm'de absorbansdaki artışa bağlı olarak belirlendi.

2.5.9. Enzimatik Olmayan Antioksidan İçeriklerinin Belirlenmesi

2.5.9.1. Askorbat İçeriğinin Belirlenmesi

Askorbat konsantrasyonu Liso vd.'ye (1984) göre belirlendi. 0,25 g taze yaprak dokusu 5 mL, % 5 (w/v) *m*-fosforik asit ile homojenize edildi. Özüt 10 000 g'de 4 dak santrifüj edildi. 70 μ L örnek, 0,1 M sitrat-0,2 M fosfat tamponu (pH 6,2) içeren 3 mL reaksiyon ortamına ilave edildi. Başlangıç absorbansı 265 nm'de okunarak, daha sonrasında askorbat konsantrasyonu, reaksiyon ortamına iki ünite askorbat oksidaz ilavesinin 5 dak ardından meydana gelen azalmanın okunması ile belirlendi. Askorbat oksidasyonu tamamlandıktan sonra, askorbat oksidaz, 10 mM sodyum azit ile inhibe edildi. Ardından ortama 2,5 mM DTT ilave edildi. DTT ile meydana gelen indirgenmenin ardından (3 dak) absorbans 265 nm de yeniden okundu. Askorbat standart konsantrasyonları ve standartlardan oluşan standart eğrisi Ek 3'te sunuldu.

2.5.9.2. Glutasyon İçeriğinin Belirlenmesi

Bitki yapraklarından numunelerden 0,1 g tartılarak ve sıvı azot içerisinde iyice parçalanarak, 5 mL, 1 mM EDTA içeren % 5'lik metafosforik asit içerisinde ekstrakte

edildi. Ekstrakt +4 °C'de 10 000 g'de 10 dak santrifüj edildi ve süpernatant eldesi glutasyon içeriğinin belirlenmesi için kullanıldı. Glutasyon içeriği Teitze'ye (1969) göre "total glutasyon assay kit" (Northwest Life Sci. Spec) protokolü ile belirlendi. Glutasyon 250 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 7,5), 200 µM NADPH, 600 µM DTNB, 25 µL ekstrakt ve 0,3 U GR içeren reaksiyon karışımının kullanılmasıyla ölçüldü. 412 nm'de absorbanstaki değişim 3 dak boyunca gözlemlendi. Farklı konsantrasyonlarda (0-5 µM) GSH standartları kullanılmasıyla elde edilen grafik üzerinden numunelere ait GSH konsantrasyonu hesaplandı. Standartlardan oluşan standart eğrisi Ek 4'te sunuldu.

2.5.9.3. Toplam Karotenoid Tayini

Bitkiden alınan taze yapraklar (0,1 g), %80 aseton (5 mL) içerisinde homojenize edilerek, 5 000 g'de 5 dak santrifüj edildi. Alınan süpernatantlara ait absorbanlar 663, 645 ve 450 nm'lerde spektrofotometrede ölçüldü (Arnon, 1949). Daha sonra karotenoid miktarı Lichtenthaler (1987) tarafından geliştirilen formül ile belirlendi.

2.5.10. Glioksalaz Sistem Enzimlerinin Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim ekstraksiyonu için 0,5 g yaprak dokusu, 100 mM KCl, 1 mM askorbat, 5 mM β-merkaptöetanol ve % 10 (w/v) gliserol ihtiva eden 1 mL 50 mM soğuk potasyum fosfat tamponunda (pH 7,0) homojenize edildi. Homojenatlar 10 dakika süreyle 13 000 g'de santrifüj edilerek ve süpernatantlar enzim aktivitelerinin belirlenmesi için kullanıldı. Tüm işlemler 0-4 °C'de gerçekleştirildi.

Glioksalaz I aktivitesi Hasanuzzaman vd.'ye (2011a) göre ölçüldü. Reaksiyon ortamı son hacim 700 µL olacak şekilde, 100 mM potasyum fosfat tampon (pH 7,0), 15 mM magnezyum sülfat, 1,7 mM GSH ve 3,5 mM MG karıştırılarak oluşturuldu. Reaksiyon MG ilavesi ile başlatılarak 240 nm'de 1 dakikadaki artış olarak kaydedildi

Glioksalaz II aktivitesi için, Principato vd.'ye (1987) göre 412 nm'de GSH'nin oluşumunu 1 dak boyunca takip ederek analiz edildi. Reaksiyon karışımı 1 mL'lik bir son hacimde 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 7,2), 0,2 mM DTNB ve 1 mM S-D-laktoilglutasyon (SLG) içermektedir. Reaksiyon, SLG ilavesiyle başlatılmış oldu.

2.5.11. Ozmolitlerdeki Değişimlerin Belirlenmesi

2.5.11.1. Prolin İçeriğinin Belirlenmesi

Kurutulmuş yaprak numuneleri (0,2 g) 10 mL sülfosalisilik asit (% 3) ile homojenize edildikten sonra 10 000 rpm'de 10 dak santrifüj edildi. Alınan süpernatanta (1 mL), asetik asit (1 mL) ve ninhidrin (1 mL) konuldu ve karışımı içeren tüpler 1 saat boyunca 100 °C'de etüvde inkübasyona bırakıldı. Reaksiyonu sonlandırmak için örnekler buz banyosunda bekletildi. Daha sonra soğuyan örnekler toluen (3 mL) eklendi ve oluşan toluen fazı 520 nm'de spektrofotometrede okundu. Prolin konsantrasyonu belirlemek için, prolin standartları kullanılarak Ek 5'deki kalibrasyon eğrisi hazırlandı ve sonuçlar hesaplandı (Bates vd., 1973).

2.5.11.2. Glisin-Betain İçeriğinin Belirlenmesi

İnce öğütülmüş kuru bitki yaprakları (0,1 g) 25°C'de 48 saat boyunca 20 mL deiyonize su ile mekanik olarak çalkalanarak, filtrelendi. Filtrat, 2 N sülfürik asit ile 1:1 oranında seyreltildi. Test tüpünde ölçülmüş sıvı (0,5 mL), 1 saat boyunca buzlu su içinde soğutuldu. Soğuk potasyum iyodür-iyot reaktif maddesi (0,2 mL) eklendi ve karışım yavaşça vorteks ile karıştırıldı. Numuneler 16 saat 0-4°C'de bekletildi. Sürenin sonunda numuneler santrifüj tüplerine aktarıldı ve daha sonra 0°C'de 15 dakika boyunca 10 000 g'de santrifüjlendi. Süpernatant (1 mL) mikropipet ile dikkatlice aspire edildi ve 9 mL 1,2-dikloro etan (reaktif derecesinde) içinde çözünmesi sağlandı. 2- 2,5 saat sonra, karışımın absorbansı UV-görünür spektrofotometre ile 365 nm'de ölçüldü. 2 N sülfürik asit içerisinde hazırlanan glisin betain referans standartları (50-200 µg mL⁻¹) kullanılarak numuneler içerisindeki glisin betain miktarı tespit edildi (Grieve ve Grattan, 1983).

2.5.11.3. Toplam Çözünebilir Şeker İçeriğinin Belirlenmesi

Kurutulmuş yaprak örneği (0,2 g), 5 mL % 70' lik etanolde homojenleştirildi ve 95°C su banyosunda 10 dak kaynatıldı, homojenleştirilmiş yapraklar 5 dak boyunca 5 000 g'de santrifüjlendi. Alınan süpernatant 1:10 saf su ile seyreltilerek, oluşan 1 mL örnek

üzerine 1 mL fenol (% 5) ve 5 mL sülfirik asit (%96) eklenerek, oluşan karışımın absorbanası 490 nm'de kaydedildi (Dubois vd., 1956).

2.5.12. Absisik Asit Tayini

100 mg taze yaprak örneği 3 saat liyofilize edildi. Liyofilize örnekler, MilliQ (Su/doku, 50/1, v/w) içerisinde 16 saat boyunca 4°C'de ekstraksiyon gerçekleştirildi. Kantitatif ABA analizleri Phytodetek ABA ELISA kiti ile gerçekleştirildi. (\pm) cis-trans ABA (Sigma, St. Louis), standart olarak kullanıldı.

2.6. Moleküler Analizler

2.6.1. RNA Eldesi ve cDNA Yapımı

Taze yaprak numuneleri (0,1 g) sıvı azot ile dondurularak doku parçalayıcısı ile iyice parçalandı. Sonrasında toplam RNA eldesi için Quiagen RNeasy Plant Mini Kit'e ait protokol uygulandı ve numunelerde RNA eldesi sağlandı. Numunelere ait RNA örneklerinde spektrofotometrik olarak nanodrop (Thermo Scientific) ile miktar ve saflık tespiti yapıldı.

İzole edilen Toplam RNA örneklerinden yüksek kapasiteli cDNA reverse transkripsiyon kiti (Applied Biosystems) kullanılarak, grup başına 2000 ng olacak şekilde cDNA eldesi gerçekleştirildi.

2.6.2. Kantitatif Real-Time PCR Ölçümü

Numunelere ait gen ifadelerini belirlemek için, cDNA eldeleri ile Eva Green qPCR Supermix (Solis Biodyne) solüsyonu kullanılarak CFX Connect Real Time PCR System (BioRad) cihazında analizler tamamlandı. Analiz Solis Biodyne talimatları modifiye edilerek Tablo 1'deki işlem basamakları uygulanarak gerçekleştirildi. *Aktin 7* (referans geni) ve *HSFA4A*, *HSF4*, *HSFA3* genlerine ait ifade düzeylerini incelemek için bu genlere ait primerler kullanıldı (Tablo 2). Analiz sonucunda elde edilen veriler *Aktin 7*'ye göre normalize edilip bağıl gen ifadesi şeklinde sunuldu.

Tablo 1. *HSFA4A*, *HSF4*, *HSFA3* genlerinin ifade seviyeleri için qRT-PCR işlem basamakları

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Aktivasyonu	95,0°C	12 dak	1
Denaturasyon	95,0°C	15 sn	44
Bağlanma	60,0°C	30 sn	
Uzama	72,0	30 sn	
Plate Okuma	-	-	
Melt Curve Analizi	65,0°C -95,0°C arası 0,5°C'lik artışlar 5 sn aralıklarla plate okuma		-

Tablo 2. qRT-PCR'da kullanılan primerlerin sekansları

Primerler	Primer Sekansları (5'→3')	İşlevi
<i>ACT 7</i>	<i>ACT 7-F</i> :TACGAGCAGGAGCTTGACAC <i>ACT 7-R</i> :CCGATCATGGAAGGCTGGAA	Referans geni
<i>HSFA4A: HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A4A</i>	<i>HSFA4A-F</i> :TTCACCGACGCAAGCCAATA <i>HSFA4A-R</i> :TTATGCCTCTCAAGCTCCGC	Sıcaklığa hücre sel boyutta cevap oluşturur.
<i>HSF4: HEAT SHOCK FACTOR 4</i>	<i>HSF4-F</i> :GCTTCGTTCCGAGCTTAAC <i>HSF4-R</i> :GCTTCGTTCCGAGCTTAAC	Sıcaklığa hücre sel boyutta cevap oluşturur.
<i>HSFA3: HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A3</i>	<i>HSFA3-F</i> : CCTCCTAATAGTACGCCGCC <i>HSFA3-R</i> : CAAGGGGAGAGGCCATTGTT	Termotoleransın sağlanmasında rol almaktadır.

2.6.3. Bazı Antioksidan Enzimlerin Protein Miktarlarının Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

FeSOD, CAT, GPX ve GR için protein ekstraksiyonu 4X PEB (protein ekstraksiyon tamponu, AS08 300 Agrisera Inc.) kullanılarak gerçekleştirildi. Numuneler eşit hacimde örnek tamponunda (2X Laemmli örnek tamponu 1610737 Bio-Rad) çözdürülerek, 95 °C'de 5 dak ısıtıldı. Numunelerin toplam proteinleri (her bir örnekten 50 µg, Bradford, 1976'ya göre hesaplandı) % 12 sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi SDS-PAGE (TGX Stain-Free Precast Protein Gels, 4568095 Bio-Rad) ile ayrılması oda sıcaklığında elektroforez işlemi (Mini- PROTEAN Tetra Cell system, 165800 Bio-Rad) ile

gerçekleştirildi. Proteinlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesi için renkli protein marker (Precision Plus Protein Western C) kullanıldı. Jel elektroforezinde ayrılan proteinler 10 dakika süreyle 2,5 A'da Trans-Blot Turbo Transfer Sistem (1704155 Bio-Rad) cihazı kullanılarak PVDF membrana (Trans-Blot Turbo Mini PVDF Transfer Packs, 1704156 Bio-Rad) aktarıldı. Transfer sonrasında membran, TBS içerisinde % 2,5 yağsız kuru süt tozu ile +4 °C' de bloklandı. Enzimlere ait proteinlerin tespiti için o enzime özel olan primer antikolar kullanılarak ve bir gece boyunca +4°C'de inkübe edildi. Sonrasında membranlar goat anti-rabbit IgG-HRP secondary antibodies (AS09 602 Agrisera) bağlı horseradish peroksidaz ile 4 saat sallayıcıda inkübasyona bırakıldı. Proteinlerin immünokimyasal tespiti peroksidaza bağlanmış ECL kemilüminesans kiti (Clarity Western Enhanced Chemiluminescence, 1705061 Bio-Rad10) ile gerçekleştirildi.

2.7. Protein Tayini

Çözünabilir protein içeriğinin belirlenmesi için, Coomassie Brilliant Blue-G250 boya bağlama deneyi kullanılmıştır (Bradford, 1976). Standart eğrinin hazırlanmasında sığır serum albümini kullanılarak, boyar madde ile protein karışımı 595 nm'de spektrofotometre ile ölçüldü. Protein miktarı mg cinsinden hesaplanarak, enzim aktivitelerinde ve western blot analizlerinde kullanıldı.

2.8. İstatistiksel Analizler

Uygulamalar sonucu elde edilen numunelerden en az 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilen analizler sonucu kaydedilen ortalamalar, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA-Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi) yapılarak Statistic Package for Social Sciences (SPSS) bilgisayar yazılımında (Versiyon IBM 23) değerlendirildi. $P \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi. Bütün şekillerdeki barlar standart sapmayı temsil etmektedir.

qRT PCR analizi için, nispi gen ekspresyon seviyesi Bio-Rad CFX Manager 3,1 kullanılarak analiz edildi. İfade seviyeleri SPSS yazılımı ile test edildi. Varyans ortalama değerlerin analizi tek yönlü ANOVA ile yapıldı ($P \leq 0,05$).

3. BULGULAR

3.1. Toprak ve Yaprak Yüzeyindeki Sıcaklıkların Değişimi

Sıcaklık ayarlı özel ısı ünitelerinde, her grup bitki kendi sıcaklığına (20, 40, 60, 80±5°C) 2 hafta boyunca maruz kalması sırasında batırmalı dijital termometre ile kaydedilen toprak sıcakları, infrared termometre tekniği ile kaydedilen yaprak yüzey sıcaklık verileri Tablo 3'te ve sıcaklık ölçümleri esnasında fotoğraflanan 10 haftalık bitkiler de Şekil 7'de sunuldu.

Tablo 3. Farklı toprak sıcaklığında yetiştirilen bitkilere ait yaprakların yüzey sıcaklığı.
Sayısal değerler ortalamaları ± ise standart sapmayı ifade etmektedir (n=6)

Gruplar	Toprak Sıcaklığı (°C)	Yaprak Yüzey Sıcaklığı (°C)
1. Grup (Kontrol)	20±5°C	20±0,5
2. Grup (Hafif yüksek sıcaklık)	40±5°C	28±0,4
3. Grup (Orta yüksek sıcaklık)	60±5°C	32±0,4
4. Grup (Aşırı yüksek sıcaklık)	80±5°C	44±0,3

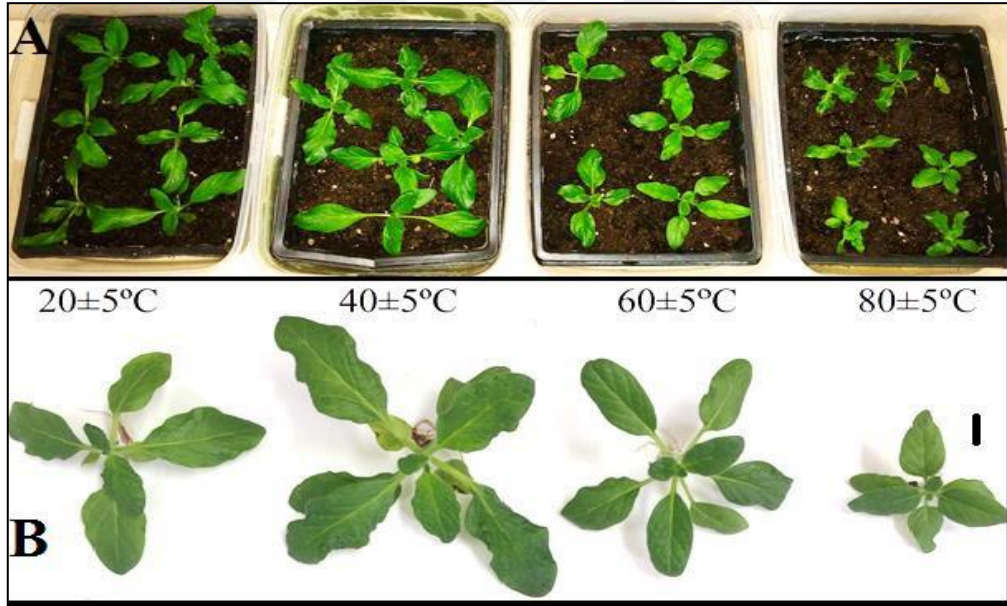


Şekil 7. Farklı toprak sıcaklıklarında yetiştirilen bitkilere ait toprak ve yaprak yüzey sıcaklıkları

3.2. Büyüme Parametreleri

3.2.1. Morfolofik Değişimler

Toprakta kademeli olarak sıcaklık artışları sağlanarak 2 hafta süreyle farklı sıcaklık uygulaması yapılmış (20, 40, 60, 80±5°C) *H. thermophilum* bitkilerinde 10 hafta sonundaki morfolojik değişimler Şekil 8 A, B'de sunuldu. En iyi gelişim 40±5°C'de büyütülen bitkilerde görüldü. 20±5 °C ve 60±5 °C'de büyütülen bitkiler karşılaştırıldığında belirgin bir fark görülmedi. Son olarak 80±5 °C'de büyütülen bitkiler, diğer sıcaklık uygulamaları ile kıyaslandığında, morfolojik olarak gelişimin daha yavaş olduğu bulundu. Ayrıca bitki yapraklarında artan sıcaklığa bağlı olarak (80±5°C dahil) bitkilerde herhangi bir deformasyona, bitki yapraklarında senesens ve pigment kaybı gibi değişimlere rastlanılmadı (Şekil 8).

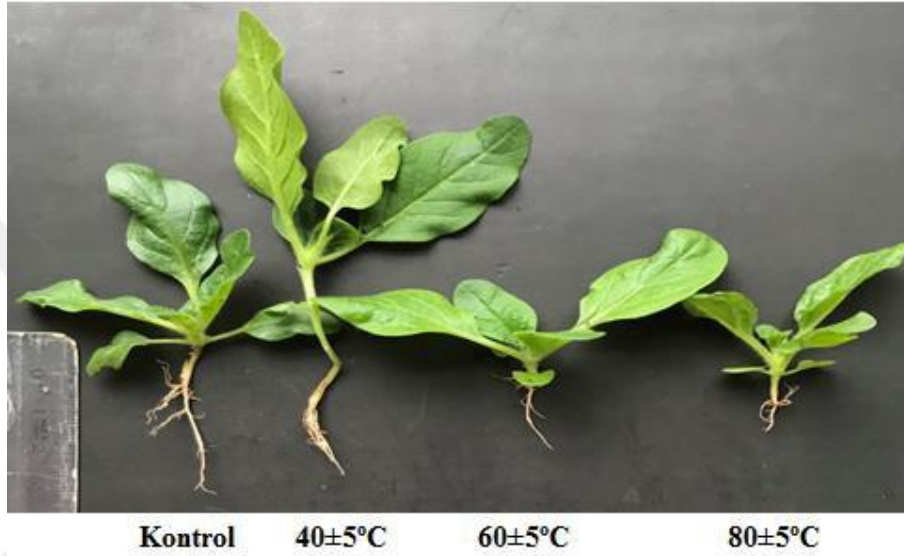


Şekil 8. Farklı toprak sıcaklıklarının *H. thermophilum* bitkilerindeki morfolojik değişimler üzerine etkisi. (A) yetiştirme ortamındaki görüntüsü (B) dış ortamındaki görüntüsü

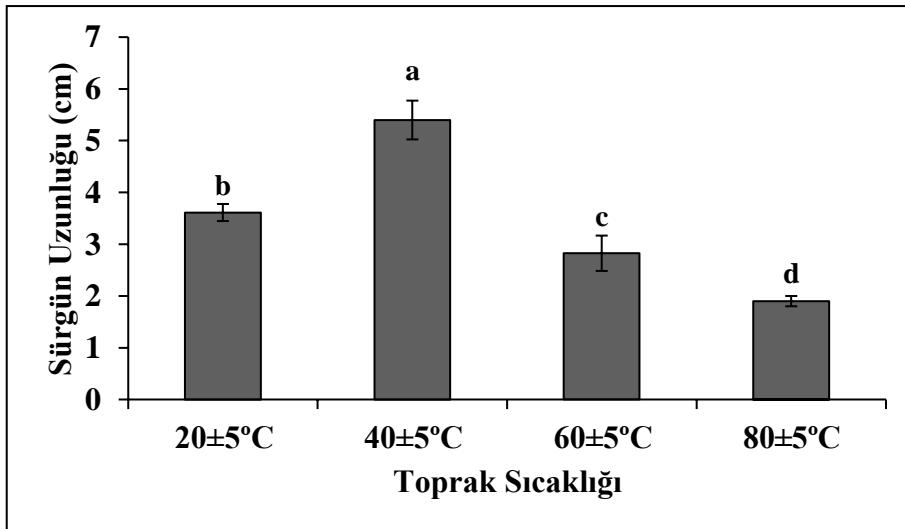
3.2.1.1. Sürgün ve Kök Uzunluğu

Bitkilerin sürgün uzunluğu göz önüne alındığında, 40±5°C'de büyütülen bitkilerin sürgün uzunluğu 5,4±0,4 olup istatistiki olarak diğer uygulamalardan yüksek olduğu

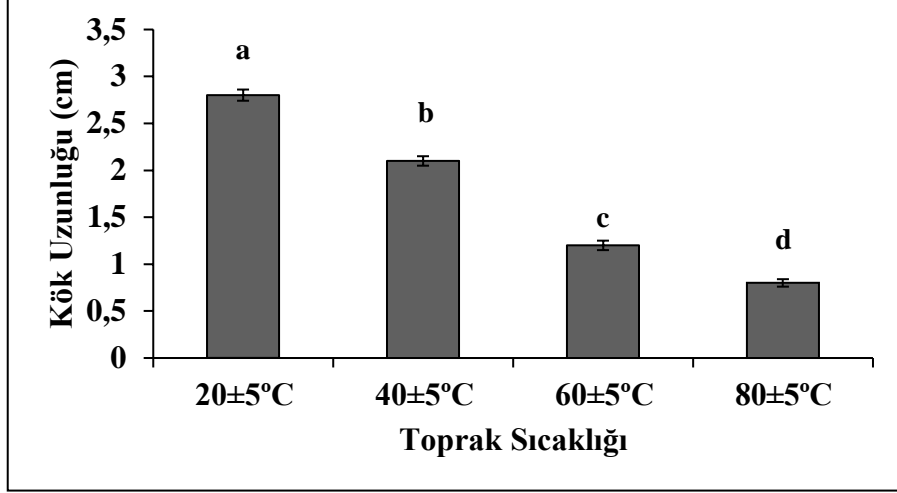
bulundu. Diğer sıcaklık uygulamalarında ($20\pm 5^{\circ}\text{C}$, $60\pm 5^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5^{\circ}\text{C}$) yetişen bitkilerin sürgün uzunlukları ise sırasıyla $3,6\pm 0,2$, $2,8\pm 0,4$, $1,9\pm 0,1$ olduğu kaydedildi. En az sürgün uzunluğuna ise $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ altında büyütülen bitkilerde rastlandı (Şekil 9, 10). Bitkilerde artan sıcaklıkla beraber kök uzunluğunda ciddi bir azalma görüldü. Şöyleki; $20\pm 5^{\circ}\text{C}$, $40\pm 5^{\circ}\text{C}$, $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında yetişen bitkilerin kök uzunlukları sırasıyla $2,8\pm 0,08$, $2,1\pm 0,05$, $1,2\pm 0,05$ ve $0,8\pm 0,04$ olduğu belirlendi (Şekil 10, 11).



Şekil 9. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının sürgün ve kök uzunluğu üzerine etkisi



Şekil 10. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının sürgün uzunluğuna etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir ($n=3$). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P\leq 0,05$) göstermektedir.

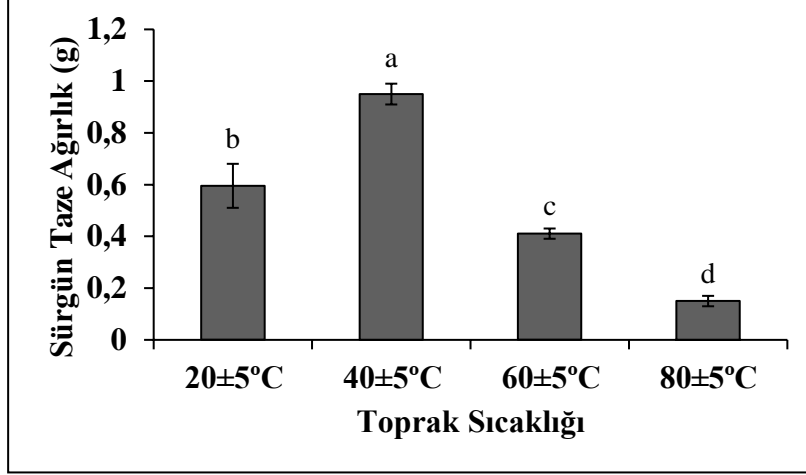


Şekil 11. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının kök uzunluğuna etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

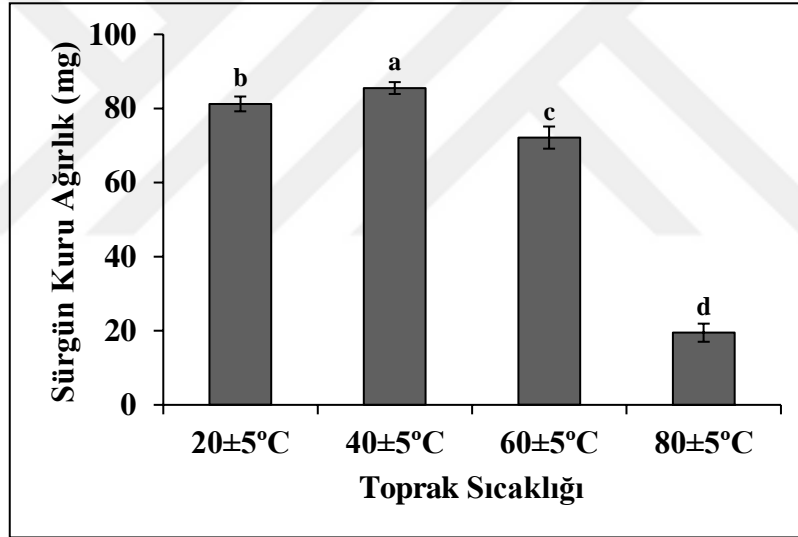
3.2.2. Sürgün Taze Ağırlık ve Kuru Ağırlık

Sürgün taze ağırlığı göz önüne alındığında, en yüksek taze ağırlık ($0,95 \pm 0,04$ g) $40 \pm 5^\circ\text{C}$ toprak sıcaklığında büyütülen bitkilerin sürgünlerinde görüldü. En düşük taze ağırlık ($0,15 \pm 0,02$ g) ise $80 \pm 5^\circ\text{C}$ sıcaklık uygulaması yapılmış toprakta büyüyen bitkilerde bulundu (Şekil 12).

Sıcaklık uygulamaları arasında, kontrol grubu ($20 \pm 5^\circ\text{C}$) ile kıyaslandığında en yüksek kuru ağırlığa ait grup $40 \pm 5^\circ\text{C}$ toprak sıcaklığında büyüyen bitki grubu olmuştur. En düşük kuru ağırlık ise $80 \pm 5^\circ\text{C}$ toprak sıcaklığında büyüyen bitkilerde kaydedildi (Şekil 13).



Şekil 12. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının sürgün taze ağırlığına etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.



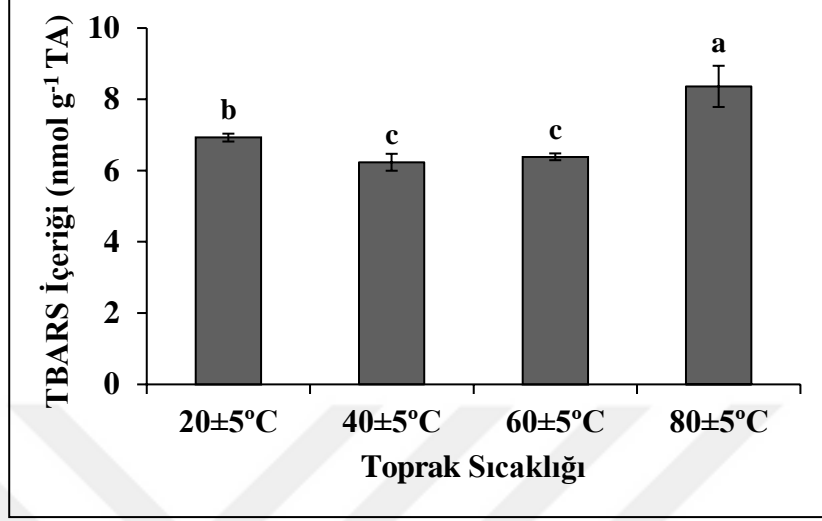
Şekil 13. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının sürgün kuru ağırlığına etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişimler

3.3.1. TBARS İçeriği

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, membran hasarının 80±5°C toprak sıcaklığında yetişen bitki yapraklarında arttığı bulundu. Diğer yandan 40±5°C ve 60±5°C sıcaklıkta

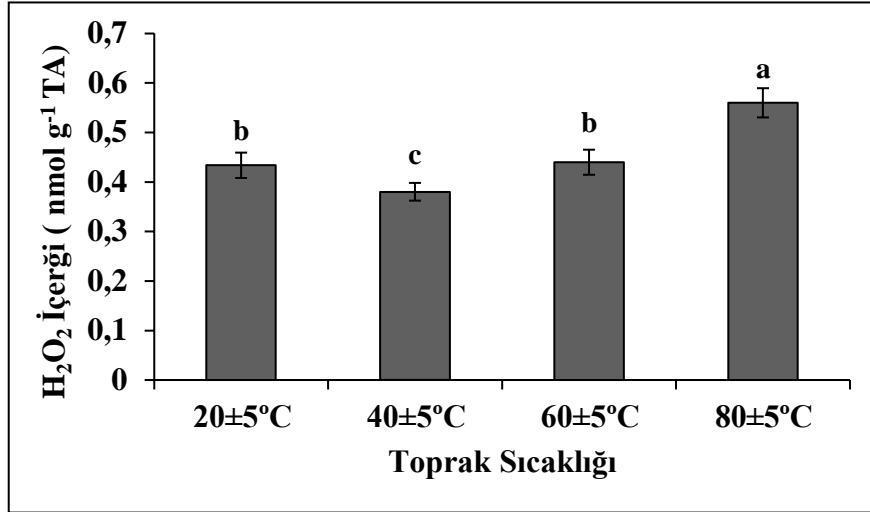
büyüyen bitkilerdeki membran hasarı arasında fark olmayıp eşit olup, $20\pm 5^\circ\text{C}$ ve $80\pm 5^\circ\text{C}$ sıcaklıkta büyüyen bitkilerle kıyaslandığında daha düşük olduğu tespit edildi (Şekil 14).



Şekil 14. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının yaprak TBARS içeriğine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P\leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.2. H₂O₂ İçeriği

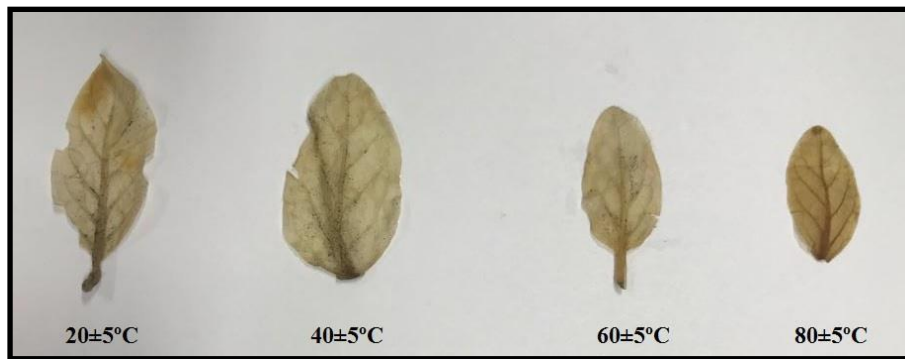
Dört farklı sıcaklık uygulaması yapılmış bitki gruplarında en yüksek H₂O₂ içeriği aşırı yüksek sıcaklık ($80\pm 5^\circ\text{C}$) uygulaması yapılmış bitkilerde bulundu. Aynı zamanda, diğer gruplarla kıyaslandığında en az H₂O₂ içeriği $40\pm 5^\circ\text{C}$ sıcaklık uygulaması yapılmış bitkilerde ölçüldü. Son olarak, $20\pm 5^\circ\text{C}$ ve $60\pm 5^\circ\text{C}$ sıcaklık uygulaması yapılmış bitkilerin H₂O₂ içeriğinde istatistiki açıdan önemli bir farka rastlanmadı (Şekil 15).



Şekil 15. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının H₂O₂ içeriğine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları (P≤0,05) göstermektedir.

3.3.3. DAB Boyama Metodu ile H₂O₂ Dağılımın Belirlenmesi

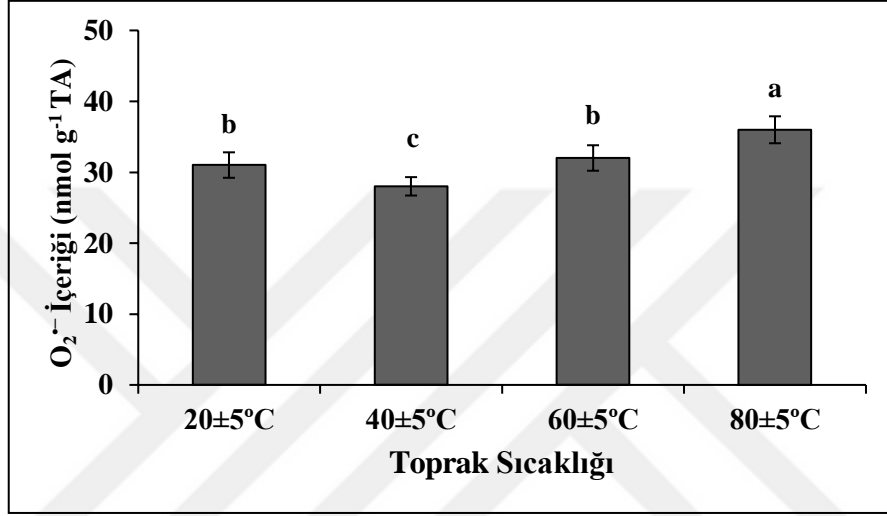
Şekil 16'da görüldüğü gibi kahverengi lekeler H₂O₂'i temsil etmektedir. Dolayısı ile diğer gruplarla karşılaştırıldığında en fazla kahverengi lekelenmeye 80±5°C'de büyütülen bitki yapraklarında rastlanıldı.



Şekil 16. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının DAB boyanması ile belirlenen H₂O₂ dağılımı üzerine etkisi.

3.3.4. Süperoksit İçeriği

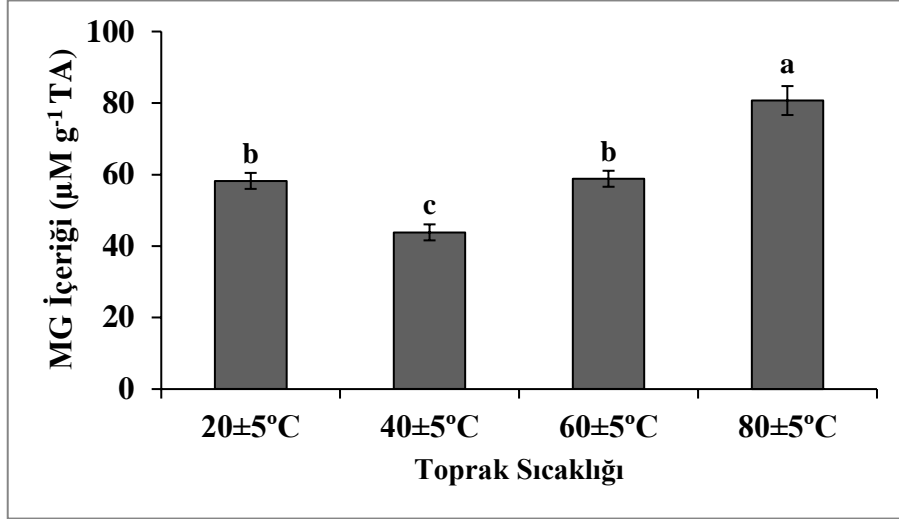
Farklı sıcaklıklara maruz kalmış bitkilerdeki süperoksit miktarı diğer gruplarla karşılaştırıldığında $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ grubu bitkilerde kontrol ile kıyasla bir azalışa rastlarken, $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ grubu bitkilerinde kontrole göre bir artış belirlendi. $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ gruplarının süperoksit içerikleri arasında istatistiksel bir fark bulunmadı (Şekil 17).



Şekil 17. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının süperoksit içeriğine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P\leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.5. Metilglioksal İçeriği

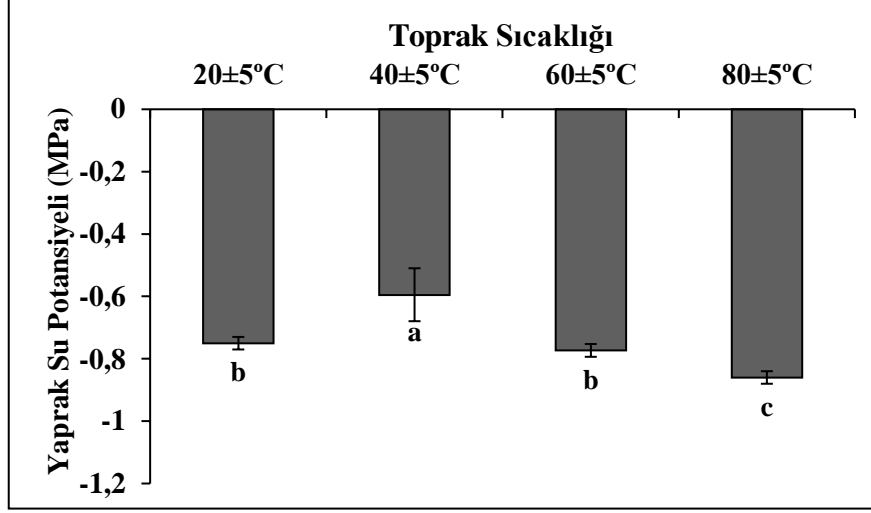
Dört farklı sıcaklık uygulaması yapılmış bitki gruplarında en yüksek MG içeriği aşırı yüksek sıcaklık ($80\pm 5^{\circ}\text{C}$) uygulaması yapılmış topraklarda büyütülen bitkilerde bulundu. Aynı zamanda, diğer gruplarla kıyaslandığında en düşük MG içeriği $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ sıcaklık uygulaması yapılmış bitkilerde ölçüldü. Son olarak, $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ sıcaklık uygulaması yapılmış bitkilerin MG içeriğinde istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmedi (Şekil 18).



Şekil 18. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının MG içeriğine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.6. Yaprak Su Potansiyeli

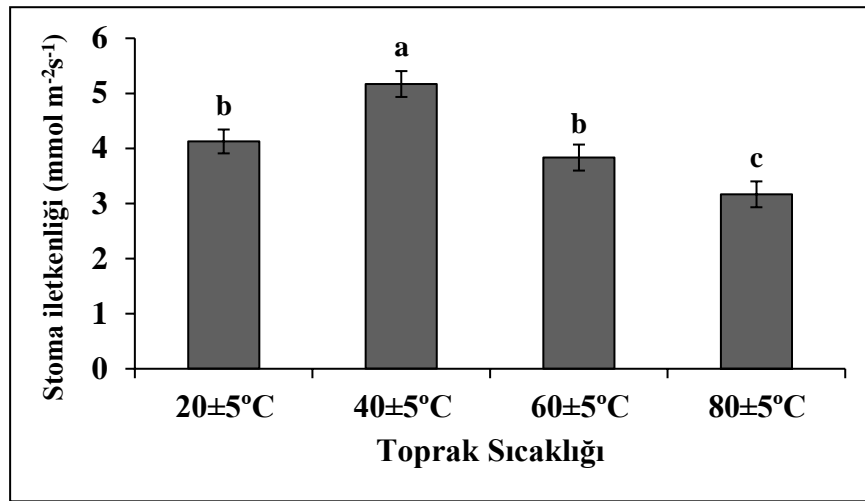
Dört farklı sıcaklık uygulaması yapılmış bitki gruplarında en düşük yaprak su potansiyeli aşırı yüksek sıcaklık ($80 \pm 5^\circ\text{C}$) uygulaması yapılmış toprakta yetişen bitkilerde ölçüldü. Aynı zamanda, diğer gruplarla kıyaslandığında en yüksek yaprak su potansiyeli $40 \pm 5^\circ\text{C}$ sıcaklık uygulaması yapılmış bitkilerde ölçüldü. Son olarak, $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ve $60 \pm 5^\circ\text{C}$ sıcaklık uygulaması yapılmış bitkilerin yaprak su potansiyellerinde istatistiksel bir fark gözlenmeyerek, $40 \pm 5^\circ\text{C}$ sıcaklık uygulaması yapılmış bitkilerden daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 19).



Şekil 19. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının yaprak su potansiyeline etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.7. Stoma İletkenliği

Stoma iletkenliğinin 40±5°C toprak sıcaklığında yetişen bitki yapraklarında diğer gruplardan daha yüksek olduğu bulundu. Diğer taraftan 20±5°C ve 60±5°C toprak sıcaklıkları arasında stoma iletkenliği açısından istatistiki bir fark bulunmadı. En düşük stoma iletkenliğine ise 80±5°C toprak sıcaklığında yaşayan bitkilerde rastlandı (Şekil 20).

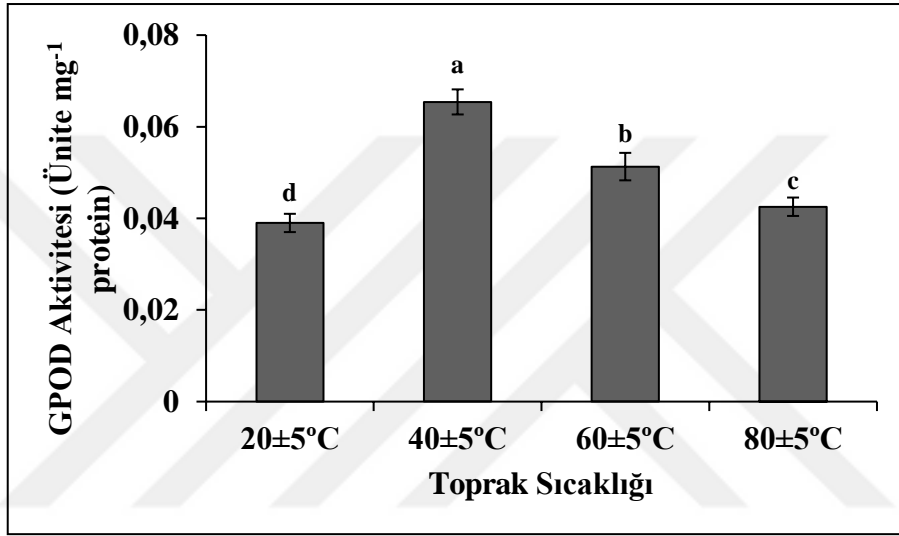


Şekil 20. Farklı sıcaklık uygulamalarının stoma iletkenliğine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.8. Enzimatik Antioksidanlardaki Değişimler

3.3.8.1. Guaiakol Peroksidaz Aktivitesi

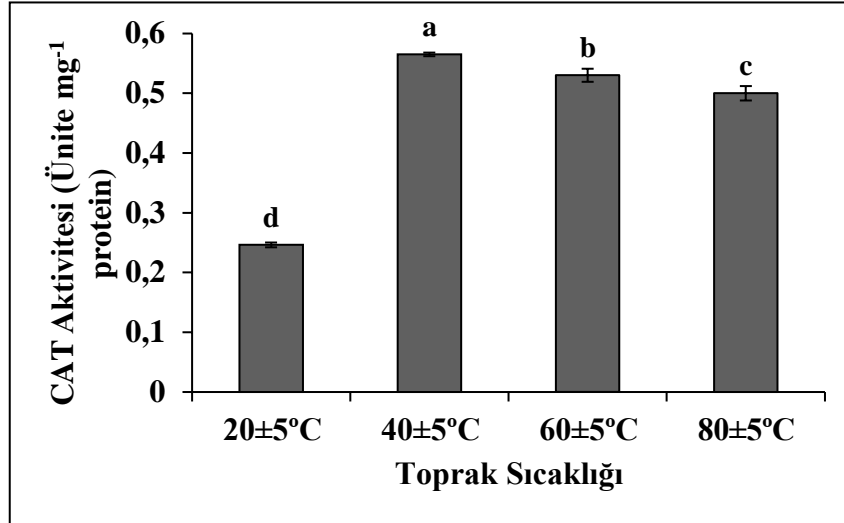
Guaiakol peroksidaz (GPOD) aktivitesinin kontrol grubu bitkilerle kıyaslandığında diğer yüksek sıcaklık uygulamalarında arttığı bulundu. Ancak en fazla artışın $40\pm 5^\circ\text{C}$ toprak sıcaklığına sahip bitkilerin yapraklarında olduğu bulundu (Şekil 21).



Şekil 21. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının GPOD aktivitesine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P\leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.8.2. Katalaz Aktivitesi

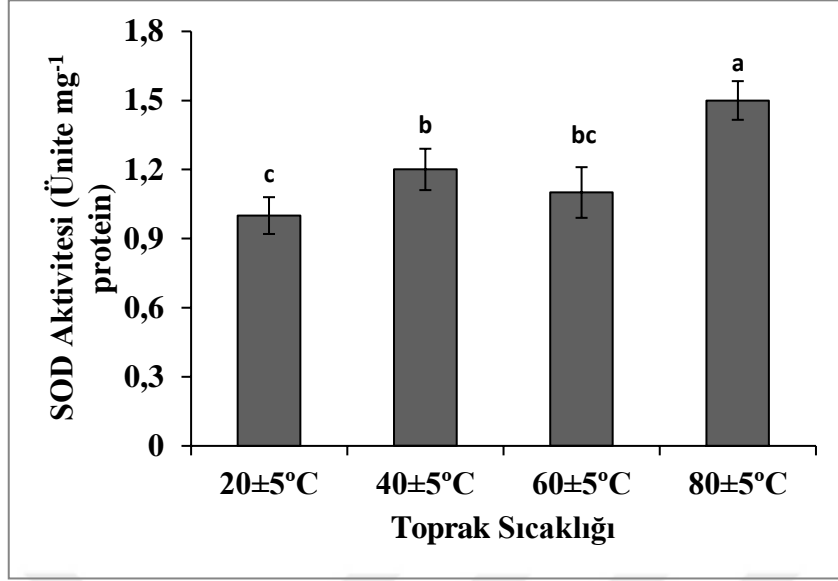
Katalaz (CAT) aktivitesinin $20\pm 5^\circ\text{C}$ toprak sıcaklık uygulaması yapılmış bitki grupları ile kıyaslandığında diğer yüksek sıcaklık uygulaması yapılmış bitki gruplarının yapraklarında arttığı bulundu. En fazla artışın ise $40\pm 5^\circ\text{C}$ toprak sıcaklığı uygulanmış bitki gruplarında olduğu kaydedildi (Şekil 22).



Şekil 22. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının CAT aktivitesine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.8.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

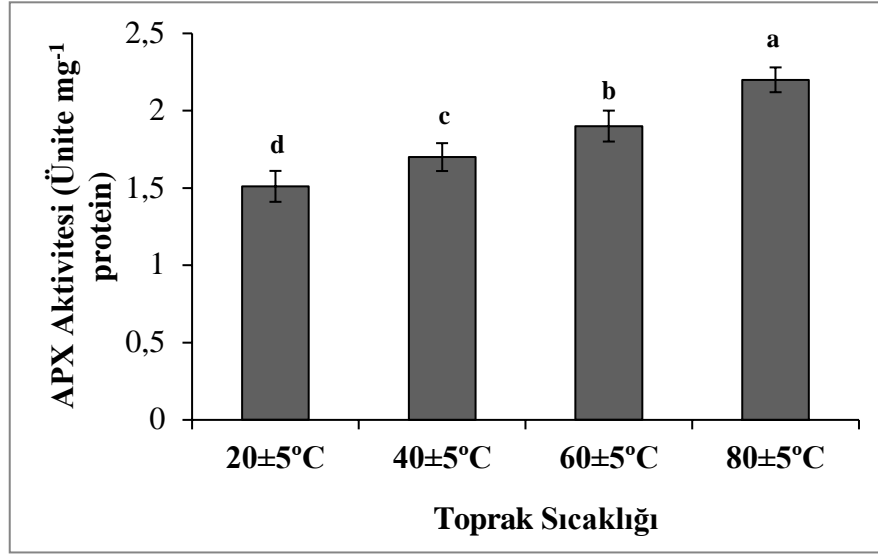
Kontrol grubu ile kıyaslandığında 40±5°C ve 80±5°C toprak sıcaklığında büyüyen bitkilerin yapraklarındaki süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde artış kaydedildi. Diğer yandan kontrol grubu ile kıyaslandığında 80±5°C toprak sıcaklığında yetişen bitki yapraklarındaki SOD aktivitesinin belirgin bir şekilde arttığı gözlemlendi (Şekil 23).



Şekil 23. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının SOD aktivitesine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.8.4. Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

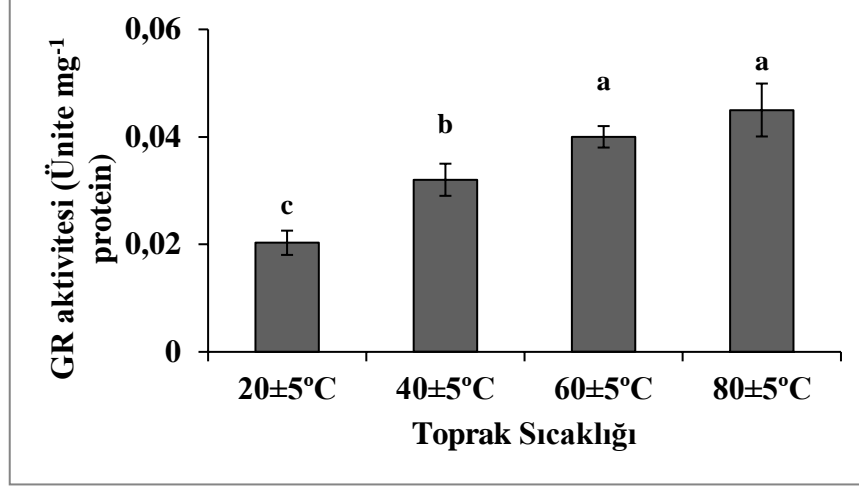
Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin artan yüksek sıcaklık uygulamaları ile paralel bir artış gösterdiği bulundu. Kontrol ($20 \pm 5^\circ\text{C}$) bitkileri ile kıyaslandığında en yüksek APX aktivitesi $80 \pm 5^\circ\text{C}$ toprak sıcaklığında yetişen bitki yapraklarında bulundu (Şekil 24).



Şekil 24. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının APX aktivitesine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.8.5. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi

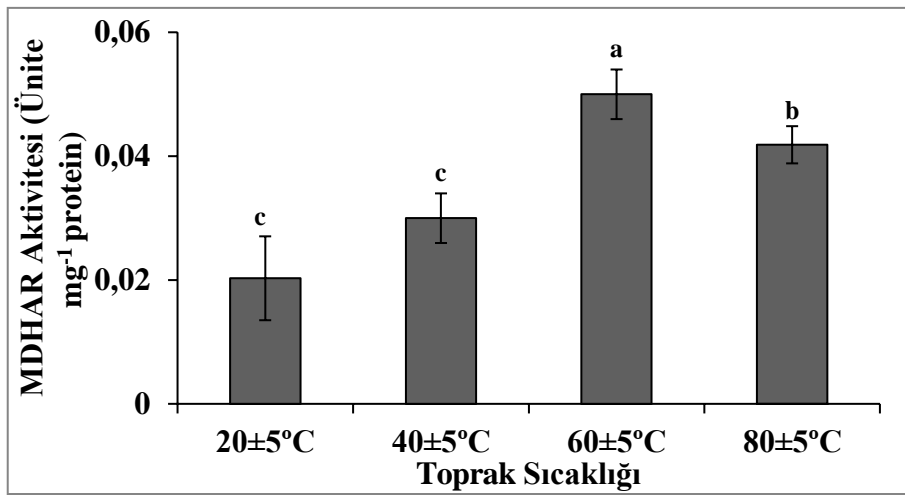
Farklı toprak sıcaklığında büyütülen bitki grupları ile karşılaştırıldığında glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin 20±5°C toprak sıcaklığında büyüyen bitkilerle kıyaslandığında yüksek sıcaklık uygulamaları ile arttığı bulundu. Kontrole göre en yüksek aktivite 60±5°C ve 80±5°C'deki bitkilerde belirlemek ile birlikte 60±5°C ve 80±5°C'de yaşayan bitkilerin GR aktiviteleri arasında istatistik olarak bir fark görülmedi (Şekil 25).



Şekil 25. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının GR aktivitesine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.8.6. Monodehidroaskorbat Redüktaz Aktivitesi

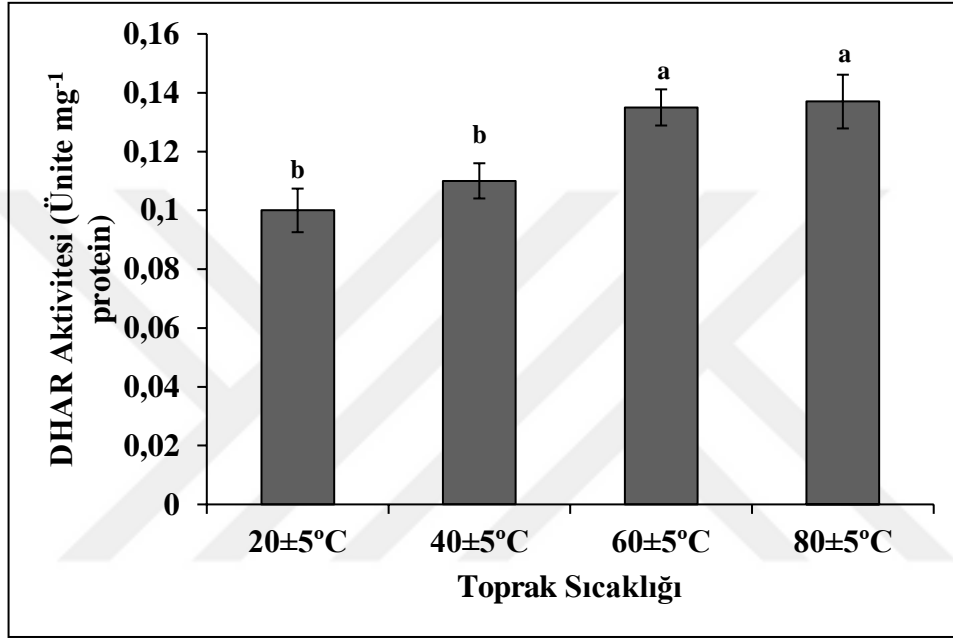
Kontrol (20±5°C) sıcaklığında yetişen bitki grupları ile kıyaslandığında, 60±5°C ve 80±5°C toprak sıcaklıklarında büyüyen bitki gruplarının yapraklarındaki MDHAR aktivitesinde önemli bir artış gözlenirken, 20±5°C ve 40±5°C sıcaklık uygulaması yapılmış bitki yapraklarının MDHAR aktiviteleri arasında istatistiki açıdan bir fark bulunmadı (Şekil 26).



Şekil 26. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının MDHAR aktivitesine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.8.7. Dehidroaskorbat Redüktaz Aktivitesi

DHAR aktivitesinin kontrol grubu ile kıyaslandığında $60\pm 5^\circ\text{C}$ ve $80\pm 5^\circ\text{C}$ gruplarında arttığı ve ancak bu iki grup arasında istatistiki bir fark olmadığı saptandı. Aynı zamanda $20\pm 5^\circ\text{C}$ ve $40\pm 5^\circ\text{C}$ sıcaklık uygulaması yapılmış bitki gruplarının DHAR aktiviteleri arasında da istatistiki bir fark bulunmadı (Şekil 27).

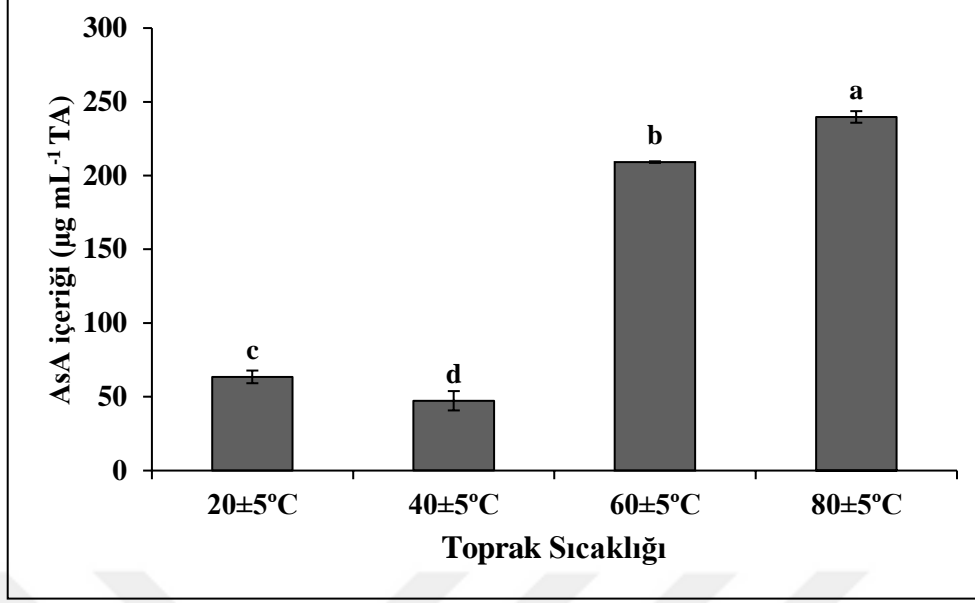


Şekil 27. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının DHAR aktivitesine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P\leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.9. Enzimatik Olmayan Antioksidanlardaki Değişimler

3.3.9.1. Askorbat İçeriği

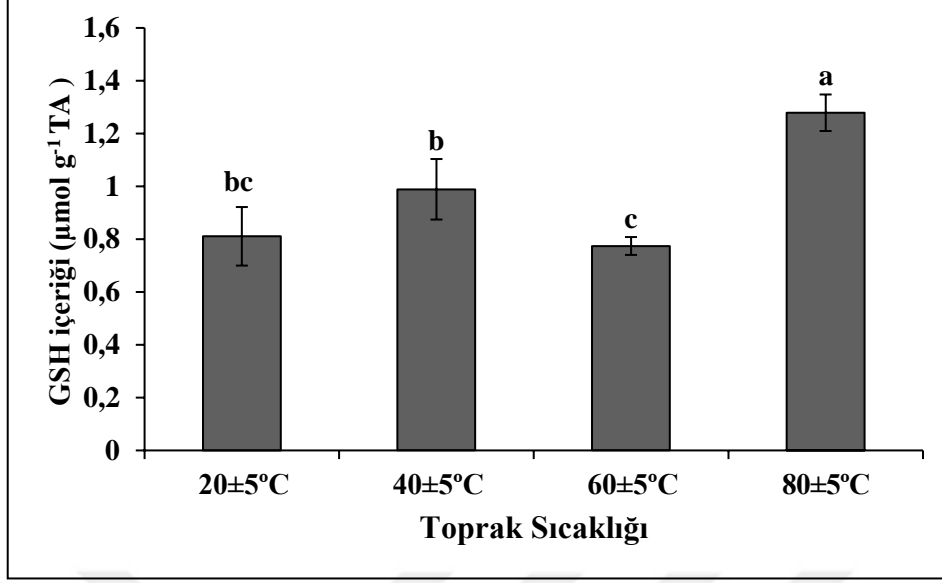
Askorbat içeriğinin $60\pm 5^\circ\text{C}$ ve $80\pm 5^\circ\text{C}$ sıcaklık uygulaması yapılmış topraklarda yetişen bitkilerde kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulundu. $40\pm 5^\circ\text{C}$ sıcaklık uygulaması yapılmış bitki gruplarında ise kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlendi ve bu düşüşün $40\pm 5^\circ\text{C}$ 'de yaşayan bitkilerde daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 28).



Şekil 28. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının AsA içeriğine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.9.2. Glutasyon İçeriği

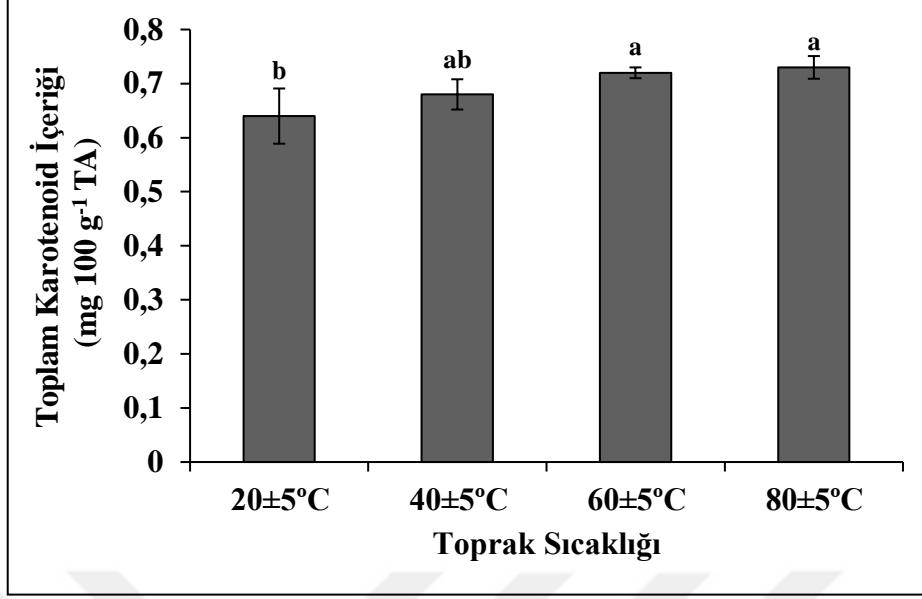
Kontrol grubu ile kıyaslandığında 80±5°C toprak sıcaklığında yetişen bitki yapraklarına ait GSH içeriğinin önemli derecede arttığı bulundu. Aynı zamanda kontrol grubu 40±5°C ve 60±5°C toprak sıcaklığında yetişen bitkiler ile kıyaslandığında GSH içeriği açısından belirgin bir farka rastlanılmadı (Şekil 29).



Şekil 29. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının GSH içeriğine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.9.3. Toplam Karotenoid İçeriği

Toplam karotenoid içeriğinin kontrol grubu ($20 \pm 5^\circ\text{C}$) bitkileri ile kıyaslandığında $60 \pm 5^\circ\text{C}$ ve $80 \pm 5^\circ\text{C}$ gruplarında arttığı bulundu. $40 \pm 5^\circ\text{C}$ toprak sıcaklığında yetişen bitkildeki toplam karotenoid içeriği diğer uygulama grupları ile kıyaslandığında istatistiki olarak önemli bir değişim görülmedi (Şekil 30).

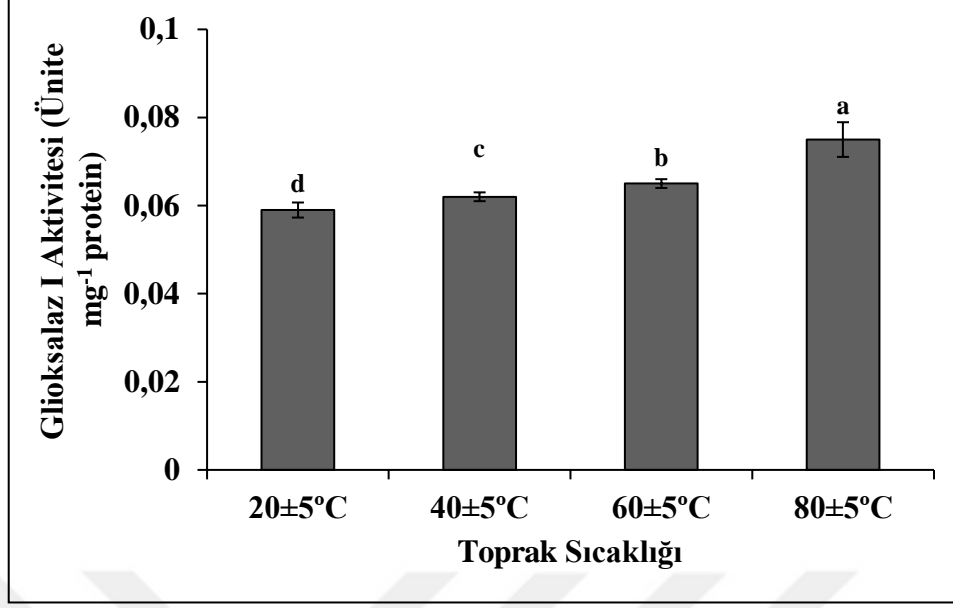


Şekil 30. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının toplam karotenoid içeriğine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.10. Gliksalaz Sistem Enzimlerindeki Değişimler

3.3.10.1. Gliksalaz I Aktivitesi

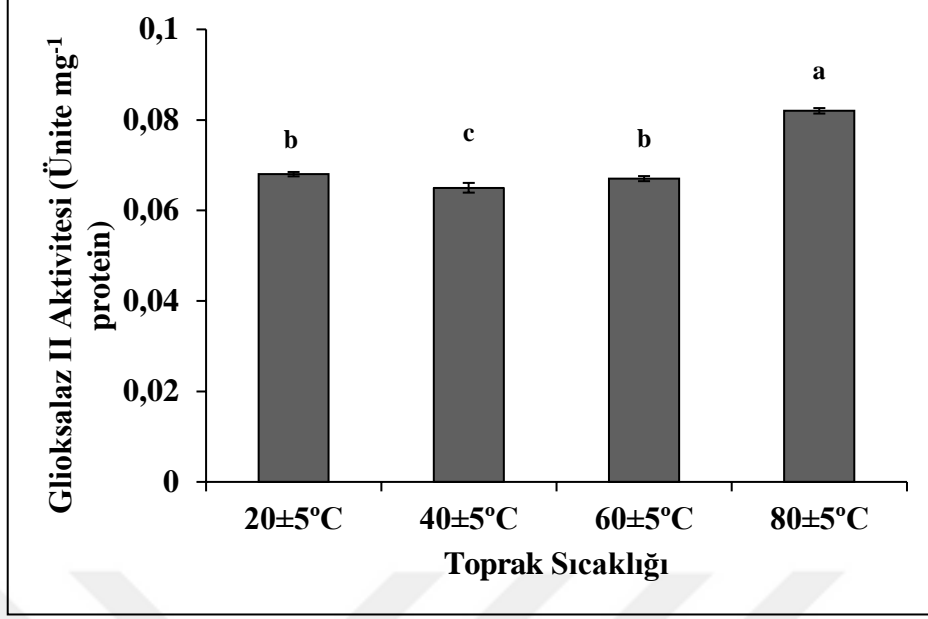
Gliksalaz I aktivitesinin $20 \pm 5^\circ\text{C}$ toprak sıcaklığında yetişen bitkilerde düşük olduğu kaydedildi. Aynı zamanda artan sıcaklıklar ile beraber gliksalaz I aktivitesinin artış eğiliminde olduğu belirlenerek, en yüksek aktivitenin ise $80 \pm 5^\circ\text{C}$ toprak sıcaklığında yaşayan bitkilerde görüldüğü tespit edildi (Şekil 31).



Şekil 31. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının Glioksalaz I aktivitesine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.10.2. Glioksalaz II Aktivitesi

Glioksalaz II aktivitesininin 80±5°C sıcaklık uygulaması yapılmış bitki gruplarında kontrole göre önemli derecede arttığı bulundu. 40±5°C sıcaklık uygulaması yapılmış bitkilerin glioksalaz II aktivitesinde kontrol grubuna göre düşüş kaydedildi. Diğer taraftan 20±5°C ve 60±5°C sıcaklık uygulaması yapılmış bitki grupları arasında istatistiki bir farka rastlanmadı (Şekil 32).

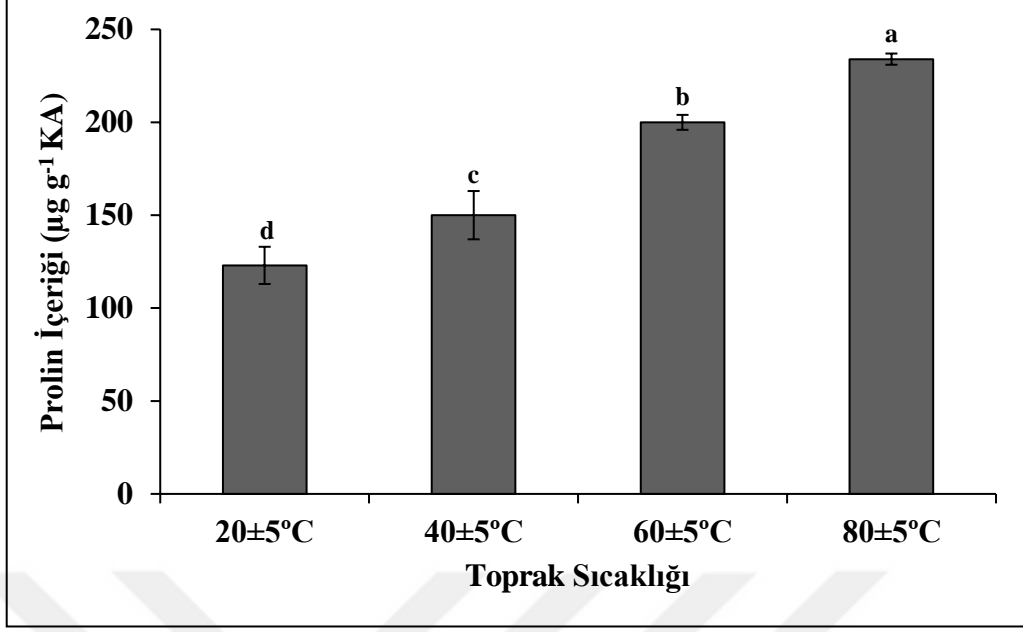


Şekil 32. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının Gliksalaz II aktivitesine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.11. Ozmolitlerdeki Değişimler

3.3.11.1. Prolin İçeriği

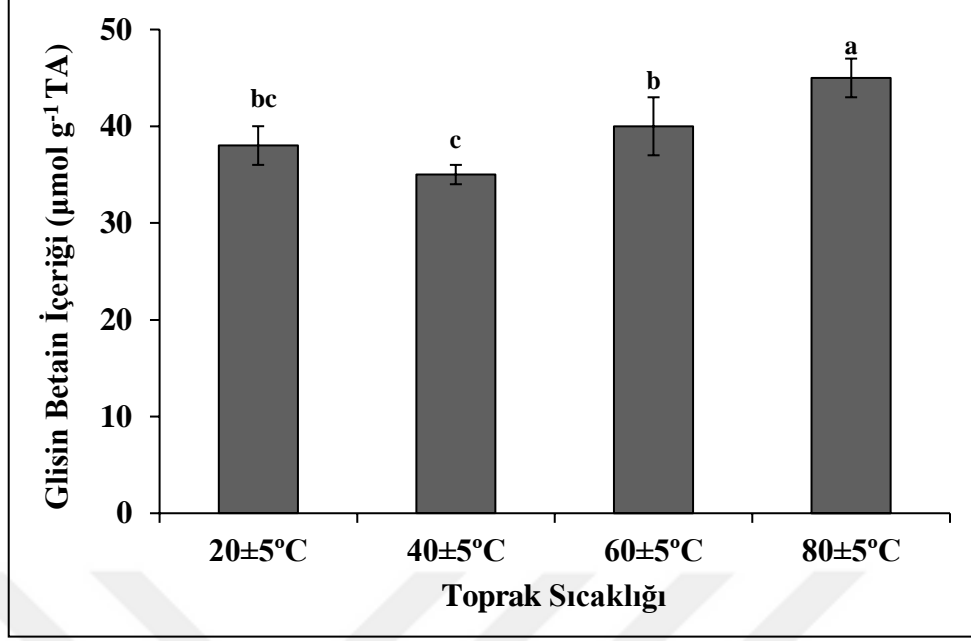
Ozmolit bileşiklerden prolin içeriğinin sıcaklığın artması ile daha fazla birikim gösterdiği bulundu. En düşük prolin içeriğine 20±5°C toprak sıcaklığında yaşayan bitkilerde, en yüksek prolin içeriğine ise 80±5°C toprak sıcaklığındaki bitkilerde rastlandı (Şekil 33).



Şekil 33. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının prolin içeriğine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.11.2. Glisin Betain İçeriği

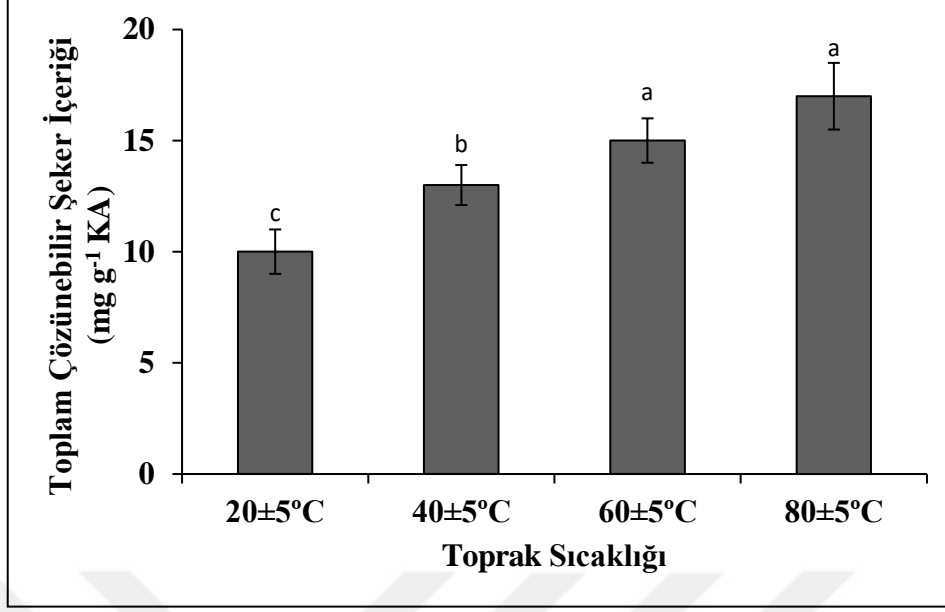
Diğer bir ozmolit olan glisin betain içeriği 80±5°C toprak sıcaklığında yaşayan bitki yapraklarında, diğer toprak sıcaklığında yaşayan bitki gruplarına kıyasla daha fazla arttığı tespit edildi. Aynı zamanda 60±5°C ve 80±5°C'deki bitki grupları ile kıyaslandığında 40±5°C'de yetişen bitkilerdeki glisin betain içeriğinin azaldığı bulundu (Şekil 34).



Şekil 34. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının glisin betain içeriğine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.11.3. Toplam Çözünabilir Şeker İçeriği

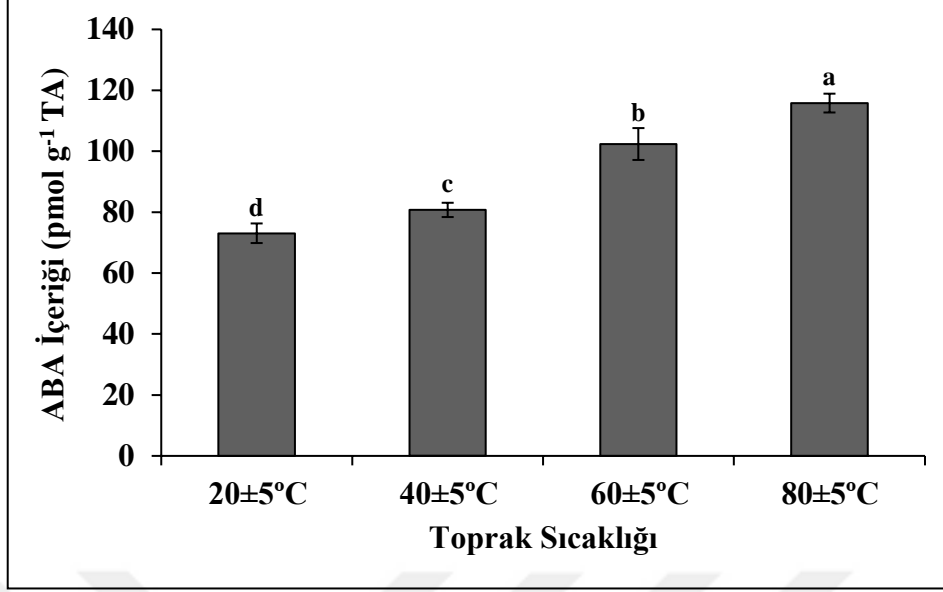
Toplam çözünabilir şeker içeriğinin kontrol grubu bitkileri ile kıyaslandığında yüksek sıcaklık uygulaması yapılmış topraklarda yetişen bitkilerde aşırı birikime uğradığı görüldü. Ayrıca 60±5°C ve 80±5°C'deki bitki grupları arasında istatistiki olarak herhangi bir farka rastlanmadı (Şekil 35).



Şekil 35. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının toplam çözünbilir şeker içeriğine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.3.12. Absisik Asit İçeriği

Uygulanan dört farklı toprak sıcaklığının absisik asit (ABA) içeriği üzerine etkisi incelendiği zaman, ABA içeriğinin artan sıcaklıklar ile paralel olarak arttığı bulundu. Örneğin en düşük ABA içeriğine 20±5°C' de yaşayan bitki gruplarının, en yüksek ABA içeriğine de 80±5°C'de yaşayan bitki gruplarının sahip olduğu belirlendi (Şekil 36).

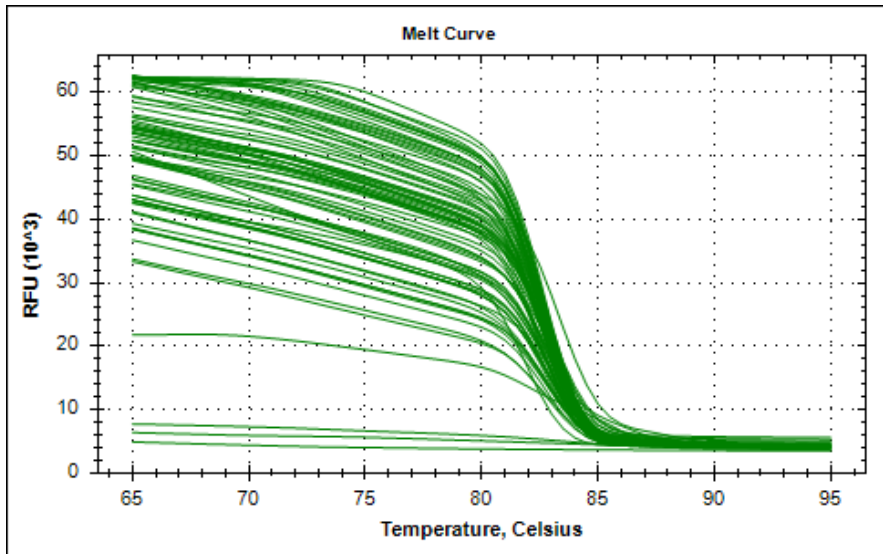


Şekil 36. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının ABA içeriğine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.4. Moleküler Analizler

3.4.1. Kantitatif Real-Time PCR

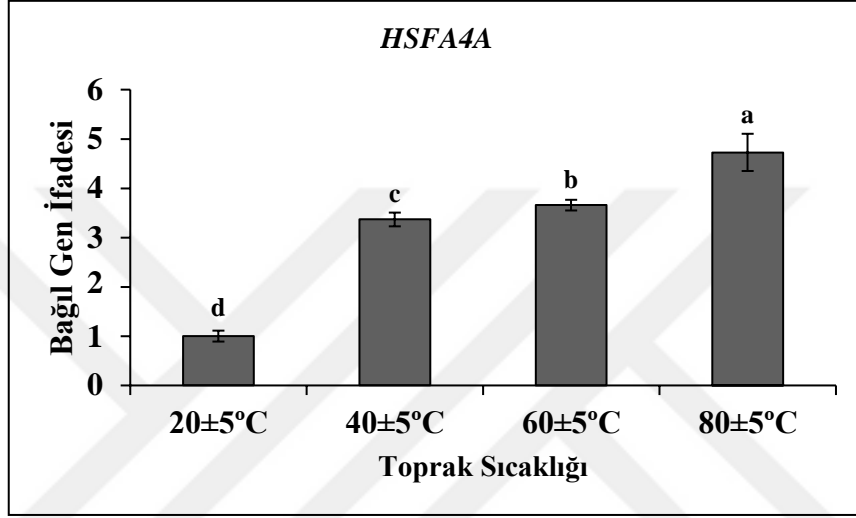
HSF4A4, *HSFA3*, *HSF4* genlerinin kantitatif Real-Time PCR amplifikasyonunun ‘‘Melt Curve’’ (erime eğrisi) değerleri şekil 37’de verildi.



Şekil 37. *HSF4A4*, *HSFA3*, *HSF4* genlerinin kantitatif Real-Time PCR amplifikasyonunun Melt Curve değerleri.

3.4.1.1. *HSFA4A* Gen İfadesi

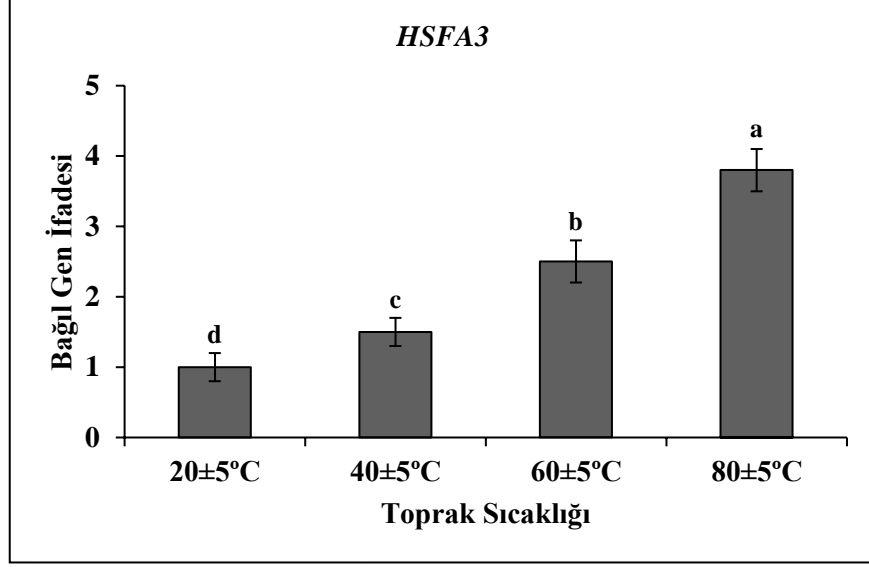
Dört farklı sıcaklık uygulamalarının *HSFA4A* gen ifade seviyesi üzerine etkisine bakıldığında, kontrol grubu olan $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ bitki grubu ile kıyaslama yapıldığında diğer yüksek sıcaklıklarda ifade seviyelerinde bir artışa rastlandı. Bu artışların $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ bitki grubunda en yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 38).



Şekil 38. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının *HSFA4A* ifadesine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P\leq 0,05$) göstermektedir.

3.4.1.2. *HSFA3* Gen İfadesi

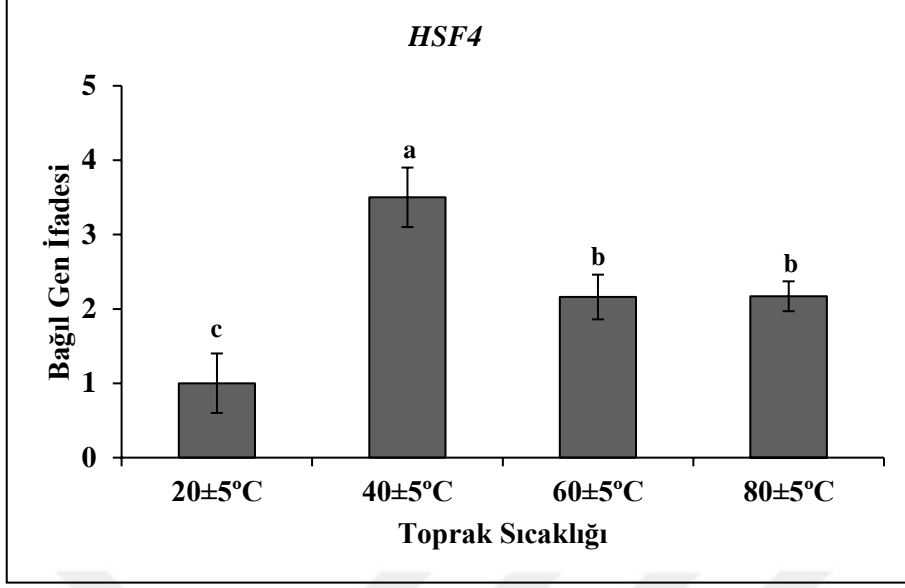
Dört farklı sıcaklık uygulamalarının *HSFA3* gen ifade seviyesi üzerine etkisine bakıldığında, kontrol ($20\pm 5^{\circ}\text{C}$) grubu ile kıyaslama yapıldığında diğer sıcaklıklarda ifade seviyesinde istatistiki olarak önemli bir artışa rastlandı. Bu artışın $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ bitki gruplarında daha fazla olduğu tespit edildi (Şekil 39).



Şekil 39. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının *HSFA3* ifadesine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.4.1.3. *HSF4* Gen İfadesi

Genel olarak bakıldığında, *HSF4* gen ifade seviyesi 20±5°C bitki grubu ile kıyaslandığında yüksek sıcaklıklardaki bitkilerdeki ifade seviyelerinde önemli bir artışa rastlandı. *HSF4* gen ifadesindeki bu artışın 40±5°C' de yaşayan bitki grubunda daha fazla olduğu, 60±5°C ve 80±5°C'deki bitki gruplarına ait *HSF4* gen ifadesinde istatistiki bir fark olmadığı bulundu (Şekil 40).

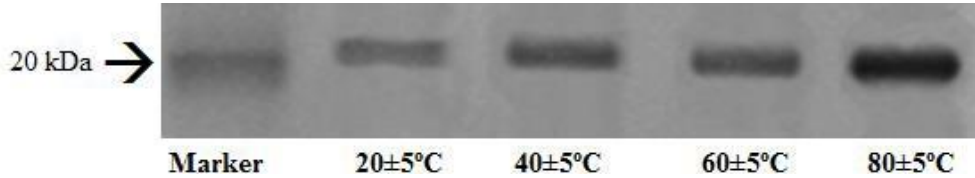


Şekil 40. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının *HSF4* ifadesine etkisi. Barlar ortalamaların standart sapmasını belirtmektedir (n=3). Barlar üzerindeki farklı harfler, tüm sıcaklıklar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.4.2. Western Blot Analizleri

3.4.2.1. FeSOD Protein Sentezi

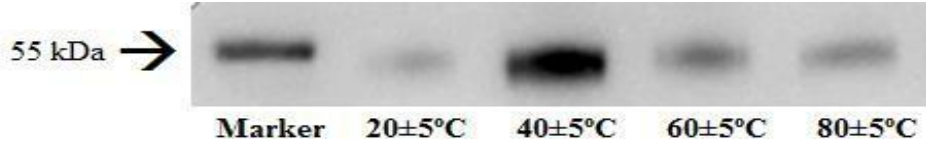
Kontrol ($20 \pm 5^\circ\text{C}$) grubu bitki yapraklarındaki FeSOD proteinine ait bandın açık olduğu bulundu. $20 \pm 5^\circ\text{C}$ (kontrol) toprak sıcaklığında yetişen bitkiler ile kıyaslama yapıldığında $40 \pm 5^\circ\text{C}$, $60 \pm 5^\circ\text{C}$ ve $80 \pm 5^\circ\text{C}$ toprak sıcaklıklarında yetişen bitkilere ait FeSOD proteininin bandının yoğun olduğu ve ancak $80 \pm 5^\circ\text{C}$ 'de yaşayan bitki gruplarında belirgin bir şekilde yoğun olduğu bulundu (Şekil 41).



Şekil 41. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının FeSOD proteini üzerine etkisi.

3.4.2.2. CAT Protein Sentezi

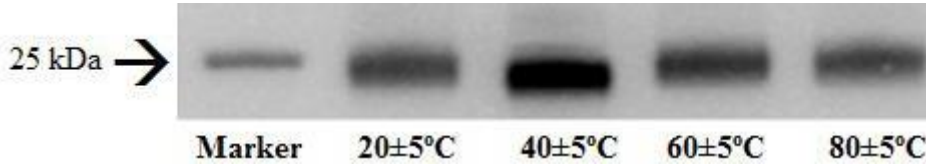
Deney gruplarından $40\pm 5^{\circ}\text{C}$, $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında yetişen bitkilere ait CAT protein bandının $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 'de yetişen bitkiler ile karşılaştırıldığında yoğun olduğu bulundu. $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ 'de yaşayan bitki grubunda CAT protein bandındaki aşırı yoğun olduğu belirlendi (Şekil 42).



Şekil 42. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının CAT proteini üzerine etkisi.

3.4.2.3. GPX Protein Sentezi

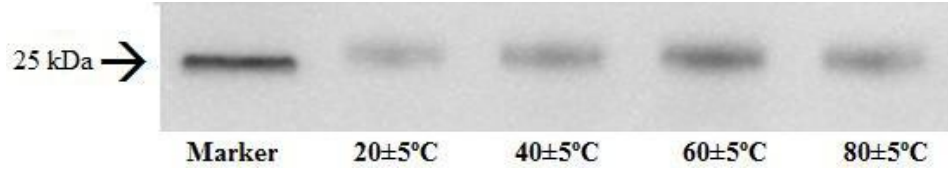
GPX protein bandı $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında yetişen bitki yapraklarındaki ile kıyaslandığında $40\pm 5^{\circ}\text{C}$, $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında yaşayan bitki gruplarında yoğun olduğu tespit edildi. Ancak $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ bitki grubunda belirgin bir şekilde yoğun olduğu bulundu (Şekil 43).



Şekil 43. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının GPX proteini üzerine etkisi.

3.4.2.4. GR Protein Sentezi

Yüksek sıcaklıklarda yaşayan bitkilerdeki GR protein yoğunluğunun $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta yaşayan bitkilere oranla daha fazla olduğu tespit edildi. Bu artışın $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 44).



Şekil 44. Farklı toprak sıcaklığı uygulamalarının GR proteini üzerine etkisi.

4. TARTIŞMA

Mevcut çalışmada, termofil *H. thermophilum*' un laboratuvar koşullarında aşırı yüksek toprak sıcaklığında ($80\pm 5^{\circ}\text{C}$) uzun süre canlı kaldığı belirlenmiş ve yüksek ve aşırı yüksek sıcaklıklarda geliştirdiği tolerans mekanizması morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yönden detaylı bir şekilde aydınlatılmıştır.

Yapılan çalışmada doğal ortamdan toplanan tohumlar laboratuvar koşullarında çimlendirilerek doğal jeotermal alandan alınan toprak ortamında büyütülen bitkiler farklı toprak sıcaklıklarına (20 ± 5 , 40 ± 5 , 60 ± 5 ve $80\pm 5^{\circ}\text{C}$) maruz bırakılmıştır. Belirtilen bu sıcaklıklar, özel imal edilmiş sıcaklık ayarlı ısı ünitelerindeki saksı toprağına 2 haftada 20°C artırılarak kademeli bir şekilde uygulanmıştır. Literatürde de çalışmamızdaki gibi benzer sıcaklık uygulamaları yapılmıştır. Örneğin salatalığın (*Cucumis sativus* L.) kök çevresine çeşitli sıcaklık uygulamaları yapılmıştır (Al-Rawahy vd., 2019). Ayrıca çilek (*Fragaria x ananassa*) ve pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) bitkilerinin maruz kaldığı atmosfer sıcaklığının kademeli bir şekilde arttırıldığı çalışmalar da mevcuttur (Gür vd., 2010; Ergin vd., 2012).

Çalışmamızdaki sıcaklık uygulamaları tamamlandığında 10 haftalık olan bitki yapraklarının sıcaklıkları da kaydedilmiştir ve fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler analizler için bitkilerin yaprakları kullanılmıştır. Uygulanan toprak sıcaklıklarının yapraklara ne ölçüde yansıdığını belirlemek için infrared dijital termometre ile yaprakların yüzey sıcaklıkları ölçülmüştür. Yaptığımız ölçümlerde $20\pm 5^{\circ}\text{C}$, $40\pm 5^{\circ}\text{C}$, $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında büyütülen bitki yapraklarının yüzey sıcaklıkları sırasıyla $20\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, $28\pm 0,4^{\circ}\text{C}$, $32\pm 0,4^{\circ}\text{C}$ ve $44\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ olduğu bulunmuştur. Buradan hareketle çalışmamızın ilk aşamasında uygulanan dört farklı sıcaklığın bitkilerde stres etkisi oluşturup oluşturmadığını belirleyebilmek için sürgün ve kök uzunluğu, sürgün yaş ve kuru ağırlığındaki değişimlere, yaprak su potansiyeli ve stoma iletkenliğinin yanısıra TBARS, H_2O_2 , O_2^- , MG gibi reaktif bileşiklerin birikimine bakılmıştır.

Yüksek sıcaklık stresi bitkilerde sürgün ve kök uzunluğunu etkileyerek bitki büyüme ve gelişmesini önemli derecede etkilediği bilinmektedir (Pregitzer vd., 2000). Bu nedenle yapılan çalışmamızda öncelikle farklı sıcaklık uygulamaları ile sürgün ve kök uzunluklarında meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Sürgün uzunluklarının $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığındaki bitkilerde, $20\pm 5^{\circ}\text{C}$, $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında yaşayan

bitkiler ile karşılaştırıldığında büyüme ve gelişmenin daha fazla olması ile ilişkili olarak daha fazla olduğu bulunmuştur. Ayrıca kök uzunluklarının da artan sıcaklıkla beraber azaldığı belirlenmiştir. Bitkilerin doğal ortamındaki gibi yüksek sıcaklıkta köklerin yüzeye yakın olduğu, derin bir kök sisteminin olmadığı belirlenmiştir. Bu veriler bitkilerin kök büyümesinin, sürgün gelişimine oranla sıcaklıktan daha fazla etkilendiğini göstermektedir. Benzer olarak literatürde bitkilerin toprak sıcaklığının artması ile kök ve sürgün büyümesinin azaldığı rapor edilmiştir (Awal vd., 2003). Diğer yandan, atmosferik sıcaklık stresinin *T. aestivum*'a ait 4 farklı genotipin sürgün uzunluklarını olumsuz yönde etkilediğini gözlemlenmiştir (Ahamed vd., 2010). Yukarıda belirtilen çalışmalara ilave olarak Al-Busaidi vd. (2012) yüksek atmosfer sıcaklığının, *Jatropha curcas*'ta (biyoyakıt bitkisi) su kaybına neden olarak büyümeyi ve biyokütle üretimini olumsuz yönde etkilediğini kaydetmişlerdir.

Yüksek sıcaklık stresinden etkilenen bir diğer parametre de bitkilerdeki kuru ve yaş ağırlık miktarının azalmasıdır (Sharma vd., 2018). Bu nedenle mevcut araştırmada da farklı sıcaklık uygulamalarına maruz kalan bitkilerde sürgün kuru ve taze ağırlık miktarlarına da bakılmış ve en yüksek sürgün kuru ağırlığın $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ ' de yaşayan bitkilerde, onu sırasıyla $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında yaşayan bitki gruplarının takip ettiği bulunmuştur. En düşük sürgün kuru ağırlığına ise $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ ' de yaşayan bitkilerde rastlanılmıştır. Literatürde çeşitli sıcaklıklarda yapılan çalışmalar da mevcuttur. Örneğin salatalık fidelerine uygulanan 6 günlük toprak sıcaklıklarının ($35-38^{\circ}\text{C}$) bitkilerde kök kuru ağırlığını ve yaprak alanını azalttığı rapor edilmiştir (Du ve Tachibana, 1994). Farklı bir başka çalışmada da mısır ve darıya 8 gün boyunca uygulanan 45°C 'lik atmosfer sıcaklığın kuru ağırlık, bağıl büyüme hızı ve net asimilasyon oranını düşürdüğü rapor edilmiştir (Ashraf ve Hafeez, 2004). Ayrıca Soengas vd. (2018) 32°C atmosferik sıcaklık altındaki *Brassica oleracea* bitkilerinin kuru ağırlığının kontrol (20°C) bitkilerine göre artış gösterdiğini belirlemişlerdir. Diğer bir çalışmada da Al-Rawahy vd. (2019) da salatalık (*Cucumis sativus* L.) bitkilerinin kök çevresine uyguladığı çeşitli sıcaklıkların ($22, 25, 28, 33^{\circ}\text{C}$) sürgün kuru ağırlığı üzerine etkilerini değerlendirdiklerinde, artan sıcaklık ile beraber sürgün kuru ağırlığının azaldığını bulmuşlardır. Mevcut araştırmamızda sürgünlerin kuru ağırlığının yanı sıra taze ağırlıkları da ölçülmüştür. Sürgün taze ağırlık ölçümlerimiz de sürgün kuru ağırlık analizlerimiz ile paralellik göstermektedir. Ölçümlerimizde en yüksek sürgün taze ağırlığı $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta yaşayan bitkilerde bulunmuştur. En düşük kuru ağırlığa ise $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ ' de yaşayan bitkilerde rastlanılmıştır.

80±5°C’de sürgün taze ve kuru ağırlığının düşük olma nedeninin, yüksek sıcaklık altında bitki büyümesinin yavaşlamasından ve fotosentezin inhibisyonundan kaynaklı olabileceğini söyleyebiliriz (Hasanuzzaman vd., 2013)

Bitkilerdeki yüksek sıcaklık stresi yaprak senesensi, klorofil yıkımı gibi morfolojik değişimlere de neden olabilir (Allahverdiev vd., 2008). Ancak çalışmamızda aşırı yüksek sıcaklığa maruz kalan *H. thermophilum* bitkilerinde gözle görülür yüksek sıcaklık semptomlarına (senesens, yapraklarda renk kaybı) rastlanmamıştır. Bulgularımıza benzer olarak Tian vd. (2009) termofil *Agrostis scarba*’da 12 gün boyunca 35°C atmosfer sıcaklık uygulaması ile (20°C’deki kontrollerine kıyasla) herhangi bir sıcaklık stresi hasarına rastlanmamışlardır. Başka bir çalışmada Rossi vd. (2017) 24°C atmosfer sıcaklığında 42 gün boyunca büyütülen bitki grubu ile kıyaslandığında, sıcaklığa toleranslı *Agrostis spp.*’nin türlerinde 38°C’de bile klorofil kaybı ve herhangi bir senesens belirtisinin olmadığını bulmuşlardır. Ancak çalışmamızda uygulanan toprak sıcaklıklarına benzer bir aşırı yüksek sıcaklık derecesine literatürde rastlanılmamıştır. Dolayısıyla *H. thermophilum*’un literatürde rastlanan diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında da, 40±5°C, 60±5°C ve hatta 80±5°C toprak sıcaklığında bile bu tip semptomlar göstermemesi çok ilginç bir bulgudur. Bu da *H. thermophilum*’un yüksek sıcaklığa dayanıklılıkta çok farklı ve güçlü bir tolerans mekanizmasına sahip olduğunu göstermektedir.

Yüksek sıcaklık stresinden etkilenen diğer parametrelerden birisi de lipid peroksidasyonundan kaynaklı TBARS seviyesindeki artışlardır. Yüksek sıcaklık stresi altında TBARS seviyesinin hücrel oksidatif hasarın en yaygın belirteçlerinden biri olduğu bilinmektedir (Savicka ve Škute, 2010). Mevcut çalışmamızda TBARS miktarının farklı sıcaklıklardaki değişimleri belirlenmiş olup, 40±5°C ve 60±5°C toprak sıcaklıklarında büyütülen bitkilerde TBARS içeriği bakımından istatistiki bir farka rastlanılmamış olup, ilginç olarak 20±5°C ve 80±5°C’de yaşayan bitkilerden daha düşük TBARS içerdiğine sahip oldukları bulunmuştur. Aynı zamanda 20±5°C’ de yaşayan bitkilerin TBARS içeriği 80±5°C’de yaşayan bitkilerden daha düşük olup, en yüksek TBARS içeriğine 80±5°C’de yaşayan bitkilerde rastlanılmıştır. Yapılan literatür araştırmasında, Kumar vd. (2012) 11 gün boyunca 40/35°C (gündüz/gece sıcaklığı) atmosfer sıcaklığında büyütülen çeltik ve mısır genotiplerinde lipid peroksidasyonunun kontrol (30/25°C) gruplarına kıyasla arttığını tespit etmişlerdir. Gür vd. (2010) 45°C atmosferik sıcaklığına 2 saat maruz bıraktığı pamuk kültürvarlarında (*Gossypium hirsutum* L.) lipid peroksidasyonunun 30°C ve 38°C sıcaklık uygulamalarına oranla daha fazla

arttığını bulmuşlardır. Yukarıda bahsedilen literatürdeki çalışmalarda kullanılan sıcaklık uygulamalarında büyük çapta hasarlar tespit edilirken, *H. thermophilum* bitkisi maruz kaldığı aşırı yüksek sıcaklıkta bile canlı kalabildiği ortaya çıkarılmıştır.

Yüksek sıcaklık stresi altında H_2O_2 ve O_2^- gibi ROT'ların miktarlarında artış gözlenmesi de sıcaklığa verilen cevaplar arasındadır. Süperoksitten daha uzun ömürlü bir sinyal molekül olan H_2O_2 en büyük ve en kararlı ROT'lardan birisidir (Ślesak vd., 2007). Mevcut çalışmamızda da, reaktif oksijen türlerinden olan H_2O_2 ve süperoksit anyonu (O_2^-) içeriklerindeki değişimler araştırılmıştır. Diğer sıcaklık uygulamaları ile karşılaştırıldığında, toprak sıcaklığının $40\pm 5^\circ C$ olduğu bitki yapraklarındaki H_2O_2 içeriğinde istatistiki olarak önemli bir düşüş, $80\pm 5^\circ C$ toprak sıcaklığında yaşayan bitki yapraklarındaki H_2O_2 içeriğinin de ise istatistiki olarak önemli bir değişim belirlenmemiştir. Ayrıca $20\pm 5^\circ C$ ve $60\pm 5^\circ C$ sıcaklıklar altında yaşayan bitkilerde belirlenen H_2O_2 içeriği arasında istatistiki açıdan önemli bir farka rastlanmamıştır. DAB boyama ile H_2O_2 belirlenmesinde, yapraklarda belirlenen kahverengi lekelerin de $80\pm 5^\circ C$ yaşayan bitkilerde daha yoğun olduğu tespit edilmiş olup, bu veriler içsel H_2O_2 miktarı bulguları ile paralellik göstermektedir. Elde ettiğimiz bulgulara benzer olarak Ergin vd. (2012) *Fragaria x ananassa* bitki yapraklarını 2 saat boyunca, 10 dak $1^\circ C$ arttırdığı (kademeli) 35, 40, 43, 46, 49, 52, 55 ve $60^\circ C$ atmosferik sıcaklık stresine maruz bırakması sonucunda $46^\circ C$ 'den sonraki sıcaklıklarda H_2O_2 içeriğinin arttığını bulmuşlardır. Bir başka çalışmada ise 10 gün boyunca $40/35^\circ C$ atmosferik sıcaklığında H_2O_2 düzeyinin kontrollerine ($30/25^\circ C$) göre çeltik ve mısır genotiplerinin yapraklarında artış gösterdiği ve ayrıca bu artışın $45/40^\circ C$ 'de daha yüksek olduğu kaydedilmiştir (Kumar vd., 2012).

Yaptığımız analizler sonucu elde edilen O_2^- içeriğine ait verilerimiz ile hidrojen peroksit bulgularımızın benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Örneğin $40\pm 5^\circ C$ sıcaklıkta yaşayan bitkilerin O_2^- içeriği diğer sıcaklık uygulamalarına göre azalırken, toprak sıcaklığının $80\pm 5^\circ C$ olduğu bitkilerdeki O_2^- içeriğinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca $20\pm 5^\circ C$ ve $60\pm 5^\circ C$ 'de yaşayan bitkilerdeki O_2^- içeriğinde istatistiki açıdan önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Literatürdeki benzer çalışmalara bakıldığında, *T. aestivum* fidelerinde 24 saatlik sıcaklık ($42^\circ C$) uygulamasının O_2^- ve MDA içeriklerinde artış meydana getirdiğini ve oksidatif hasarlara neden olduğu rapor edilmiştir (Savicka ve Škute 2010)

Bitkilerde yüksek sıcaklık altında ROT birikimine benzer olarak metilglioksal (MG)'nin de hücrelerdeki redoks regülasyonunda etkili bir faktör olarak kullanılabileceği

ön görülmüştür (Mostofa vd., 2018). Stressiz koşullardaki birçok bitkide MG içeriğinin genellikle düşük seviyede (30-75 μM) olduğu ancak abiyotik stres koşullarındaki bitkilerde ise MG içeriğinde ciddi bir artış olduğu görülmüştür (Yadav vd., 2005a; Mostofa vd., 2015a,b). Çalışmamızda da yukarıdaki literatür bilgilerine benzer olarak $80\pm 5^\circ\text{C}$ 'de yaşayan bitkilerdeki içsel MG içeriğinde artış ($80,7\pm 4 \mu\text{M g}^{-1} \text{TA}$) olduğu bulunmuştur. Mevcut çalışmada MG konsantrasyonunun glioksalaz sistemin çalışmasıyla kontrol edildiğini söyleyebilmekteyiz. Glioksalaz I ve Glioksalaz II gibi glioksalaz sistem enzim aktivitelerinin yüksek olması $40\pm 5^\circ\text{C}$ sıcaklıkta yetişen bitkilerde MG birikiminin en az seviyede kalmasını sağlamış olabilir. Elde ettiğimiz verilere benzer olarak 48 saat boyunca 40°C atmosferik sıcaklığına maruz kalmış *Vigna radiata* yapraklarında da MG içeriğinin arttığı bulunmuştur (Nahar vd., 2017).

Bitkilerdeki yaprak su potansiyeli değişen ortam sıcaklıklarından en fazla etkilenen parametreler arasında gösterilmektedir (Mazorra vd., 2002). Genel olarak, bitkiler suyun yeterli olduğu ortamlarda dokularındaki su durumlarını sabit tutmaya çalışarak yüksek sıcaklık hasarlarından korunmaya çalışırlar. Nitekim yüksek sıcaklık su kullanımını ciddi bir şekilde sınırlandırır (Machado ve Paulsen, 2001). Ayrıca tarla koşullarında, yüksek sıcaklık stresi çoğunlukla su durumunun azalması ile ilişkilendirilmektedir (Simoes-Araujo vd., 2003). Örneğin, 12 saatlik atmosferik sıcaklık uygulaması ($40/35^\circ\text{C}$) ile şeker kamışının (*Saccharum officinarum* L.) yaprak su potansiyelinde keskin bir azalış olduğu bulunmuştur (Wahid ve Close, 2007). Mevcut çalışmamızda $40\pm 5^\circ\text{C}$ sıcaklıkta yaşayan bitkilerin yaprak su potansiyelinin diğer gruplara oranlara daha yüksek olduğu, $80\pm 5^\circ\text{C}$ sıcaklıkta yaşayan bitkilerinin yaprak su potansiyelinin ise az da olsa düşüş meydana geldiği bulunmuştur. Ayrıca yaptığımız analizler sonucunda $20\pm 5^\circ\text{C}$ ve $60\pm 5^\circ\text{C}$ sıcaklıkta yaşayan bitkilerin yaprak su potansiyelleri arasında istatistiki açıdan önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Şöyle ki toprak sıcaklıklarının $20\pm 5^\circ\text{C}$, $40\pm 5^\circ\text{C}$, $60\pm 5^\circ\text{C}$ ve $80\pm 5^\circ\text{C}$ olduğu bitkilere ait yaprak su potansiyelleri sırasıyla, $-0,75\pm 0,02$, $-0,59\pm 0,08$, $-0,77\pm 0,02$, $-0,86\pm 0,02$ MPa olduğu bulunmuştur.

Bitkilerde CO_2 alımını ve transpirasyonu kontrol eden yapılardan birisi de stomalardır. Stomalar çeşitli çevresel streslerden bitkileri korumuda çok önemli bir role sahiptir (Zhang, 2008; Kim vd., 2010; Osakabe vd., 2014). Çalışmamızda yüksek toprak sıcaklığında büyütülen bitkilerin su durumunu koruyabilme potansiyelini aydınlatabilmek için stoma iletkenliği ölçümleri yapılmıştır. Uygulama gruplarımıza (20 ± 5 , 40 ± 5 , 60 ± 5 ve $80\pm 5^\circ\text{C}$) ait stoma iletkenliği ölçümlerinin sırasıyla $4,1\pm 2$, $5,1\pm 2$, $3,8\pm 2$, $3,1\pm 2$ $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

olduğu bulunmuştur. Burada $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ 'de yaşayan bitkilerin stoma açıklığının diğer bitki gruplarına oranla daha fazla olduğu tespit edilirken, $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ 'de yaşayan bitkilerin su kaybını azaltmak için stoma açıklığını diğer sıcaklık uygulamalarına göre azalttığı gözlenmiştir. Benzer şekilde Morales vd. (2003) 4 gün boyunca 33°C atmosferik sıcaklık stresi altındaki domates fidelerinde su kaybını önlemek için stoma açıklığını kapatarak, iletkenliğini düşürdüğünü bulmuşlardır. Ayrıca stoma iletkenliği kontrolünün sağlanması kapsamındaki bulgularımızla ilişkili olarak, MG'nin stomaların açılıp kapanmasını kontrol ederek bitki stres cevaplarını düzenlediğini (Hoque vd., 2016) söyleyebiliriz. Şöyle ki: $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ 'de yaşamını devam ettiren bitki gruplarında artan MG içeriğinin stoma kapanmasını uyarak stoma iletkenliğini düşürmeye yardımcı olabileceğini böylece bitkilerin yüksek sıcaklıktan kaynaklı su kaybını önlemeye çalıştığını ifade edebiliriz.

Bu aşamaya kadar çalışmamızda yukarıda bahsedilen araştırmalardan yola çıkılarak, topraktan uygulanan $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ 'nin de dahil olduğu diğer tüm sıcaklıklarda ($20\pm 5^{\circ}\text{C}$, $40\pm 5^{\circ}\text{C}$, $60\pm 5^{\circ}\text{C}$) büyüyen bitkilerin yaşamlarını devam ettirebildikleri görülmüştür. Gerek morfolojik gerekse stres parametreleri ile ilgili yapılan analizler ele alındığında aşırı yüksek sıcaklık koşullarında *Heliotropium thermophilum*'da analiz edilen stres parametrelerinde önemli bir değişim olmadığı, sadece bitkilerdeki metabolik aktivitenin azalmasından ötürü büyümesinin yavaşladığı bulunmuştur. Başka bir ifade ile en yüksek sıcaklık koşullarında bile bitkilerin yapraklarında herhangi bir sıcaklık stresi hasarı, senesens, pigment kaybı gibi değişimlerine rastlanmamıştır. Dolayısıyla bitkinin doğal yayılış gösterdiği $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ 'den daha yüksek bir sıcaklığa ($80\pm 5^{\circ}\text{C}$) bile oldukça toleranslı olduğu, bu koşullarda bile yaşamını devam ettirebileceği anlaşılmıştır.

Çalışmamızın ikinci aşamasında ise *H. thermophilum*'un aşırı yüksek sıcaklığa tolerans mekanizmasını aydınlatmak için antioksidan ve glioksalaz kapasitelerinin düzenlenmesine, ozmotik ayarlanmaya, hormonal kontrole ve ayrıca moleküler yönden sıcak şok faktörlerinin (HSF'ler) ifade düzeylerine ve bazı antioksidan protein içeriklerindeki değişimlere bakılmıştır. Bu aşamada ilk olarak termofil *H. thermophilum*'un yüksek tolerans sağlamada antioksidan ve glioksalaz kapasitenin etkili olabileceği hipotezini test etmek için antioksidan sistem enzimlerinden SOD, CAT, APX, GPOD, GR, MDHAR, DHAR aktiviteleri, AsA, GSH ve karotenoid gibi enzimatik olmayan antioksidan bileşik içerikleri ve ayrıca glioksalaz sistem enzimlerinden glioksalaz I ve glioksalaz II aktiviteleri analiz edilmiştir.

Bitkiler, yüksek sıcaklıkta ROT birikiminden kaynaklı oksidatif strese karşı tolerans mekanizmaları geliştirip yüksek sıcaklıklarda yaşayabilirler. Zirai bitkilerde yüksek sıcaklık stresine tolerans, antioksidan kapasitede meydana gelen artışlar ile ilişkilendirilmiştir (Almeselmani vd., 2006). Çeşitli çevresel streslere maruz kalan bitkilerde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sisteminde önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Antioksidan enzimler (SOD, CAT ve GR) bitki hücre bileşenleri üzerinde oksidatif hasarların çok düşük bir seviyede tutulmasını sağlamaktadır (Raseetha vd., 2013). Bu sebeple çalışmamızda SOD, CAT, GR, enzim aktivitelerinin ölçümüne yer verilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda CAT aktivitesinin kontrol ($20\pm 5^{\circ}\text{C}$) grubuna göre tüm sıcaklık denemelerinde arttığı, bu artışın $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ sıcaklık uygulaması yapılmış topraklarda büyütülen bitkilerde daha yüksek olduğu bulunmuştur. SOD aktivitesinin ise diğer sıcaklık uygulamaları ile karşılaştırıldığında $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta yaşayan bitkilerde önemli derecede arttığı belirlenirken, $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ 'deki bitki grubu ile $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ bitki grupları arasında istatistiki açıdan önemli bir değişim olmadığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarla çevresel birçok strese cevap olarak en aktif çalışan enzimlerin CAT ve SOD olduğu ve SOD'un genellikle oksidatif strese karşı ilk savunma hattı olarak kabul edildiği belirtilmiştir (Grabowska ve Kunicki, 2013; Zhang vd., 2015). Bu bilgidен hareketle çalışmamızda *H. thermophilum*'un aşırı yüksek sıcaklığa toleransı SOD aktivitesindeki artış ile değerlendirilebilir. Bu enzim, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin kendinden daha az zararlı bileşik olan H_2O_2 'ye dönüşümünü katalize eder ve H_2O_2 de APX veya CAT gibi diğer enzimler tarafından bozularak ROT birikimi hafifletilmiş olur. Her iki enzimin H_2O_2 'yi yıkıma uğratmasına rağmen, CAT'ın rolü esas olarak stresli koşullarda ROT fazlalığını nötralize etmek, APX'in ise daha çok sinyalleşme için ROT'ların düzenlenmesidir (Lin vd., 2010). Çalışmamızda APX aktivitesinin artan sıcaklıklara paralel bir artış gösterdiği ve bu artışın $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında büyütülen bitki yapraklarında daha fazla olduğu bulunmuştur. Balla vd. (2009) da yaptığı bir çalışmada kışlık buğdaylara 8 saat boyunca uygulanan 35°C atmosfer sıcaklığında APX ve CAT aktivitelerinin sıcaklığa iyi tolerans gösteren kültürlerde daha fazla artarak, ROT üretimine karşı koruma sağladığını açığa çıkarmışlar ve böylece antioksidan enziminin, yüksek sıcaklık stresine karşı savunmadaki önemini göstermişlerdir. İçsel H_2O_2 içeriğini düşüren bir başka enzim olan GPOD aktivitesinin $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 'deki bitki grubu ile kıyaslandığında sıcaklık uygulaması ile arttığı ve özellikle $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ sıcaklık uygulaması yapılmış bitkilerde daha fazla artış gösterdiği bulunmuştur. Diğer bir önemli antioksidan

enzim olan GR, glutatyon disülfidin (GSSG) glutatyona (GSH) indirgenmesini katalize ederek, GSH seviyesini redoks durumunu ve hücreleri ROT'a karşı korumada önemli bir rol oynar (Ding vd., 2016). Çalışmamızda GR aktivitesinin artan sıcaklıklarla paralel olarak arttığı bulunmuştur. Literatüre baktığımızda farklı antioksidan enzimlerin aktiviteleri sıcaklığa duyarlı olduğunu ve aktivasyonun farklı sıcaklık aralıklarında gerçekleştiğini ve bazı enzim aktivitelerinin artan sıcaklıklarla beraber genellikle yükseliş gösterdiğini görebiliriz. Örneğin, Chakraborty ve Pradhan (2011) *Lens culinaris* kültürlerinde yaptığı çalışmada 20°C (kontrol), 30, 35, 40, 45, 50°C sıcaklık uygulamalarında (4 saatlik), CAT, APX ve SOD aktivitelerinde 40°C'ye kadar bir artış, sonraki sıcaklıklarda azalış gösterdiğini, GR aktivitesinin 20°C den 50°C'ye kadar olan bütün sıcaklıklarda azaldığını rapor etmişlerdir. Ayrıca toplam antioksidan aktivitenin toleranslı kültürlerde 35-40°C'de ve hassas olanlarda 30°C'de maksimum olduğunu bulmuşlardır. Diğer taraftan Almeselmani vd. (2009) de 1 haftalık 35°C atmosferik sıcaklık uygulaması ile *T. aestivum* genotiplerinde antioksidan savunma mekanizmasının, sıcaklık stresi toleransında önemli bir rol oynadığını, SOD, APX, CAT, GR ve POX'un, sıcaklığa toleranslı kültürde (C 306) gelişimin tüm aşamalarında sıcaklık stresine cevap olarak, anlamlı bir şekilde arttığını, hassas türde (PBW 343) ise yüksek sıcaklık uygulamasında CAT, GR ve POX aktivitelerinde önemli bir azalma olduğunu bulmuşlardır. Yukarıda belirtilen çalışmalara ilave olarak sıcaklığa toleranslı *B. juncea*'da 45°C atmosferik sıcaklık altında SOD, POX, CAT, APX ve GR aktivitelerinin arttığı da bir başka raporda sunulmuştur (Rani vd. 2016). *T. aestivum* fideleriyle yapılan farklı bir çalışmada Hasanuzzaman vd. (2013), atmosferik sıcaklık uygulamasının (38°C, 24 ve 48 saat) APX, GR, GPX aktivitelerinde bir artışa yol açtığını bulmuşlardır. Ayrıca antioksidan faaliyetleri farklı ekinlerin toleransına veya duyarlılığına, büyüme aşamalarına ve büyüme mevsimlerine bağlı olarak farklılık gösterdiği de açıkça ortaya koyulmuştur (Almeselmani vd., 2006; Chakraborty ve Pradhan, 2011). MDHAR, DHAR askorbat-glutatyon döngüsünün diğer enzimleri arasında olup tez çalışmamızda farklı sıcaklık uygulamasına maruz kalmış *H. thermophilum* bitkilerinde bu enzimlerin aktiviteleri belirlenmiştir. 20±5°C sıcaklık grubu ile kıyaslandığında diğer sıcaklık uygulaması yapılmış gruplarda MDHAR, DHAR enzim aktivitelerinde bir artış gözlenmiştir. Ayrıca belirtilen artışın en fazla 60±5°C ve 80±5°C sıcaklıkta yaşayan bitki gruplarında olduğu kaydedilmiştir. Burada verilen çalışmalar dışında literatürde yüksek sıcaklık stresine tolerans ile

antioksidanlardaki artışın pozitif ilişki gösterdiğine dair çok sayıda çalışma mevcuttur (Almeselmani vd., 2009; Hassanuzzaman ve Hossain, 2012).

Bitki hücreleri, suda çözünebilir-antioksidanlar glutatyon (GSH) ve askorbat (AsA), peroksiredoksinler, tioredoksinler ve glutaredoksinler gibi proteinli tiyoller ve NADH ve NADPH elektron taşıyıcılarının dahil olduğu redoks bileşenlere sahiptirler. Bu bileşikler farklı birçok redoks reaksiyonunda yer alıp bitkileri oksidatif strese karşı korumaya çalışırlar (Noctor vd., 2018). Hücrel redoks dengesinin, özellikle ROT üretiminde ve detoksifikasyonunda rol oynayan faktörler arasındaki etkileşimlerle kontrol edildiği iyi bilinmektedir (You ve Chan, 2015). Çalışmamızda farklı sıcaklık uygulamaları altındaki *H. thermophilum* bitkisinde ROT detoksifikasyonunda rol oynayan AsA ve GSH bileşiklerinin içerikleri belirlenmiştir. AsA ve GSH içeriğinin artan sıcaklıklar ile beraber arttığı bulunmuştur. Askorbat içeriğindeki bu artışın $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında yetişen bitki yapraklarında daha yüksek, $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ 'de ise düşük olduğu belirlenmiştir. Glutatyon içeriğinin ise $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında yetişen bitki yapraklarında daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yapılan literatür araştırmasında, 14 saat boyunca 46°C atmosfer sıcaklığına maruz bırakılan sıcaklığa toleranslı bir çim türünde ise AsA ve GSH sentezinin artmasıyla daha düşük ROT üretimine rastlanıldığı tespit edilmiştir (Xu vd., 2006). Bir başka çalışmada 32°C sıcaklık uygulanan *Brassica oleracea* bitkileri kontrolleri (20°C) ile kıyaslandığında, GSH içeriğinin arttığı bulunmuştur (Soengas vd., 2018). Literatürle ilişkili olarak çalışmamızda aşırı yüksek sıcaklıkta yetişen *H. thermophilum* bitkilerindeki artan AsA ve GSH miktarı ile ROT birikimi kontrol edilerek, belirli seviyede tutulduğu ve böylece yüksek sıcaklığın bitkiler üzerindeki zararlı etkilerini yatıştırarak bitkilerin $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında bile yaşamaya devam edebildiklerini söyleyebiliriz.

Karotenoidlerin, çeşitli bitki türlerini abiyotik ve biyotik streslerden koruduğu bilinmektedir. Örneğin, ksantofil, izopren ve bazı terpenoidler gibi karotenoidler, tilakoid membranların lipid fazını stabilize ederek ve fotokoruma sağladığı rapor edilmiştir (Camejo vd., 2006). Yapılan bir çalışmada β -karoten hidroksilazı (zeaksantin biyosentetik yolunda aktif olan bir enzim) kodlayan *chyB* genini aşırı ifade eden *Arabidopsis* bitkilerinin, artan sıcaklıklara daha fazla tolerans gösterdiği ve stresten korunmanın büyük olasılıkla, membranlarda oksidatif hasarın önlenmesinde zeaksantin etkisinden kaynaklandığı öne sürülmüştür. (Meiri vd. 2010). Mevcut çalışmamızda ise karotenoid seviyelerinin dört farklı sıcaklık uygulamaları arasında istatistiki olarak önemli bir farka

rastlanamamıştır. Dolayısıyla *H. thermophilum*'un yüksek sıcaklık toleransında karotenoid birikiminin etkin bir rol oynamadığını söyleyebiliriz.

Bitkilerdeki glioksalaz sistemin farklı fizyolojik rollere sahip olmasının yanı sıra abiyotik streslere karşı geliştirilen adaptasyon stratejilerinde önemli görevler yaptığı bilinmektedir (Hoque vd., 2016). Bitkilerde glioksalaz sistemin abiyotik stres toleransındaki yukarıda belirtilen rolünden dolayı çalışmamızda *H. thermophilum* bitkisinin çeşitli sıcaklık uygulamaları altında glioksalaz sistemin verdiği cevaplar da araştırılmıştır. Araştırmalarımız doğrultusunda glioksalaz I, glioksalaz II gibi glioksalaz sistem enzimlerinin aktivitesinde artış ile MG'nin toksik seviyenin altında tutulmaya çalışıldığı görülmüştür. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, Nahar vd. (2015) 24 ve 48 saat boyunca uyguladıkları atmosferik sıcaklıkta (42°C) *Vigna radiata* bitkilerinde glioksalaz I aktivitesinin arttığını, glioksalaz II enzim aktivitesinin ise azaldığını rapor etmişlerdir. Mostafa vd. (2014), çeltik fidelerinde 42°C (48 saat) atmosfer sıcaklığının glioksalaz I ve glioksalaz II aktivitesini önemli derecede arttırdığı bulmuşlardır. Birçok çalışmada, glioksilaz I ve II aktivitelerinin bitkileri stresten korumada önemli rol oynadığı ve yalnızca MG'nin detoksifiye edilmesiyle değil, aynı zamanda antioksidan sistemler gibi diğer savunma mekanizmalarıyla etkileşim içerisinde olduğu ortaya çıkarılmıştır (Mostofa vd., 2015). Böylece bu iki sistemin eş güdümlü olarak çalışması oksidatif strese karşı tolerans geliştirmek için gerekli olduğunu düşündürmektedir (Hasanuzzaman vd., 2012b). Çalışmamızda da bu iki sistemin etkileşim içerisinde olduğu açıkça ortaya koyulmuştur. Glioksalaz II aktivitesinin artışıyla SLG, D-Laktat ve GSH parçalanarak, çalışmamızdaki analizlerle uyumlu olarak glioksalaz II aktivitesinin, GR'nin tetiklemesinin yanı sıra içsel GSH içeriğini artırdığı tespit edilmiştir (Hasanuzzaman vd., 2011). Mevcut çalışmamızda, GSH aracılığı ile AsA-GSH döngüsüne katılan glioksalaz sisteminin, antioksidan sistemi tetikleyerek, oksidatif stres hasarlarını yatıştırmada etkili olabileceği açığa çıkarılmıştır.

Çalışmamızda *H. thermophilum*'un yüksek sıcaklığa toleransta ozmolit bileşiklerin rolü olabileceği hipotezini test etmek için prolin, glisin-betain, toplam çözünebilir şekerler gibi ozmolit bileşiklerdeki değişimleri belirleyen analizler yapılmıştır. Bitkilerde prolin, glisin betain, çözünebilir şekerler, şeker alkoller ve tersiyer ve kuarterner amonyum bileşikleri gibi ozmolitlerin birikimi de yüksek sıcaklık stresine karşı toleransta iyi bilinen savunma mekanizmalarından biridir (Sairam ve Tyagi, 2004; Wahid, 2007). Çalışmamızda artan sıcaklığın ozmolit birikiminde istatistiki açıdan önemli bir artışa sebebiyet verdiği görülmüştür. Literatürde aşırı yüksek sıcaklıklara maruz kalan bitkilerde ozmolit

bileşiklerin birikimi veya ozmotik düzenlemenin yapıldığı ifade edilmiştir (Sakamoto ve Murata, 2000). Şöyle ki prolin, glisin-betain ve çözünebilir şekerler, ozmotik aktiviteyi devam ettirerek, hücrel redoks potansiyelini tamponlayarak, membran kararlılığı sağlayarak veya hücre su dengesini devam ettirerek yüksek sıcaklıklardan bitkileri korurlar (Farooq vd., 2008).

Yüksek sıcaklık altında artan karbohidrat kullanılabilirliği de bitkilere yüksek sıcaklık stres toleransı ile ilgili önemli bir fizyolojik özellik kazandırabilir (Liu ve Huang, 2000). Diğer taraftan yüksek sıcaklığa cevaben mısır ve şeker kamışında yüksek seviyelerde glisin betain birikimi rapor edilirken, aksine, pirinç, hardal, Arabidopsis ve tütün gibi bitki türleri doğal olarak stres koşullarında glisin betain üretmediği rapor edilmiştir (Wahid ve Close, 2007). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre *H. thermophilum*'un prolin, glisin betain ve toplam çözünebilir şeker gibi ozmolit bileşikleri aşırı biriktirerek su durumunu kontrol altında tuttuğunu söyleyebiliriz.

Stres hormonu ABA'nın bitki savunma yanıtlarında anahtar rol oynadığı, biyotik ve abiyotik stresörlere karşı tolerans sağladığı bilinmektedir (Lee ve Luan, 2012). Bu sebeple çalışmamızda *H. thermophilum*' un aşırı yüksek sıcaklığa toleransının ABA birikimi ile ilişkisi olabileceği hipotezini test etmek için bitki yapraklarından ABA tayini yapılmış ve mevcut bulgularımızda ABA içeriğinin artan sıcaklığa paralel olarak bir artış gösterdiği bulunmuştur. Benzer olarak Musatenko vd. (2003) sıcaklık stresi altındaki mısır fidelerinde artan ABA'nın mısırdaki termotoleransı indüklediğini bulmuşlardır. Yapılan farklı bir çalışmada da ABA'nın 45°C (2 saat) atmosferik sıcaklık altındaki *Phragmites communis*'ta sentezlenme özelliği de yüksek sıcaklık toleransında önemli olduğu rapor edilmiştir (Ding vd., 2010). Yüksek sıcaklık toleransında ABA'nın rolünün antioksidan kapasiteyi uyararak, sıcak şok faktörlerini (HSF'ler) harekete geçirerek veya şeker metabolizması ve sinyal iletimi üzerinde etkili olarak sağlandığı ve böylece bitkilerin su durumunun korunduğu rapor edilmiştir (Islam vd., 2018). Üstelik ABA'nın stomaları kapatmaya teşvik ettiği (Tuteja, 2007) de göz önünde bulundurulduğunda, bulgularımızla uyumlu olarak, *H. thermophilum*' da aşırı yüksek sıcaklıkta artan ABA içeriğinin stoma açıklığını azaltarak, bitki su kaybının önüne geçmeye çalıştığını söyleyebiliriz.

Mevcut çalışmamızda *H. thermophilum*'un aşırı yüksek sıcaklığa toleransta moleküler mekanizmaları harekete geçirip geçirmediğini test için HSF'lerin ifade seviyelerine ve FeSOD, CAT, GPX, GR protein profillerine bakılmıştır. Stres proteinlerinin aşırı ifadesi, çevresel streslere tolerans kazanmak için önemli bir adaptasyon

olarak gösterilmektedir (Wahid ve Close, 2007). Sıcak şok proteinleri (HSP'ler) yüksek sıcaklık stresi ile fazlaca ilişkili olsalar da, diğer bazı proteinlerin karşılıklı etkileşimi de sıcaklık stresine cevapta rol oynayabilir. Sıcaklık stresinin ani ve kademeli değişimlerine maruz kalan bitkilerde HSP'lerin sentezi hızlanarak miktarlarında aşırı bir artış meydana gelmektedir (Nakamoto and Hiyama, 1999). Sıcak şok proteinlerinin yüksek sıcaklıkta uyarılması, hücre içi protein katlanmalarını engeller ve böylece protein denatürasyonlarını azaltırlar (Baniwal vd., 2004). HSP'leri kodlayan *HSF* genlerinin aşırı ifadesinin bitkileri ölümcül yüksek sıcaklıklardan koruduğu rapor edilmiştir (Scharf vd., 2012). Bu nedenle çalışmamızda da *H. thermophilum*'daki HSF'lerin aşırı ifadesinin yüksek sıcaklığa toleransta rol oynayabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla *H. thermophilum* bitkisinde transkriptom analizlerimiz sonucu tespit ettiğimiz HSF ailesine ait *HSFA4A 3*, *HSFA4A 10*, *HSFA3 2*, *HSFA3 6*, *HSF4 2* ve *HSF4 10* genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimler araştırılmıştır. Çalışmamızda dört farklı sıcaklık uygulamasına maruz kalan bitkilerden belirlenen *HSF* genlerine ait ifade seviyeleri genel olarak kontrol ($20\pm 5^\circ\text{C}$) grubu bitkileri ile kıyaslandığında diğer sıcaklık uygulaması yapılan bitki gruplarında artış görülmüştür. Bunlardan *HSFA4A 3*, *HSFA4A 10*, *HSFA3 2* ve *HSFA3 6* genlerinin ifade seviyelerinin $80\pm 5^\circ\text{C}$ 'de yetişen bitki gruplarında belirgin bir şekilde arttığı bulunmuştur. Diğer yandan *HSF4 2* ve *HSF4 10* genlerinin ifade seviyelerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında, diğer gruplar arasında belirgin bir farka rastlanmamıştır. Literatürdeki bu konudaki bazı çalışmalarda, belirli HSF'lerin sıcaklık toleransı için daha önemli olmasına rağmen, diğerlerinin (*HSP101*, *HSA32*, *HSFA1*, *HSFA3*) daha az rol oynadığını, bunların nakavt varyantların sıcaklığa toleransı üzerinde çok az etkisi olduğunu kanıtlanmıştır (Yoshida vd. 2011). Çalışmamızda *H. thermophilum* bitkisinin *HSF4 2* ve *HSF4 10* genlerinin $80\pm 5^\circ\text{C}$ toprak sıcaklığına toleransta daha az rol oynadığını söyleyebiliriz. Bu konuda yapılan bir çalışmada, 1 saat boyunca 45°C atmosfer sıcaklığına maruz kalmış transgenik domateste *SIHSFA1* transkripsiyon faktörünün termotolerans sağlamada önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Mishra vd., 2002). Ayrıca Arabidopsis ve domateste HSF'lerin, H_2O_2 gibi ROT artışlarını doğrudan algılayabildiğini ve oksidatif stres sırasında oksidatif strese cevaptan sorumlu genlerin ifadelerini kontrol edebilen moleküler sensörler olarak işlev görebileceğini ortaya çıkarmışlardır (Miller ve Mittler, 2006; Volkov vd., 2006). Çalışmamızda aşırı yüksek sıcaklıkta sıcak şok faktörlerinin ifade seviyelerinin aşırı artması *H. thermophilum*'da aşırı toprak sıcaklığına tolerans sağlamada etkili olduğu ve moleküler mekanizmaların da harekete geçirildiği söylenebilir.

Bitkilerin yüksek sıcaklığa toleransta etkili olabileceği düşünülen bir diğer moleküler mekanizma da antioksidan sisteme ait bazı enzimlerin (FeSOD, CAT, GPX, GR) protein profillerinin western blot yöntemi belirlenmesi olmuştur. Dolayısıyla farklı toprak sıcaklıklarında yaşayan *H. thermophilum*' da genel olarak 20 ± 5 °C' de yaşayan bitkiler ile kıyaslama yapıldığında FeSOD, CAT, GPX, GR protein miktarlarının sıcaklık uygulamaları ile arttığı bulunmuştur. FeSOD protein miktarının 80 ± 5 °C'de yaşayan bitki gruplarında daha fazla olduğu, GR protein miktarının da 60 ± 5 °C' 80 ± 5 °C'de yaşayan bitki gruplarında daha yüksek artış gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca kontrol (20 ± 5 °C) uygulamalarına göre sıcaklık arttıkça GPX ve CAT' a ait protein içeriklerinin de arttığı ancak bu artışın 40 ± 5 °C'de yaşayan bitkilerde daha fazla olduğu kaydedilmiştir. Elde edilen verilerden yüksek sıcaklık koşullarında antioksidanların protein içeriklerindeki değişimler ile antioksidan enzim aktiviteleri arasında bir paralellik olduğu anlaşılmış olup, yüksek sıcaklığa toleransta *H. thermophilum*'un antioksidan savunma sistemini etkili bir şekilde uyardığı da bu analizlerle desteklenmiştir.

Sonuç olarak, mevcut tez çalışması ile endemik ve termofil *H. thermophilum*'un aşırı yüksek sıcaklığa karşı geliştirdiği tolerans mekanizması morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde ayrıntılı bir şekilde aydınlatılmaya çalışılmıştır. *H. thermophilum*'un maruz kaldığı dört farklı toprak sıcaklığında (20 ± 5 , 40 ± 5 , 60 ± 5 , 80 ± 5 °C) büyüme ve gelişimleri incelenerek, 80 ± 5 °C'de dahil bütün toprak sıcaklıklarında bitkilerin büyüme ve gelişmelerini devam ettirdiği gözlenmiştir. Aşırı yüksek sıcaklıkta (80 ± 5 °C) büyüme ve gelişim gösteren bitki yapraklarında herhangi bir sıcaklık stresi hasarı; senesens, yapraklarda pigment kaybı gibi değişimlere rastlanılmamıştır. Ayrıca bitkilerde kademeli olarak artırılan sıcaklık stresi *H. thermophilum*'un yaprak hücrelerinde MDA, H_2O_2 , O_2^- ve MG gibi reaktif bileşiklerde istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olmayarak, hafif stres ile karşılaştığını söyleyebiliriz. Dolayısıyla bitkinin doğal yayılış gösterdiği 60 ± 5 °C' den daha fazla toprak sıcaklığında (80 ± 5 °C) bile yaşayabildiği ve sıcaklığa oldukça toleranslı bir bitki olduğu anlaşılmıştır. Aşırı yüksek sıcaklıkta (80 ± 5 °C) yaşayan *H. thermophilum*'un düşük hasarın antioksidan sistem enzim ve bileşiklerinin, gliksalaz sistem enzimlerinin reaktif bileşikleri süpürme etkinliklerinin katkısı ile olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca *H. thermophilum*'un aşırı yüksek sıcaklık altında prolin, glisin-betain ve toplam çözünebilir şekerler gibi ozmolit bileşiklerdeki aşırı artış osmoregülasyonu uyararak, hücresel redoks potansiyelini tamponlayarak, membran kararlılığı sağlayarak ve hücre su dengesini devam ettirerek yüksek sıcaklıktan korunmaya

yardımcı olabilecekleri belirlenmiştir. Aynı zamanda yüksek sıcaklık koşullarındaki *H. thermophilum*'un yüksek sıcaklığa toleransta içsel ABA birikimini uyarmasıyla stoma açıklığını kontrol edebileceği ve böylece su durumunun korunmasına da katkı sağlayabileceğini de söylenebilir. Son olarak da *H. thermophilum*'un yüksek HSF'lerin ifade seviyelerini önemli derecede yükselterek bitkilerde termotolerans gelişime katkı verebileceği de tespit edilmiştir.

Elde edilen bütün bulgular gözönüne alındığında mevcut çalışma ile laboratuvar koşullarında yetiştirilen *H. thermophilum*'un antioksidan ve glioksalaz sistemi uyararak, ABA sentezini, HSF'lerin ifade seviyelerini ve ozmolit birikimini önemli derecede artırarak aşırı toprak sıcaklığına ($80\pm 5^{\circ}\text{C}$) tolerans gösterebilen termofil bir bitki olduğu sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇLAR

1. *H. thermophilum*'un laboratuvar koşullarında aşırı yüksek sıcaklığın ($80\pm 5^{\circ}\text{C}$) da dahil olduğu diğer toprak sıcaklıklarında ($20\pm 5^{\circ}\text{C}$, $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $60\pm 5^{\circ}\text{C}$) hayatını devam ettirdiği bulundu.
2. Kontrol ($20\pm 5^{\circ}\text{C}$) grubuna göre yüksek sıcaklıklardaki ($40\pm 5^{\circ}\text{C}$, $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $80\pm 5^{\circ}\text{C}$) *H. thermophilum*'da artan toprak sıcaklığına bağlı olarak herhangi bir deformasyon, bitki yapraklarında senesens ve pigment kaybı gibi değişimlere rastlanmadı.
3. Kontrol ($20\pm 5^{\circ}\text{C}$) grubu ile kıyaslandığında artan toprak sıcaklıklarında (40 , 60 , $80\pm 5^{\circ}\text{C}$) yetişen bitkilerin kök uzunluğunun azaldığı ve kök uzunluğunun, sürgün uzunluğundan daha fazla etkilendiği bulundu.
4. Büyüme ve gelişime bağlı olarak aşırı yüksek toprak sıcaklığındaki ($80\pm 5^{\circ}\text{C}$) *H. thermophilum*'un sürgün taze ve kuru ağırlık miktarlarında düşüş bulundu.
5. Kademeli olarak artırılan toprak sıcaklık stresinin *H. thermophilum*'un yaprak hücrelerinde MDA, H_2O_2 , O_2^- ve MG gibi reaktif bileşiklerinin seviyesinde belirgin bir artışa neden olmadığı belirlendi.
6. Dört farklı toprak sıcaklığı uygulaması yapılmış bitki gruplarında en düşük yaprak su potansiyeli ve stoma iletkenliğinin aşırı yüksek toprak sıcaklık ($80\pm 5^{\circ}\text{C}$) uygulaması yapılmış bitkilerde ölçüldü.
7. *H. thermophilum*'un doğal yayılış gösterdiği $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ 'den daha yüksek toprak sıcaklığında ($80\pm 5^{\circ}\text{C}$) bile yaşayabildiği ve sıcaklığa oldukça toleranslı bir bitki olduğu açığa çıkarıldı
8. *H. thermophilum*'un antioksidan ve glioksalaz sistem kapasitesini artırarak yüksek toprak sıcaklıklarına (40 , 60 , $80\pm 5^{\circ}\text{C}$) tolerans sağladığı bulundu.
9. *H. thermophilum*'un prolin, glisin betain ve toplam çözünebilir şeker gibi ozmolit bileşiklerin birikimini artırarak yüksek toprak sıcaklıklarına (40 , 60 , $80\pm 5^{\circ}\text{C}$) tolerans sağladığı bulundu.
10. *H. thermophilum*'un ABA içeriğini artırarak yüksek toprak sıcaklıklarına (40 , 60 , $80\pm 5^{\circ}\text{C}$) tolerans sağladığı bulundu.

11. *H. thermophilum*'un *HSFA4A*, *HSFA3* ve *HSF4* gen ifadelerini, FeSOD, CAT, GPX ve GR protein içeriklerini artırarak yüksek toprak sıcaklığına tolerans sağlamada moleküler mekanizmaların etkili olduğu açığa çıkarıldı.
12. Laboratuvar koşullarında yetiştirilen *H. thermophilum*'un antioksidan ve glioksalaz sistemi uyararak, ABA sentezini, HSF'lerin ifade seviyelerini ve ozmolit birikimini önemli derecede artırarak aşırı toprak sıcaklığına ($80\pm 5^{\circ}\text{C}$) tolerans gösterebilen termofil bir bitki olduğu bulundu.



6. ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının bulgularından yola çıkarak, aşırı yüksek toprak sıcaklığında ($80\pm 5^{\circ}\text{C}$) yaşayan *H. thermophilum*'un antioksidan ve glioksalaz kapasiteyi, ozmolit birikimini, ABA biyosentezini arttırarak, HSF'lerin ekspresyonlarındaki ciddi bir artışa neden olarak aşırı yüksek toprak sıcaklığında bile ($80\pm 5^{\circ}\text{C}$) hayatta kalabildiği kanaatine varılmıştır. Mevcut çalışma yüksek toprak sıcaklığındaki *H. thermophilum*'un literatürle uyumlu olarak, artan içsel ABA ile antioksidan sistemi, ozmolit birikimini ve HSF'lerin ifade seviyesini uyararak yüksek sıcaklığa tolerans sağlayabileceği fikrini akla getirmektedir. Ancak bu fikirde kesinliğe ulaşabilmek için bir takım çalışmalar önerilmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda, absisik asitin biyosentezinden sorumlu sentez ve yıkım enzimlerinin gen ifade düzeyleri için uygun primerler tasarlanarak, qRT-PCR ile genlerin ifade düzeylerine bakılabilir. Ayrıca antioksidan sistem ve ozmolit biyosentezi ile ilişkili genlerin ifade seviyelerine bakılması da, ABA'nın aşırı yüksek sıcaklığa toleranstaki etkin rolünü ortaya koymak için yararlı olacaktır. Diğer taraftan sıcaklıktan sorumlu farklı proteinleri kodlayan genlerin ifade düzeylerine bakılması da düşünülebilir.

Son olarak da $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ toprak sıcaklığında yetiştirilen *H. thermophilum*'un toplam genom analizi önerilerek sıcaklığa tolerans ile ilişkili genler belirlenerek patentlemeler yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Adams, S.R., Cockshull, K.E. ve Cave, C.R.J., 2001. Effect of Temperature on the Growth and Development of Tomato Fruits, Annals of Botany, 88, 869-877.
- Aebi, H.E., 1983. Catalase. Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer, H.U., Editör, Verlag Chemie, Weinheim. 273-286,
- Ahamed, K.U., Nahar, K., Fujita, M. ve Hasanuzzaman, M., 2010. Variation in Plant Growth, Tiller Dynamics and Yield Components of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Due to High Temperature Stress, Advanced Agriculture Botany, 2, 213-224.
- Al-Busaidi, A., Ahmed, M. ve Chikara, J., 2012. The Impact of Heat and Water Stress Conditions on the Growth of the Biofuel Plant *Jatropha curcas*, International Journal of Environmental Studies, 69, 273-288.
- Allakhverdiev, S.I., Kreslavski, V.D., Klimov, V.V., Los, D.A., Carpentier, R. ve Mohanty P., 2008. Heat stress: An Overview of Molecular Responses in Photosynthesis, Photosynthesis Research, 98, 541-550.
- Almeselmani, M., Deshmukh, P.S., Sairam, R.K., Kushwaha, S.R. ve Singh, T.P., 2006. Protective Role of Antioxidant Enzymes under High Temperature Stress, Plant Science, 171, 382-388.
- Almeselmani, M., Deshmukh, P. S. ve Sairam, R. K., 2009. High Temperature Stress Tolerance in Wheat Genotypes: Role of Antioxidant Defence Enzymes, Acta Agronomica Hungarica, 57, 1-14.
- Al-Rawahy, M. S., Al-Rawahy, S. A., Al-Mulla, Y. A. ve Nadaf, S. K., 2019. Effect of Cooling Root-Zone Temperature on Growth, Yield and Nutrient Uptake in Cucumber Grown in Hydroponic System During Summer Season in Cooled Greenhouse, Journal of Agricultural Science, 11, 47-60.
- Altuntaş, C., Sezgin, A., Demiralay, M., Terzi, R., Sağlam, A. ve Kadioğlu, A., 2019. Application of Sucrose Modulates, the Expressions of Genes Involved in Proline and Polyamine Metabolism in Maize Seedlings Exposed to Drought, Biologia Plantarum, 63, 247-252.
- Amirjani, M., 2012. Estimation of Wheat Responses to "High" Heat Stress, American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 6, 222-233.
- Anjum, S., Xie, X., Wang, L., Saleem, M., Man, C. ve Lei, W., 2011. Morphological, Physiological and Biochemical Responses of Plants to Drought Stress, African Journal of Agricultural Research, 6, 2026-2032.
- Anon, S., Fernandez, J.A., Franco, J.A., Torrecillas, A., Alarcon, J.J. ve Sanchez-Blanco, M.J., 2004. Effects of Water Stress and Night Temperature Preconditioning on Water Relations and Morphological and Anatomical Changes of *Lotus creticus* plants, Scientia Horticulturae, 101, 333-342.
- Apel, K. ve Hirt, H., 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress and Signal Transduction, Annual Review of Plant Biology, 55, 373-399.
- Arnon, D. I., 1949. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, Plant Physiology, 24, 1-15.

- Asada, K., Kiso, K. ve Yoshikawa, K., 1974. Univalent Reduction of Molecular Oxygen by Spinach Chloroplasts on Illumination, Journal of Biological Chemistry, 249, 2175-2181.
- Ashraf, M. ve Hafeez, M., 2004. Thermotolerance of Pearl Millet and Maize at Early Growth Stages: Growth and Nutrient Relations, Biologia Plantarum, 48, 81–86.
- Ashraf, M. ve Foolad, M.R., 2007. Roles of Glycine Betaine and Proline in Improving Plant Abiotic Stress Resistance, Environmental and Experimental Botany, 59, 206-216.
- Attia, Y. A., Hussein, A. S., Tag El-Din, A. E., Qota, E. M., Abed El-Ghany, A. I. ve El-Sudany, A. M., 2009. Improving Productive and Reproductive Performance of Dual-Purpose Crossbred Hens in the Tropics by Lecithin Supplementation, Tropical Animal Health and Production, 41, 461-475.
- Awal, M.A., Ikede, T. ve Iton, R., 2003. The Effect of Soil Temperature on Source/Sink Economy in Peanut (*Arachis hypogaea*), Environmental and Experimental Botany, 50, 41-50.
- Balla, K., Bencze, S., Janda, T. ve Veisz, O., 2009. Analysis of Heat Stress Tolerance in Winter Wheat, Acta Agronomica Hungarica, 57, 437-444.
- Baniwal, S. K., Bharti, K., Chan, K. Y., Fauth, M., Ganguli, A., Kotak, S.K., Mishra, L., Nover, M., Port, K., Scharf, L., Tripp, C., Weber, D. ve Zielinski, P., 2004. Heat Stress Response in Plants: A Complex Game with Chaperones and More Than Twenty Heat Stress Transcription Factors, Journal of Bioscience, 29, 471-487.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. ve Teare, I.D., 1973. Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies, Plant and Soil, 39, 205-207.
- Beauchamp, C. ve Fridovich, I., 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and An Assay Applicable to Acrylamide Gels, Analytical Biochemistry, 44, 276-287.
- Bitá, C. E. ve Gerats, T., 2013. Plant Tolerance to High temperature in A Changing Environment, Scientific Fundamentals and Production of Heat Stress-Tolerant Crops, Frontiers in Plant Science, 4, 1-18.
- Blokhina, O., Eija, V. ve Kurt, V.F., 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review, Annals of Botany, 91, 179-194.
- Bowler, C., Vanmontagu, B. ve Inze, D., 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43, 83-116.
- Bradford, M. M., 1976. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
- Camejo, D., Jiménez, A., Alarcón, J. J., Torres, W., Gómez, J. M. ve Sevilla, F., 2006. Changes in Photosynthetic Parameters and Antioxidant Activities Following Heat-Shock Treatment in Tomato Plants, Functional Plant Biology, 33, 177-187.
- Chakraborty, U. ve Pradhan, D., 2011. High Temperature-Induced Oxidative Stress in *Lens culinaris*, Role of Antioxidants and Amelioration of Stress by Chemical Pre-Treatments, Journal of Plant Interactions, 6, 43-52.

- Ciura, J. ve Kruk, J., 2018. Phytohormones as Targets for Improving Plant Productivity and Stress Tolerance, Journal of Plant Physiology, 229, 32-40.
- Cohen, Y., Moreshet, S. ve Fuchs, M., 1987. Changes in Hydraulic Conductance of Citrus Trees Following A Reduction in Wetted Soil Volume, Plant Cell and Environment, 10, 53-57.
- Conde, A., Chaves, M.M. ve Geros, H., 2011. Membrane Transport, Sensing and Signaling in Plant Adaptation to Environmental Stress, Plant and Cell Physiology, 52, 1583-1602.
- Das, K. ve Roychoudhury, A., 2014. Reactive Oxygen Species (ROS) and Response of Antioxidants as ROS-Scavengers during Environmental Stress in Plants, Frontiers in Environmental Science, 2, 1-13.
- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J.A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F.M. ve Bolwell, G.P., 2012. The Apoplastic Oxidative Burst Peroxidase in Arabidopsis is A Major Component of Pattern-Triggered Immunity, Plant Cell, 24, 275-287.
- Ding, W., Song, L., Wang, X. Bi, Y., 2010. Effect of Abscisic Acid on Heat Stress Tolerance in the Calli from Two Ecotypes of *Phragmites communis*, Biologia Plantarum, 54, 607-613.
- Ding, S., Wang, L., Yang, Z., Lu, Q., Wen, X. ve Lu, C., 2016. Decreased Glutathione Reductase2 Leads to Early Leaf Senescence in *Arabidopsis*, Journal of Integrative Plant Biology, 58, 29-47.
- Dixit, V., Pandey, V. ve Shyam, R., 2001. Differential Antioxidative Responses to Cadmium in Roots and Leaves of Pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad), Journal of Experimental Botany, 358, 1101-1109.
- Du, Y.C. ve Tachibana, S., 1994. Photosynthesis, Photosynthate Translocation and Metabolism in Cucumber Roots Held at Supraoptimal Temperature, Engei Gakkai Zasshi, 63, 401-408.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. ve Smith, F., 1956. Calorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, Analytical Chemistry, 28, 350-356.
- Eltayeb, M. M., Hassn, A. B., Sulieman, M. A. ve Babiker, E. E., 2007. Effect of Processing Followed by Fermentation on Antinutritional Factors Content of Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* L.) Cultivars, Pakistan Journal of Nutrition, 5, 463-467.
- Ergin, S., Kesici, M. ve Gülen, H., 2012. Changes in H₂O₂ and Peroxidase Activities in Strawberry Plants under Heat Stress, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 16, 25-35.
- Fahad, S., Nie. L., Chen, Y., Wu, C., Xiong, D., Saud, S., Hongyan, L., Cui, K. ve Huang, J., 2015. Crop Plant Hormones and Environmental Stress, Sustain Agriculture Reviews, 15, 371-400.
- Farooq, M., Basra, S., Wahid, A., Cheema, Z., Cheema, M. ve Khaliq, A., 2008. Physiological Role of Exogenously Applied Glycine Betaine to Improve Drought Tolerance in Fine Grain Aromatic Rice (*Oryza sativa* L.), Journal of Agronomy and Crop Science, 194, 325-333.

- Fitter, A.H. ve Hay, R. K. M., *Environmental Physiology of Plants*, 3. Basım, Academic Press, London, Amerika, 2002.
- Foyer, C.H. ve Halliwell, B., 1976. Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplast: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism, Planta, 133, 21-25.
- Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F. ve Scott, I. M., 1997. Hydrogen Peroxide- and Glutathione-Associated Mechanisms of Acclimatory Stress Tolerance and Signalling, Physiologia Plantarum, 100, 241-254.
- Fragkostefanakis, S., Röth, S., Schleiff, E. ve Scharf, K. D., 2015. Prospects of Engineering Thermotolerance in Crops Through Modulation of Heat Stress Transcription Factor and Heat Shock Protein Networks, Plant Cell and Environment, 38, 1881-1895.
- Frahry, G. ve Schopfer, P., 2001. NADH-Stimulated, Cyanide-Resistant Superoxide Production in Maize Coleoptiles Analyzed with a Tetrazolium-Based Assay, Planta, 212, 175-183.
- Fu, J. ve Huang, B., 2001. Involvement of Antioxidants and Lipid Peroxidation in the Adaptation of Two Cool-Season Grasses to Localized Drought Stress, Environmental and Experimental Botany, 45, 105-114.
- Giaveno, C. ve 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, 89-94.
- Goren, A. C. , Tumen, G., Celik, A. ve Çıkrıkçı, S., 2008. Fatty Acid Composition of Heliotropium Species (Boraginaceae): A First Chemical Report on The New Species *H. thermophilum*, Natural Product Communications, 3, 1731-1733.
- Grabowska, A., Sekara, A., Bieniasz, M., Kunicki, E. ve Kalisz, A., 2013. Dark-chilling of Seedlings Affects Initiation and Morphology of Broccoli Inflorescence, Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj- Napoca, 41, 213-218.
- Grieve, C.M. ve Grattan, S.R., 1983. Rapid Assay for the Determination of Water Soluble Quaternary Ammonium Compounds, Plant and Soil, 70, 303-307.
- Guo, M., Lu, J.P., Zhai, Y.F., Chai, W.G., Gong, Z.H. ve Lu, M.H., 2015. Genome-Wide Analysis, Expression Profile of Heat Shock Factor Gene Family (*CaHsfs*) and Characterisation of *CaHsfA2* in Pepper (*Capsicum annuum* L.), BMC Plant Biology, 15, 151-171
- Gülen, H. ve Eris, A., 2004. Effect of Heat Stress on Peroxidase Activity and Total Protein Content in Strawberry Plants, Plant Science, 166, 739-744.
- Gür, A., Demirel, U., Özden, M., Kahraman, A. ve 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, 1008-1015.
- Haber, F. ve Weiss, J., 1934. The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts, Proceeding of Royal Society, 147, 332-351.
- Hale, M. G. ve Orcutt, D. M., *The Physiology of Under Stress*, John Wiley and Sons, Inc., New York, USA, 1987.

- Hall, A. E., 1992. Breeding for Heat Tolerance, Plant Breeding Reviews, 10, 129– 168.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, M.C.,. Free Radical and Other Reactive Species and Disease, 5. Basım, 639-646, Oxford University Press, Oxford, 1999.
- Harbinson, J. ve Hedley, C.L., 1993. Changes in P-700 Oxidation during the Early Stages of the Induction of Photosynthesis, Plant Physiology, 103, 649-660.
- Hare, P.D., Cress, W.A. ve Van Staden, J., 1998. Dissecting the Roles of Osmolyte Accumulation during Stress, Plant Cell and Environment, 21, 535–553.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A. ve Fujita, M., 2011a. Nitric Oxide Modulates Antioxidant Defense and the Methylglyoxal Detoxification System and Reduces Salinity-Induced Damage of Wheat Seedlings, Plant Biotechnology Reports, 5, 353–365.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A. ve Fujita, M., 2012a. Exogenous Selenium Pretreatment Protects Rapeseed Seedlings from Cadmium-Induced Oxidative Stress by Up-Regulating the Antioxidant Defense and Methylglyoxal Detoxification Systems, Biological Trace Element Research, 149, 248-261.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., Teixeira da Silva J.A. ve Fujita, M., 2012b. Plant Responses and Tolerance to Abiotic Oxidative Stress: Antioxidant Defenses is a Key Factors, Crop Stress and its Management: Perspectives and strategies, Bandi, V., Shanker, A.K., Shanker, C. ve Mandapaka, M., Editörler, Springer, Berlin, 261-316.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A. ve Fujita, M., 2012c. Exogenous Selenium Pretreatment Protects Rapeseed Seedlings from Cadmium-Induced Oxidative Stress by Up-Regulating Antioxidant Defense and Methylglyoxal Detoxification Systems, Biological Trace Element Research, 149, 248-261.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R. ve Fujita, M., 2013. Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants, International Journal of Molecular Sciences, 14, 9643-9684.
- Heath, R.L. ve Packer, L., 1968. Photoperoxidation in Isolated Chloroplast. I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation, Archives of Biochemistry and Biophysics, 125, 189-98.
- Hollander-Czytko, H., Grabowski, J., Sandorf, I., Weckermann, K. ve Weiler, E.W., 2005. Tocopherol Content and Activities of Tyrosine Aminotransferase and Cystine Lyase in *Arabidopsis* under Stress Conditions, Journal of Plant Physiology, 162, 767-70.
- Hoque, T.S, Hossain, M.A, Mostofa, M.G, Burritt, D.J, Fujita, M. ve Tran, L., 2016. Methylglyoxal: An Emerging Signaling Molecule in Plant Abiotic Stress Responses and Tolerance, Frontiers in Plant Science, 7, 1-11.
- Hossain, M.A. ve Asada, K., 1984. Purification of Dehydroascorbate Reductase from Spinach and Its Characterization as a Thiol Enzyme, Plant and Cell Physiology, 25, 85-92.
- Hossain, M.A., Nakano, Y. ve Asada, K., 1984. Monodehydroascorbate Reductase in Spinach Chloroplasts and Its Participation in Regeneration of Ascorbate for Scavenging Hydrogen Peroxide, Plant and Cell Physiology, 25, 385-395.

- Islam, M. R., Baohuaa, F., Tingtinga, C., Weimenga, F., Caixiaa, Z., Longxinga, T. ve Guanfua, F., 2018. Abscisic Acid Prevents Pollen Abortion under High Temperature Stress by Mediating Sugar Metabolism in Rice Spikelets, Physiologia Plantarum, 165, 644-663.
- Jiménez, A., Hernández, J. A., Pastori, G., Río, L. A. ve Sevilla, F., 1998. Role of the Ascorbate–Glutathione Cycle of Mitochondria and Peroxisomes in The Senescence of Pea Leaves, Plant Physiology, 118, 1327-1335.
- Kadioğlu, A., 2011. Bitki Fizyolojisi, ISBN: 978-605-4361-06-9, Beşinci Baskı, Gündüz Ofset Matbaacılık, Trabzon.
- Karuppanapandian, T., Moon, J.C., Kim, C., Manoharan, K ve Kim, W., 2011. Reactive Oxygen Species in Plants: Their Generation, Signal Transduction, and Scavenging Mechanisms, Australian Journal of Crop Science, 5, 709-725.
- Kaur, C., Singla-Pareek, S.L. ve Sopory, S., 2014. Glyoxalase and Methylglyoxal as Biomarkers for Plant Stress Tolerance, Critical Reviews in Plant Science, 33, 429-456.
- Kavi Kishore, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P. ve Sreenivasulu, N., 2005. Regulation of Proline Biosynthesis, Degradation, Uptake and Transport in Higher Plants: Its Implications in Plant Growth and Abiotic Stress Tolerance, Current Science, 88, 424–438.
- Khan, A.S. ve Singh, Z., 2008. 1-Methylcyclopropene Application and Modified Atmosphere Packaging Affect Ethylene Biosynthesis, Fruit Softening, and Quality of ‘Tegan Blue’ Japanese Plum during Cold Storage, Journal American Society of Horticultural Science, 133, 290–299.
- Khan, N.A. ve Singh, S., Abiotic Stress and Plant Responses, 205-215, IK International, New Delhi, 2008.
- Kim, F. J., Kim, H.P., Hah, Y. C. ve Roe, J. H. 1996. Differential Expression of Superoxide Dismutases Containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*, European Journal of Biochemistry, 241, 178-185.
- Kim, T.H., Bohmer, M., Hu, H.H., Nishimura, N. ve Schroeder, J.I., 2010. Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling, Annual Review of Plant Biology, 61, 561-591.
- Konar, S., 2016. *Heliotropium thermophilum* Bitkisinde Sıcaklığın Fotosentez Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Estitüsü, Trabzon.
- Krieger-Liszkay, A., 2005. Singlet Oxygen Production in Photosynthesis, Journal of Experimental Botany, 56, 337–346.
- Krieger-Liszkay, A. Fufezan, C. ve Trebst, A., 2008. Singlet Oxygen Production in Photosystem II and Related Protection Mechanism, Photosynthesis Research, 98, 551–564.
- Kumar, S., Gupta, D. ve Nayyar, H., 2012. Comparative Response of Maize and Rice Genotypes to Heat Stress: Status of Oxidative Stress and Antioxidants, Acta Physiologia Plantarum, 34, 75-86.

- Kumar, R., Tamboli, V., Sharma, R. ve Sreelakshmi, Y., 2018. *NAC-NOR* Mutations in Tomato Penjar Accessions Attenuate Multiple Metabolic Processes and Prolong The Fruit Shelf Life, Food Chemistry, 259, 234-244.
- Lange, P.J., 2014. A Revision of The New Zealand *Kunzea ericoides* (Myrtaceae) Complex, Phytokeys, 40, 1-185.
- Lang-Mladek, C., Popova, O., Kiok, K., Berlinger, M., Rakic, B., Aufsatz, W., Jonak, C., Hauser, M.T. ve Luschnig, C., 2010. Transgenerational Inheritance and Resetting of Stress-Induced Loss of Epigenetic Gene Silencing in *Arabidopsis*, Molecular Plant, 3, 594-602.
- Lata, C. ve Prasad, M., 2011. Role of DREBs in Regulation of Abiotic Stress Responses in Plants, Journal of Experimental Botany, 62, 4731-4748.
- Lee, S.C. ve Luan, S., 2012. ABA Signal Transduction at the Crossroad of Biotic and Abiotic Stress Responses, Plant Cell and Environment, 35, 53-60.
- Leisinger, U., Rufenacht, K., Fischer, B., Pesaro, M., Spengler, A., Zehnder, A.J.B. ve Eggen, R.I.L., 2001. The Glutathione Peroxidase Homologous Gene from *Chlamydomonas reinhardtii* is Transcriptionally Upregulated by Singlet Oxygen, Plant Molecular Biology, 46, 395-408.
- Li, Z. G., Yang, S. Z., Long, W. B., Yang, G. X. ve Shen, Z. Z., 2013. Hydrogen Sulfide may be a Novel Downstream Signal Molecule in Nitric Oxide-Induced Heat Tolerance of Maize (*Zea mays* L.) Seedlings, Plant Cell and Environment, 36, 1564-1572.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes, Methods in Enzymology, 148, 350-382.
- Lin, K.H., Huang, H.C. ve Lin, C.Y., 2010. Cloning, Expression and Physiological Analysis of Broccoli Catalase Gene and Chinese Cabbage Ascorbate Peroxidase Gene under Heat Stress, Plant Cell Reports, 29, 575-593.
- Liso, R., Calabrese, G., Bitonti, M. B. ve Arrigoni, O., 1984. Relationship Between Ascorbic Acid and Cell Division, Experimental Cell Research, 150, 314-320.
- Liu, X. ve Huang, B., 2000. Carbohydrate Accumulation in Relation to Heat Stress Tolerance in Two Creeping Bentgrass Cultivars, Journal of American Society of Horticulture Science, 125, 442-447.
- Machado, S. ve Paulsen, G.M., 2001. Combined Effects of Drought and High Temperature on Water Relations of Wheat and Sorghum, Plant and Soil, 233, 179-187.
- Mazorra, L.M. Núñez, M., Hechavarria, M., Coll, F. ve Sánchez-Blanco, M.J. 2002. Influence of Brassinosteroids on Antioxidant Enzymes Activity in Tomato under Different Temperatures, Biologia Plantarum, 45, 593-596.
- Mehler, A.H., 1951. Studies on Reactivities of Illuminated Chloroplasts. I. Mechanism of the Reduction of Oxygen and Other Hill Reagents, Archives Biochemistry and Biophysics, 33, 65-77.
- Meiri, D., Tazat, K., Cohen-Peer, R., Farchi-Pisanty, O., Aviezer-Hagai, K., Avni, A. ve Breiman, A., 2010. Involvement of *Arabidopsis ROF2 (FKBP65)* in Thermotolerance, Plant Molecular Biology, 72, 191-203.

- Meng, G., Jin-Hong, L., Xio, M., De-Xu, L., Zheng-Hui, G. ve Ming-Hui, L., 2016. The Plant Heat Stress Transcription Factors (HSFs): Structure, Regulation, and Function in Response to Abiotic Stresses, Frontiers in Plant Science, 7, 114-127.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Breusegem, F.V. ve Noctor, G., 2010. Catalase Function in Plants: a Focus on Arabidopsis Mutants as Stress-Mimic Models, Journal of Experimental Botany, 61, 4197-4220.
- Millar, A.H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J.L., Bartoli, C.G., Frederica, L., Theodoulou, F.L. ve Foyer, C.H., 2003. Control of Ascorbate Synthesis by Respiration and Its Implication for Stress Responses, Plant Physiology, 133, 443-447.
- Miller, G. ve Mittler, R., 2006. Could Heat Shock Transcription Factors Function as Hydrogen Peroxide Sensors in Plants? Annals of Botany, 98, 279-88.
- Mishra, S. K., Tripp, J., Winkelhaus, S., Tschiersch, B., Theres, K., Nover, L. ve Scharf, K.D., 2002. In the Complex Family of Heat Stress Transcription Factors, *HsfA1* Has a Unique Role as Master Regulator of Thermotolerance in Tomato, Genes and Development, 16, 1555-1567.
- Mittler, R. ve Zilinkas, B.A., 1991. Purification and Characterization of Pea Cytosolic Ascorbate Peroxidase, Plant Physiology, 97, 962-968.
- Mittler, R., 2002. Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance, Trends Plant Science, 7, 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. ve Van Breusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants, Trends in Plant Science, 9, 490-498.
- Morales, D., Rodriguez, P., Dell'amico, J., Nicolas, E., Torrecillas, A. ve Sanchez- Blanco, M. J., 2003. High-Temperature Preconditioning and Thermal Shock Imposition Affects Water Relations, Gas Exchange and Root Hydraulic Conductivity in Tomato, Biologia Plantarum. 47, 203-208.
- Mostofa, M.G., Hossain, M.A. ve Fujita, M., 2015a. Trehalose Pretreatment Induces Salt Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings: Oxidative Damage and Co-Induction of Antioxidant Defense and Glyoxalase Systems, Protoplasma, 252, 461–475.
- Mostofa, M.G., Hossain, M.A., Fujita, M. ve Tran, L.S., 2015b. Physiological and Biochemical Mechanisms Associated with Trehalose-Induced Copper-Stress Tolerance in Rice, Scientific Report, 5, 1-16. 11433.
- Mostofa, M.G., Saegusa, D., Fujita, M. ve Tran, L., 2015c. Hydrogen Sulfide Regulates Salt Tolerance in Rice by Maintaining Na(+)/K(+) Balance, Mineral Homeostasis and Oxidative Metabolism under Excessive Salt Stress, Frontiers in Plant Science, 6, 1055-1069.
- Mostofa, M. G., Yoshida N. ve Fujita, M. 2014. Spermidine Pretreatment Enhances Heat Tolerance in Rice Seedlings Through Modulating Antioxidative and Glyoxalase Systems, Plant Growth Regulation, 73, 31–44.
- Mostofa, M. G., Ghosh, A., Li Z. G. Siddiquia,N., Fujita, M. ve Phan-Trane, L. S., 2018. Methylglyoxal: A Signaling Molecule in Plant Abiotic Stress Responses, Free Radical Biology and Medicine, 122, 96–109.

- Musatenko, L. I., Vedenicheva, N. P., Vasyuk, V.A., Generalova, V. N., Martyn, G. I. ve Sytnik, K. M., 2003. Phytohormones in Seedlings of Maize Hybrids Differing in Their Tolerance to High Temperatures, Russian Journal of Plant Physiology, 50, 444-448.
- Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Alam, M. M. ve Fujita, M., 2015. Roles of Exogenous Glutathione in Antioxidant Defense System and Methylglyoxal Detoxification during Salt Stress in Mung Bean, Biologia Plantarum, 59, 745-756.
- Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Alam, M.M., Rahman, A., Al-Mahmud, J., Suzuki, T. ve Fujita, M., 2017. Insights into Spermine-Induced Combined High Temperature and Drought Tolerance in Mung Bean: Osmoregulation and Roles of Antioxidant and Glyoxalase System, Protoplasma, 254, 445-460
- Nakamoto, H. ve Hiyama, T., 1999. Heat-Shock Proteins and Temperature Stress, Handbook of Plant and Crop Stress, Pessarakli, M., Editörler, 2. Basım, 17. Bölüm, Marcel Dekker, Inc, New York.
- Nakano, Y. ve Asada, Y., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, Plant and Cell Physiology, 22, 867-880.
- Nakashima, K., Ito, Y. ve Yamaguchi-Shinozaki, K., 2009. Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in Arabidopsis and Grasses, Plant Physiology, 149, 88-95.
- Noctor, G. ve Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49, 249-279.
- Noctor, G., Reichheld, J.P. ve Foyer, C.H., 2018. ROS-Related Redox Regulation and Signaling in Plants, Seminars in Cell Developmental Biology, 8, 3-12.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K. ve Tran, L.P., 2014. Response of Plants to Water Stress, Frontier in Plant Science, 5, 86-94.
- Öztürk, K., 2018. Termofil *Heliotropium thermophilum* Bitkisinin Laboratuvar Koşullarına Adaptasyonunun Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Padurariu, A., Horovitz, C.T., Paltineanu, R. ve Negomireanu, V., 1969. On the Relationship Between Soil Moisture and Osmotic Potential in Maize and Sugar Beet Plants, Physiologia Plantarum, 22, 850-860.
- Peet, M.M. ve Willits, D.H., 1998. The Effect of Night Temperature on Greenhouse Grown Tomato Yields in Warm Climate, Agriculture Forest Meteorology, 92, 191-202.
- Pregitzer, K. S., King, J. S., Burton, A. J. ve Brown, S. E., 2000. Responses of Tree Fine Roots to Temperature, New Phytologist, 147, 105-115.
- Principato, G.B., Rosi, G., Talesa, V., Govannini, E. ve Uolila, L., 1987. Purification and Characterization of Two Forms of Glyoxalase II From Rat Liver and Brain of Wistar Rats, Biochemica et Biophysica Acta, 911, 349-355.
- Rachmilevitch, S., Huang, B. ve Lambers, H., 2006. Assimilation and Allocation of Carbon and Nitrogen of Thermal and Nonthermal Agrostis Species in Response to High Soil Temperature, New Phytologist, 170, 479-490.

- Rani, B., Kumari, N., Pooja, Jain, V., Dhawan, K., Monica, Avtar, R., Kumar, A. ve Sheoran, P., 2016. High Temperature Induced Changes in Antioxidative Enzymes in *Brassica juncea* (L) Czern & Coss, Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 10, 118-125.
- Raseetha, S., Leong, S.Z., Burritt, D. ve Oey, I., 2013. Understanding the Degradation of Ascorbic Acid and Glutathione in Relation to the Levels of Oxidative Stress Biomarkers in Broccoli (*Brassica oleracea* L. italica cv. Bellstar) During Storage and Mechanical Processing, Food Chemistry, 138, 1360-1369.
- Rodríguez, M., Canales, E. ve Borrás-Hidalgo, O., 2005. Molecular Aspects of Abiotic Stress in Plants, Applied Biochemistry and Biotechnology, 22, 1–10.
- Rossi, S., Burgess, P., Jespersen, D. ve Huang, B., 2017. Heat-Induced Leaf Senescence Associated with Chlorophyll Metabolism in Bentgrass Lines Differing in Heat Tolerance, Crop Science, 57, 169–178.
- Sairam, R. ve Tyagi, A., 2004. Physiology and Molecular Biology of Salinity Stress Tolerance in Plants, Current Sciences, 86, 407–421.
- Sakamoto, A., ve Murata, N., 2000. Genetic Engineering of Glycine Betaine Synthesis in Plants: Current Status and Implications for Enhancement of Stress Tolerance, Journal of Experimental Botany, 51, 81–88.
- Sarieva, G.E., Kenzhebaeva, S.S. ve Lichtenthaler, H.K., 2010. Adaptation Potential of Photosynthesis in Wheat Cultivars with a Capability of Leaf Rolling Under High Temperature Conditions, Russian Journal of Plant Physiology, 57, 28–36.
- Sato, S., Kamiyama, M., Iwata, T., Makita, N., Furukawa, H. ve Ikeda, H., 2006. Moderate Increase of Mean Daily Temperature Adversely Affects Fruit Set of *Lycopersicon esculentum* by Disrupting Specific Physiological Processes in Male Reproductive Development, Annals of Botany, 97, 731–738.
- Savage, M.J. ve Cass, A., 1984. Psychrometric Field Measurement of Water Potential Changes Following Leaf Excision, Plant Physiology, 74, 96-98.
- Savicka, M. ve Škute, N., 2010. Effects of High Temperature on Malondialdehyde Content, Superoxide Production and Growth Changes in Wheat Seedlings (*Triticum aestivum* L.), Ekologija, 56, 26-33.
- Scafaro, A. P., Haynes, P. A. ve Atwell, B. J., 2010. Physiological and Molecular Changes in *Oryza meridionalis*, a Heat-Tolerant Species of Wild Rice, Journal of Experimental Botany, 61, 191-202.
- Scandalios, J. G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases, Plant Physiology, 101, 7-12.
- Scharf, K. D., Berberich, T., Ebersberger, I. ve Nover, L., 2012. The Plant Heat Stress Transcription Factor (Hsf) Family: Structure, Function and Evolution, Biochimica et Biophysica Acta, 1819, 104-119.
- Sharma, P. ve Dubey, R.S., 2004. Ascorbate Peroxidase from Rice Seedlings: Properties of Enzyme Isoforms, Effects of Stresses and Protective Roles of Osmolytes, Plant Science, 167, 541-550.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R.S. ve Pessarakli, M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions, Journal of Botany, 2012, 1-26.

- Sharma, D., Rachhoya, H.K., Sharma, M. ve Agarwal, R., 2018. Effect of Rising Temperature Stress on Growth and Physiology of Domestic Crops of Rajasthan, India, International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7, 1426-1440.
- Sieferman-Harms, D., 1987. The Light Harvesting Function of Carotenoids in Photosynthetic Membrane, Plant Physiology, 69, 561–568.
- Simoës-Araújo, J.L., Rumjanek, N.G. ve Margis-Pinheiro, M., 2003. Small Heat Shock Proteins Genes are Differentially Expressed in Distinct Varieties of Common Bean, Brazilian Journal Plant Physiology, 15, 33-41.
- Singh, P. ve Dhaka, N., 2015. Glyoxalase System and Salinity Stress in Plants, Managing Salt Tolerance in Plants, Molecular and Genomic Perspectives, 173, 1-14.
- Singh, A., Sharma, M.K. ve Sengar, R.S., 2017. Osmolytes: Proline Metabolism in Plants as Sensors of Abiotic Stress, Journal of Applied and Natural Science, 9, 2079-2092.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S. ve Miszalski, Z., 2007. The Role of Hydrogen Peroxide in Regulation of Plant Metabolism and Cellular Signalling in Response to Environmental Stresses, Acta Biochimica Polonica, 54, 39-50.
- Smale, M. ve Fitzgerald, N., A Field Guide to The Vegetation Associations of the Taupo Volcanic Zone, 32, ISSN 2230-4355, Landcare Research New Zealand, Waikato Regional Council Technical Report, 2015.
- Smirnoff, N., 1993. The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation., New Phytologist, 125, 27-58.
- Smirnoff, N., 2000. Ascorbate Biosynthesis and Function in Photoprotection, Philosophical Transactions of the Royal Society B, 1402, 1455–1464.
- Soengas, P., Rodríguez, V.M., Velasco, P. ve Cartea, M.E., 2018. Effect of Temperature Stress on Antioxidant Defenses in Brassica oleracea, ACS Omega, 3, 5237–5243.
- Sousa Silva, M., Gomes, R.A., Ferreira, A.E.N., Freire, A.P. ve Cordeiro, C., 2013. The Glyoxalase Pathway: The First Hundred Years and Beyond, Biochemical Journal, 453, 1-15.
- Sripinyowanich, S., Klomsakul, P., Boonburapong, B., Bangyeekhun, T., Asami, T., Gu, H.Y., Buaboocha, T. ve Chadchawan, S., 2013. Exogenous ABA Induces Salt tolerance in Indica Rice (*Oryza sativa* L.): The Role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* Gene Expression during Salt Stress, Environmental and Experimental Botany, 86, 94–105.
- Srivastava, S., Pathak, A.D., Gupta, P.S., Shrivastava, A.K. ve Srivastava, A.K., 2012. Hydrogen Peroxide-Scavenging Enzymes Impart Tolerance to High Temperature Induced Oxidative Stress in Sugarcane. Journal of Environment Biology, 33, 657-661.
- Takahama, U. ve Oniki, T., 1994. Effects of Ascorbate on Oxidation of Hydroxycinnamic acid Derivatives and the Mechanism of Oxidation of Sinapic acid by Cell Wall-Bound Peroxidases, Plant Cell Physiology, 35, 593- 600.
- Tan, K., Çelik, A., Gemici, Y., Gemici, M. ve Yildirim, H. 2008. *Heliotropium thermophilum* (Boraginaceae), a New Taxon from SW Anatolia, Turkey, Advanced Science Letters, 1, 132–139.

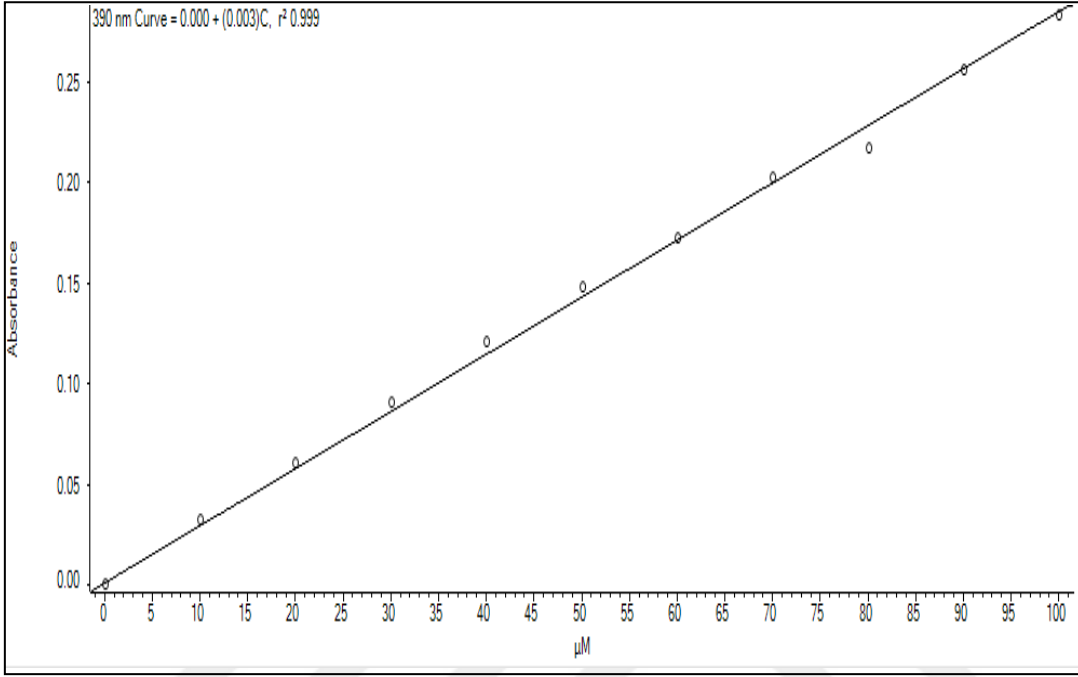
- Teitze, F., 1969. Enzymatic Method for The Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues, Analytical Biochemistry, 27, 502-522.
- Tercek, M. T., Hauber, D. P. ve Darwin, S.P., 2003. Genetic and Historical Relationships Among geothermally Adapted *Agrostis* (bentgrass) North America and Kamchatka: Evidence for Apreviously Unrecognized Thermally Adapted Taxon, American Journal of Botany, 90, 1306-1312.
- Thompson, J.E., Legge, R.L. ve Barber, R.F., 1987. The Role of Free Radicals in Senescence and Wounding, New Phytologist, 105, 317-344.
- Tian, J., Belanger, F.C. ve Huang, B., 2009. Identification of Heat Stress-Response Genes in Heat-Adapted Thermal *Agrostis scarba* by Suppression Subtractive Hybridization, Journal of Plant Physiology, 166, 588-601.
- Tuteja N., 2007. Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling, Plant Signaling and Behavior, 2, 135-138.
- Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E. ve Herka, K., 1991. Elicitation of Defense Responses in Bean Leaves by *Botrytis cinerea* Polygalacturanase, Acta Physiologiae Plantarum, 13, 43-50.
- Vallabhaneni, F. Li, R. Yu, J. Rocheford, T. ve Wurtzel, E. T., 2008. The Maize Phytoene Synthase Gene Family: Overlapping Roles for Carotenogenesis in Endosperm, Photomorphogenesis, and Thermal Stress Tolerance, Plant Physiology, 147, 1334-1346.
- Vallelian-Bindschedler, L., Schweizer, P., Mosinger, E. ve Metraux, J. P., 1998. Heat-Induced Resistance in Barley to Powdery Mildew (*Blumeria graminis* f. sp. hordei) is Associated with a Burst of Active Oxygen Species, Molecular Plant Pathology, 52, 185-199.
- Velikova, V., Yordanov, I. ve Edreva, A., 2000. Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain-Treated Bean Plants: Protective Roles of Exogenous Polyamines, Plant Science, 151, 59-66.
- Vinocur, B. ve Altman, A., 2005. Recent Advances in Engineering Plant Tolerance to Abiotic Stress: Achievements and Limitations, Current Opinion in Biotechnology, 16, 123-132.
- Volkov, R.A., Panchuk, I.I., Mullineaux, P.M. ve Schöffl, F., 2006. Heat stress-induced H₂O₂ is Required for Effective Expression of Heat Shock Genes in *Arabidopsis*, Plant Molecular Biology, 61, 733-746.
- Vollenweider, P. ve Gunhardt-Goerg, M.S, 2005. Diagnosis of Abiotic and Biotic Stress Factors Using the Visible Symptoms in Foliage, Environmental Pollution, 137, 455-465.
- Wahid, A. ve Close, T.J., 2007. Expression of Dehydrins under Heat Stress and Their Relationship with Water Relations of Sugarcane Leaves, Biologia Plantarum, 51, 104-109.
- Wahid, A., 2007. Physiological Implications of Metabolites Biosynthesis in Net Assimilation and Heat Stress Tolerance of Sugarcane (*Saccharum officinarum*) Sprouts, Journal of Plant Research, 120, 219-228.

- Wani, S., Kumar, V., Shriram, V. ve Sah, S. K., 2016. Phytohormones and Their Metabolic Engineering for Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants, The Crop Journal, 4, 162-176.
- Wardlaw, I.F., Blumenthal, C., Larroque, O. ve Wrigley, C.W., 2002. Contrasting Effects of Chronic Heat Stress and Heat Shock on Kernel Weight and Flour Quality in Wheat, Functional Plant Biology, 29, 25–34.
- Waters, E.R., 2013. The Evolution, Function, Structure, and Expression of the Plant sHSPs, Journal of Experimental Botany, 64, 391-403.
- Xu, S., Li, J., Zhang, X., Wei, H. ve 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, Environmental and Experimental Botany, 56, 274-285.
- Xue, G. P., Sadat, S., Drenth, J. ve Mc Intyre, C. L., 2014. The Heat Shock Factor Family from *Triticum aestivum* in Response to Heat and Other Major Abiotic Stresses and Their Role in Regulation of Heat Shock Protein Genes, Journal of Experimental Botany, 65, 539-557.
- Yadav, S. K., Singla-Pareek, S. L., Ray, M., Reddy, M. K. ve Sopory, S. K., 2005a. Methylglyoxal Levels in Plants Under Salinity Stress are Dependent on Glyoxalase I and Glutathione, Biochemical and Biophysical Research Communications, 337, 61-67.
- Yadav, S. K., Singla-Pareek, S. L., Ray, M., Reddy, M. K. ve Sopory, S. K., 2005b. Methylglyoxal Levels in Plants under Salinity Stress are Dependent on Glyoxalase I and Glutathione, Biochemical and Biophysical Research Communications, 337 61-67.
- Yancey, P. H., Compatible and Counteracting Solutes, Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation, Strange, K., Editörler, 81–109, CRC Press, Boca Raton, 1994.
- Yıldırım, S., Kadioğlu, A., Sağlam, A. ve Yaşar, A., 2016. Determination of Phenolic Acids and Rutin in *Heliotropium thermophilum* by High-performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection, Instrumentation Science and Technology, 45, 25-48.
- Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J., Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K., Maruyama, K., Kim, J., Seki, M., Todaka, D., Osakabe, Y., Sakuma, Y., Schöz, F., Shinozaki, K. ve Yamaguchi-Shinozaki, K., 2011. *Arabidopsis HsfA1* Transcription Factors Function as the Main Positive Regulators in Heat Shock-Responsive Gene Expression, Molecular Genetics and Genomics, 286, 321–332.
- You, J. ve Chan, Z., 2015. ROS Regulation During Abiotic Stress Responses in Crop Plants, Frontiers in Plant Science, 6, 1092-1107.
- Young, J., 1991. The Photoprotective Role of Carotenoids in Higher Plants, Physiologia Plantarum, 83,702–708.
- Zaefyzadeh, M. Quliyev, R. A. Babayeva, S. M. ve Abbasov, M. A., 2009. The Effect of The Interaction Between Genotypes and Drought Stress on The Superoxide Dismutase and Chlorophyll Content in Durum Wheat Landraces, Turkish Journal of Biology, 33, 1–7.

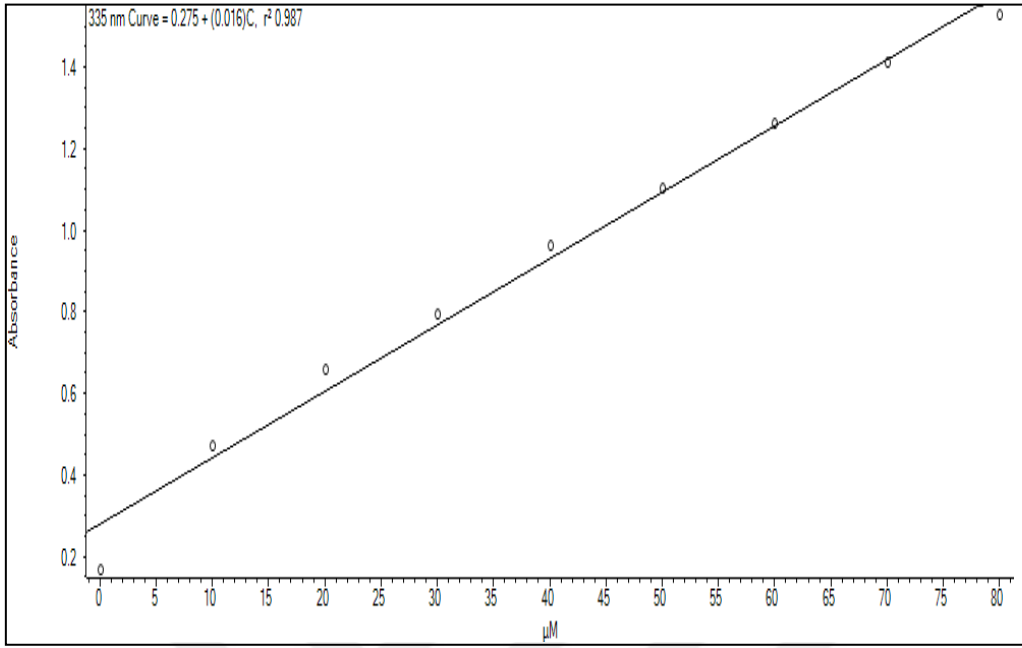
- Zhang, W., He, S.Y. ve Assmann, S.M., 2008. The Plant Innate Immunity Response in Stomatal Guard Cells Invokes G-Protein-Dependent Ion Channel Regulation, The Plant Journal, 56, 984–996.
- Zhang, L., Gao, M., Hu, J., Zhang, X., Wang, K. Ve Ashraf, M., 2012. Modulation Role of Abscisic Acid (ABA) on Growth, Water Relations and Glycinebetaine Metabolism in Two Maize (*Zea mays* L.) Cultivars under Drought Stress, International Journal of Molecular Sciences, 13, 3189-3202.
- Zhang, Z., Zhang, X., Hu, Z., Wang, S., Zhang, J., Wang, X., Wang, Q. ve Zhang, B., 2015. Lack of K-Dependent Oxidative Stress in Cotton Roots Following Coronatine-Induced ROS Accumulation, PLoS ONE, 10, 1-17.
- Zhao, D. Y., Shen, L., Yu, M. M., Zheng, Y. ve Sheng, J. P., 2009. Relationship Between Activities of Antioxidant Enzymes and Cold Tolerance of Postharvest Tomato Fruits, Food Science, 14, 309-313.
- Zou, J., Liu, A., Chen, X., Zhou, X., Gao, G., Wang, W. ve Zhang, X., 2009. Expression Analysis of Nine Rice Heat Shock Protein Genes Under Abiotic Stresses and ABA Treatment, Journal of Plant Physiology, 166, 851-861.
- Żróbek-Sokolnik, A., Temperature Stress and Responses of Plants, In Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change, Ahmad, P. ve Prasad, M.N.V., Editörler, 113–134, Springer, New York, 2012.

8. EKLER

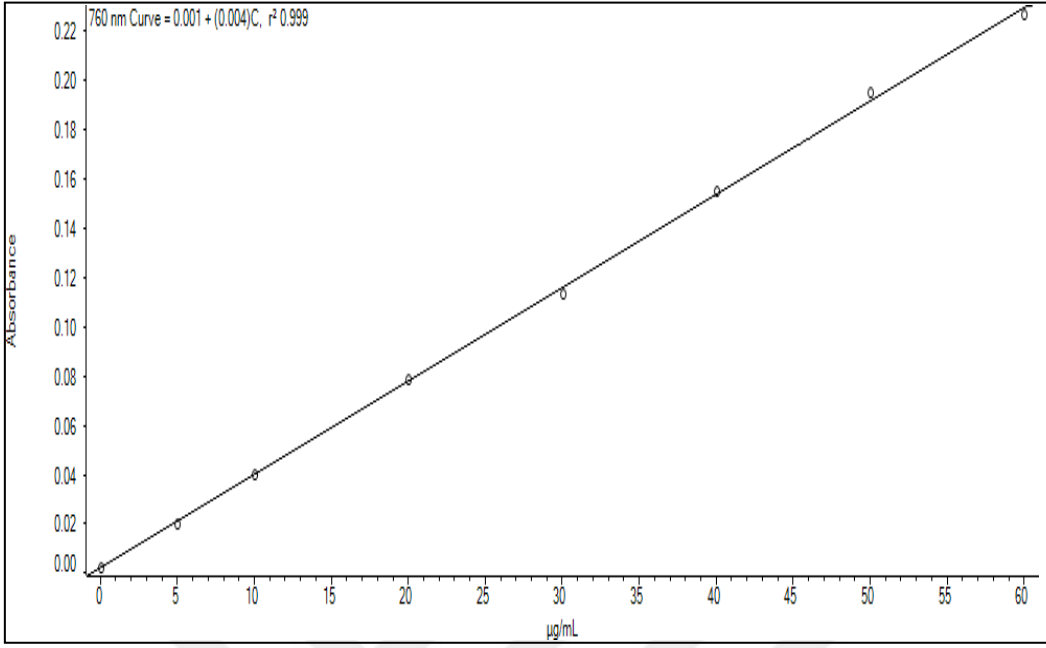
Ek 1. H₂O₂ standartları ve standart eğrisi



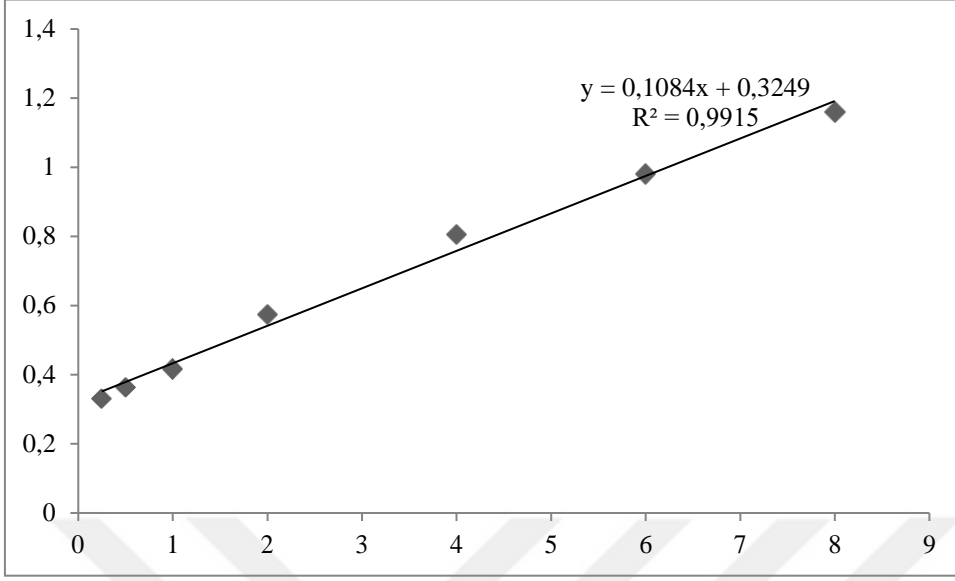
Ek 2. MG standart eğrisi



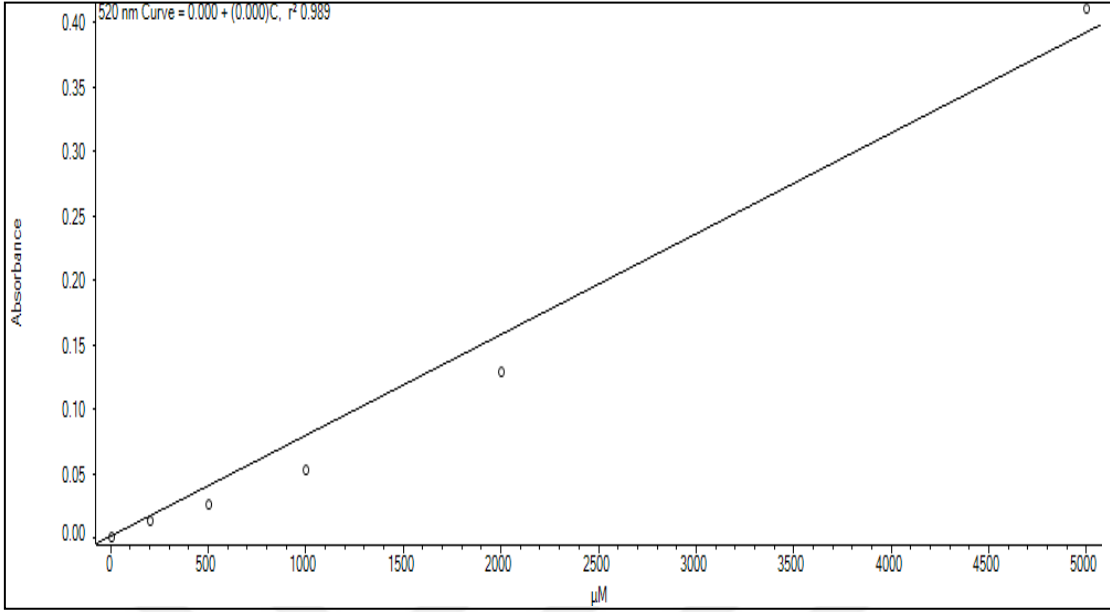
Ek 3. Askorbat standart konsantrasyonları ve standartlardan oluşan standart eğrisi



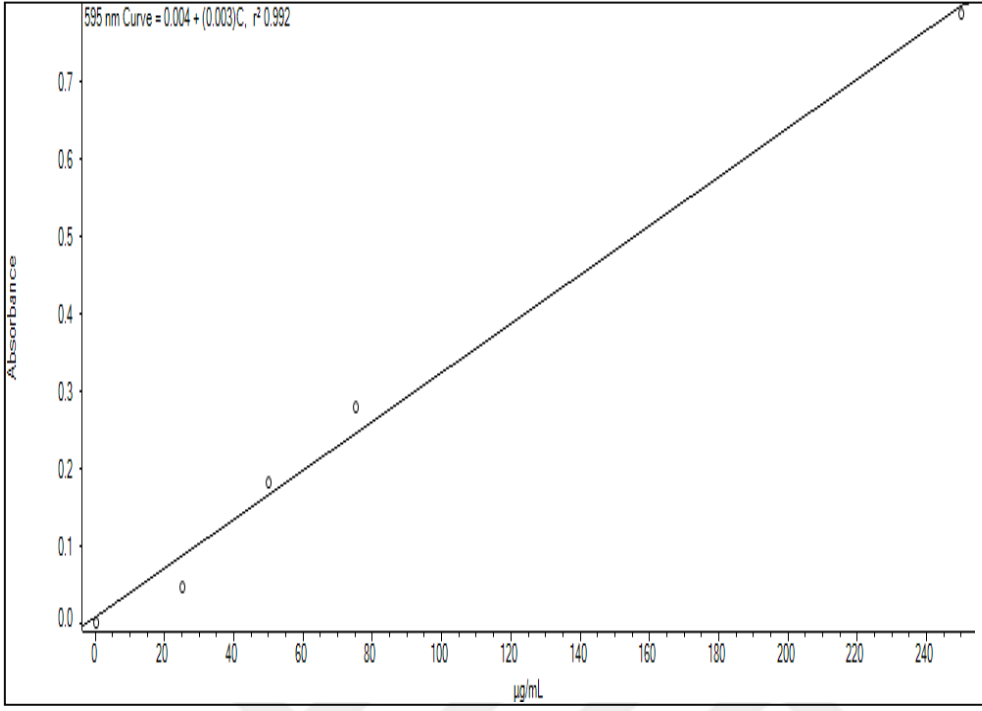
Ek 4. GSH kalibrasyon eğrisi



Ek 5. Prolin standartları ve kalibrasyon eğrisi



Ek 6. Protein standartları ve standartlardan oluşan kalibrasyon eğrisi



ÖZGEÇMİŞ

Asiye SEZGİN MUSLU 1 Mayıs 1991' de Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Yomra'da tamamladı. 2007 yılında KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2012 yılında Biyoloji bölümünden mezun olarak aynı zamanda Biyoloji Pedagojik Formasyon eğitimini tamamladı. Ara vermeyerek, 2012 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Asim KADIOĞLU danışmanlığında Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2015 yılında Yüksek Lisansını tamamlayarak aynı yılda KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Asim KADIOĞLU danışmanlığında Doktora eğitimine başladı. Lisansüstü eğitiminde TÜBİTAK 111T511, 114Z148 (COST), 114Z336 kodlu ulusal ve uluslararası projelerde bursiyer, FHD-2016-5655, FHD-2016-5455, FDK-2017-7214 kodlu BAP projelerinde araştırmacı olarak görev aldı. Ayrıca lisansüstü eğitiminde Turkish Journal of Biology, Acta Physiologiae Plantarum, Journal of Plant Physiology, Biologia Plantarum dergilerinde yayınlanmış uluslararası makaleleri ve birçok ulusal ve uluslararası kongrelerde bildirileri bulunmaktadır. 2018 yılında Avrasya Üniversitesinde Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programında öğretim görevlisi olarak göreve başladı. Evli olup Trabzon'da yaşamaktadır.